



T.VDC-247

**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**  
**FACULTADE DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUIMICA FUNDAMENTAL E INDUSTRIAL**

**ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD Y PROCESOS REDOX  
SOBRE UN MODELO RECIENTE DE MEMBRANA BIOLÓGICA:  
EL ELECTRODO DE MERCURIO RECUBIERTO DE  
UNA MONOCAPA AUTOORGANIZADA DE FOSFOLÍPIDOS.**

Memoria para optar al Grado de  
Doctor en CC. Químicas presentada por  
**ROBERTO F. HERRERO RODRÍGUEZ**

**LA CORUÑA, NOVIEMBRE 1994**



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**FACULDADE DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL E INDUSTRIAL**

**ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD Y PROCESOS REDOX  
SOBRE UN MODELO RECIENTE DE MEMBRANA BIOLÓGICA:  
EL ELECTRODO DE MERCURIO RECUBIERTO DE  
UNA MONOCAPA AUTOORGANIZADA DE FOSFOLÍPIDOS.**

Memoria para optar al Grado de  
Doctor en CC. Químicas presentada por  
*ROBERTO F. HERRERO RODRÍGUEZ*

**LA CORUÑA, NOVIEMBRE 1994**

**JOSE M<sup>a</sup> QUINTELA LOPEZ**, Director del Departamento de Química Fundamental e Industrial de la Universidad de La Coruña,

**CERTIFICA:**

Que el Licenciado en Ciencias Químicas D. *Roberto F. Herrero Rodríguez*, ha realizado en este Departamento, bajo la dirección del *Prof. Dr. D. Manuel Sastre de Vicente*, el trabajo que bajo el título: *Estudios de permeabilidad y procesos redox sobre un modelo reciente de membrana biológica: el electrodo de mercurio recubierto de una monocapa autoorganizada de fosfolípidos*, presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que así conste, expido y firmo la presente en La Coruña, a 10 Noviembre de 1994.



Pro. J.M. Quintela López

**MANUEL ESTEBAN SASTRE DE VICENTE**, Profesor Titular del Área de Química Física del Departamento de Química Fundamental e Industrial de la Universidad de La Coruña,

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de investigación titulado: **Estudios de permeabilidad y procesos redox sobre un modelo reciente de membrana biológica: el electrodo de mercurio recubierto de una monocapa autoorganizada de fosfolípidos** ha sido realizado por el Licenciado D. *Roberto F. Herrero Rodríguez* en el Departamento de Química Fundamental e Industrial, Laboratorio de Electroquímica, y que, como Director del mismo, autorizo su presentación como Tesis Doctoral a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expido y firmo la presente en La Coruña, a 9 de Noviembre de 1994.



Fdo. M.E. Sastre de Vicente

## Agradecimientos

Quiero manifestar mi agradecimiento, en primer lugar, a mi director el Prof. Dr. Manuel E. Sastre de Vicente por su continuo apoyo, orientación y estímulo que tanto me ayudaron a seguir adelante.

Agradezco al Prof. Rolando Guidelli por haberme permitido desarrollar parte de este trabajo en el laboratorio de electroquímica de la Universidad de Florencia, a la doctora Maria Rosa Moncelli por su valiosa ayuda en el aprendizaje de la técnica experimental y a Lucia Becucci y Luciano Rigueschi por su compañía en el laboratorio y por la paciencia que tuvieron conmigo. A todos ellos les agradezco por haber conseguido que ese tiempo lejos de la familia pasase rapidísimamente.

Agradezco a los profesores Julio Abalde y Concha Herrero por haberme facilitado el uso del escáner que contribuyó notablemente a mejorar la presentación de esta memoria.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca de F.P.I.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Isa, Sarah, Tere y Paco por convertir el lugar de trabajo en un segundo hogar.

A mis padres y a Silvia, por todo.

ÍNDICE

I. Introducción . . . . .	3
II. Informe bibliográfico . . . . .	8
II.1. Membranas biológicas . . . . .	9
II.2. Modelos de membrana biológica . . . . .	10
II.3. Electrodo de mercurio recubierto de una monocapa de fosfolípidos . . . . .	11
II.3.1. Contribución de I. R. Miller . . . . .	12
II.3.2. Contribución de A. Nelson . . . . .	17
II.3.3. Contribución de R. Guidelli . . . . .	31
III. Parte experimental . . . . .	33
III.1. Reactivos. . . . .	34
III.2. Aparatos y procedimiento experimental. . . . .	34
III.3. Silanización del capilar. . . . .	37
III.4. Limpieza del material de vidrio. . . . .	38
III.5. Medidas electroquímicas. . . . .	39
III.6. Caracterización de la monocapa . . . . .	40
IV. Resultados y discusión . . . . .	47
IV.1. Adsorción de tetrafenilfosfonio y tetrafenilborato en monocapas autoorganizadas de fosfatidilcolina y fosfatidilserina depositadas sobre electrodos de mercurio. . . . .	48
IV.1.1. Introducción . . . . .	48
IV.1.2. Resultados . . . . .	49
IV.1.3. Discusión . . . . .	53
IV.1.4. Un modelo . . . . .	55
IV.1.5. Curvas de capacidad diferencial . . . . .	57
IV.1.6. Una isoterma de adsorción que tiene en cuenta los efectos de cargas discretas. . . . .	59
IV.1.7. Comparación de la isoterma de adsorción con el	

## *Indice*

---

experimento. . . . .	62
IV.1.8. Dependencia del pH de la adsorción iónica en monocapas de fosfatidilserina. . . . .	64
IV.2.1. Comportamiento de la L-Cisteína . . . . .	80
IV.2.1.1. Comportamiento en ausencia de fosfolípido . . . . .	80
IV.2.1.2. Comportamiento en presencia de fosfolípido . . . . .	81
IV.2.1.2.1.Efecto de la cisteína sobre el fosfolípido . . . . .	81
IV.2.1.2.2.Variación del potencial de inversión . . . . .	82
IV.2.1.2.3.Experiencias con barrido sencillo . . . . .	83
IV.2.1.2.4.Descripción de los voltamogramas de multibarrido. . . . .	88
IV.2.1.2.5. Tiempo de agitación y potencial de preelectrolisis . . . . .	90
IV.2.1.2.6.Comportamiento de la cisteína a diferentes pH. . . . .	92
IV.2.2. Comportamiento de la L-Cistina . . . . .	95
IV.2.2.1.Comportamiento redox de la cistina en ausencia de fosfolípidos . . . . .	95
IV.2.2.2.Comportamiento redox de la cistina en presencia de fosfolípidos . . . . .	98
IV.2.3. Comportamiento de la 2-mercaptopiridina . . . . .	101
IV.2.3.1. Voltametría cíclica de la 2-mercaptopiridina . . . . .	101
IV.2.3.2. Permeabilidad de la 2-mercaptopiridina. Un modelo de solubilidad-difusión . . . . .	103
V. Conclusiones. . . . .	146
VI. Bibliografía. . . . .	149
VII. Apéndice. . . . .	154

# **I. Introducción**

## **I. Introducción:**

En la presente memoria se recogen los primeros resultados, pertenecientes a una nueva línea de trabajo del grupo de electroquímica de la Universidad de la Coruña. Dicha línea de trabajo, iniciada alrededor de 1990-91, se centra en el estudio de los procesos de permeabilidad y oxidación-reducción de moléculas de interés biológico a través de un nuevo modelo de biomembrana constituido por un electrodo estático de mercurio recubierto de una monocapa de fosfolípidos; como es bien sabido, dichas sustancias son, junto a las proteínas, los componentes esenciales de las membranas celulares.

Gran parte de nuestro tiempo se ha invertido en el desarrollo y la puesta a punto de la técnica experimental, que ha exigido, por otra parte, un porcentaje de material no accesible comercialmente.

Los sistemas objeto de estudio han sido dos y se corresponden con la persecución de un doble objetivo:

En primer lugar realizar estudios de permeabilidad de moléculas en ausencia de corriente faradaica; con este fin se ha empleado como sustancias testigo dos iones hidrofóbicos típicos: el tetrafenilfosfonio y el tetrafenilborato (fig. I.1) sustancias ampliamente utilizadas en estudios con bicapas lipídicas (BLM). Esta parte del trabajo se llevó a cabo utilizando una técnica cronocoulombimétrica computerizada para la medida de la carga superficial sobre el electrodo y se realizó en el laboratorio de electroquímica de la Universidad de Florencia, en el seno de un grupo de prestigio internacional en el campo de la electroquímica interfacial que dirige el profesor Rolando Guidelli.

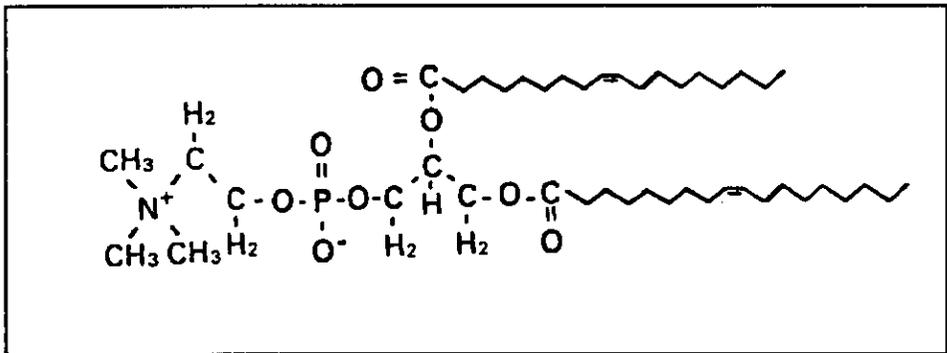
La segunda parte se refiere al estudio de procesos redox a través de una monocapa de fosfatidilcolina (fig. I.1) y se ha realizado en nuestro laboratorio de la Coruña. Se han elegido como sistemas objeto de estudio los procesos asociados al par redox disulfuro (-S-S)/tiol(-SH), sin duda uno de los más importantes en el campo de la biología. Para tal fin se ha seleccionado, por un lado, el par cisteína/cistina (fig. I.2), quizá el más representativo desde una perspectiva bioquímica. Además, se han efectuado también diferentes estudios sobre una molécula con una estructura química diferente de las dos anteriores: la 2-mercaptopiridina, que posee un anillo aromático (fig. I.2), de

## *Introducción*

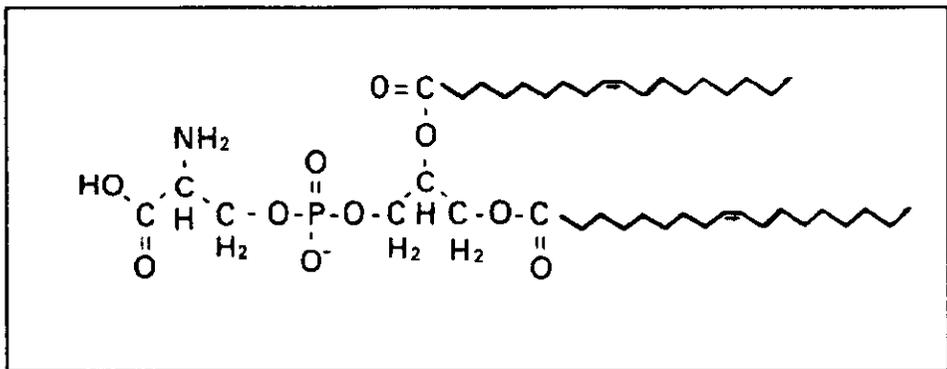
---

la que cabe esperar una mayor hidrofobicidad.

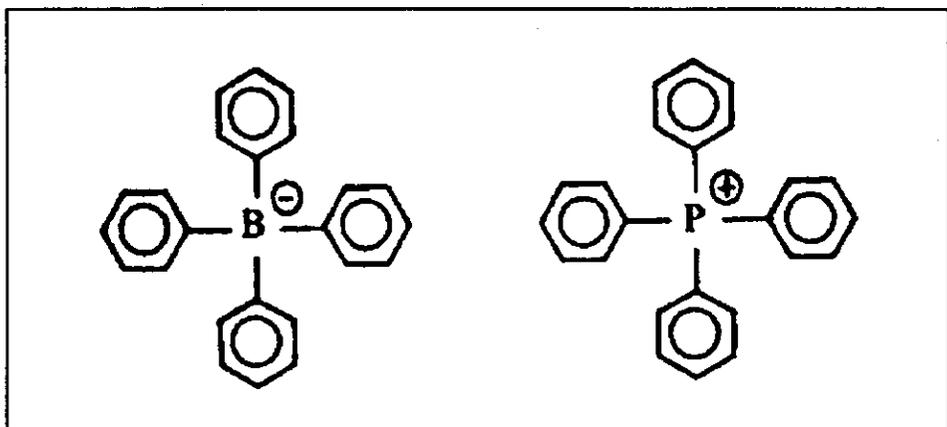
Creemos que el trabajo realizado, tanto en lo referente a las características de las monocapas, como en lo concerniente a la información obtenida sobre la penetración de los compuestos anteriormente citados, abre unas perspectivas magníficas para el desarrollo de un área de investigación centrada en el ya acuñado término de **BIOELECTROQUIMICA** y orientada al estudio de las interacciones de compuestos de interés farmacológico con este modelo biomimético de membrana celular.



Dioleilfosfatidilcolina



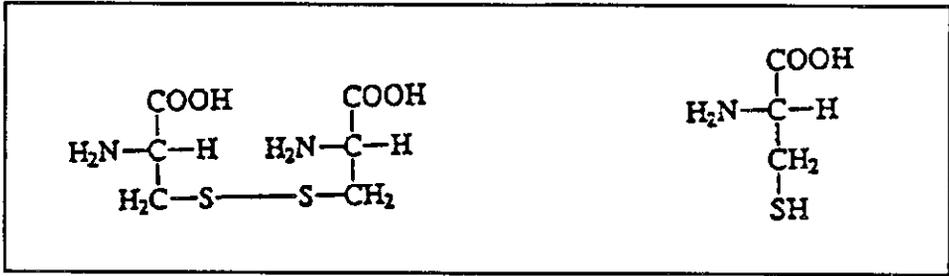
Dioleilfosfatidilserina



Tetrafenilborato

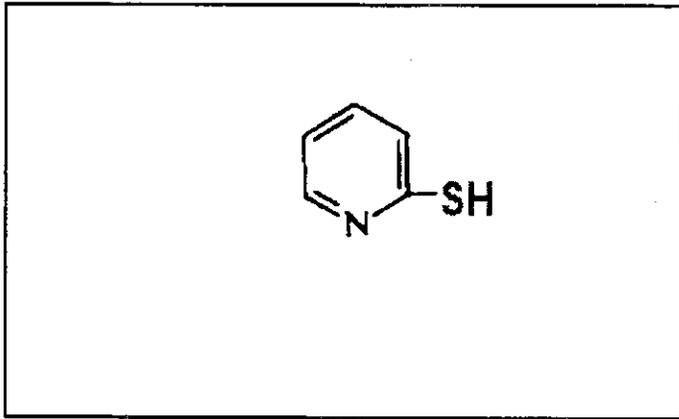
Tetrafenilfosfonio

Figura I.1



L-Cistina

L-Cisteína



2-mercaptopiridina

Figura I.2

## **II. Informe bibliográfico**

## **II. Informe bibliográfico**

### **II.1.- Membranas biológicas, (Fendler, 1982)**

Las membranas juegan un papel central tanto en la estructura como en la función desarrollada por todas las células y definen básicamente, compartimentos celulares asociados, en consecuencia, a un exterior y a un interior. Evidentemente, si esta fuera únicamente su función, serían considerablemente menos interesantes de lo que realmente son; sin embargo, las membranas no solamente definen compartimentos sino que también determinan la naturaleza de todas las comunicaciones entre el interior y el exterior. Dichas comunicaciones pueden traducirse en el paso de iones o moléculas entre los dos compartimentos (interior y exterior) o, simplemente, pueden aparecer en forma de información transmitida mediante los cambios conformacionales inducidos en los componentes de la membrana. Además, a las membranas se encuentran unidos distintos enzimas celulares; algunos de ellos catalizan las reacciones de transmembrana que involucran reactivos de ambos lados de la membrana o el transporte molecular. Se puede afirmar que la mayor parte de las funciones bioquímicas fundamentales en la célula incluyen algún proceso a través de la membrana celular, donde destaca la membrana plasmática que define los límites de la célula y es el punto de contacto entre la célula y su entorno, así como otra serie de membranas, la nuclear etc., que caracterizan una serie de orgánulos de la misma.

Desde un perspectiva histórica, ya a mediados del siglo XIX se reconoció que la membrana plasmática en la superficie de las células era de naturaleza discreta. A finales del siglo XIX Overton, observó que existía una correlación entre la velocidad a la que diversas moléculas penetraban en las células de distintas plantas y sus coeficientes de reparto entre aceite y agua lo que llevó a especular con la naturaleza lipídica de la membrana. En 1925 Gortel y Grendel propusieron que los lípidos en las membranas de eritrocitos se disponían en forma de una doble capa lipídica. Llegaron a esta conclusión a partir de ciertos experimentos sencillos a la vez que elegantes: los lípidos de los eritrocitos se extraen con acetona y se dispersan en agua mediante una balanza de Langmuir de manera que forman una capa fina sobre la superficie del agua y a continuación se desplaza el brazo de la balanza a lo largo de la superficie de manera que se comprimen las moléculas de agua en la superficie aire-agua. En un punto bien definido, la capa superficial ofrecía resistencia y este hecho se interpretó como la situación en la que la capa lipídica se disponía formando una monocapa

molecular con máximo empaquetamiento. Cuando el área ocupada por los lípidos se comparó con el área calculada a partir de la extracción con eritrocitos, se encontró una relación 2:1 lo que condujo a la conclusión de que la membrana consistía en dos capas de lípidos disueltos. El modelo de membrana constituido por una membrana lipídica fue elaborado posteriormente, en 1935, por Davson y Danielli. En dicho modelo se suponía que las proteínas "tapaban" la membrana lipídica; años después, el desarrollo de nuevas técnicas instrumentales condujo al modelo de mosaico fluido de Singer y Nicolson en el que, básicamente, se dibuja la membrana como una bicapa fosfolipídica en la que las proteínas se encuentran sumergidas en distinto grado dependiendo de la situación y que constituye, con ligeras modificaciones, el telón de fondo conceptual para la mayor parte de la investigación en membranas biológicas.

En lo referente a la composición química, las membranas están constituidas por las proteínas y los lípidos, pudiendo variar la composición de cada fracción entre un 20 y 80 %; entre los lípidos predominan los fosfolípidos.

## **II.2 Modelos de membrana biológica.**

Dada la estructura y composición química basada en fosfolípidos de las membranas celulares, los modelos de membrana biológica desarrollados son variados; sin embargo, se pueden agrupar, de forma muy general, en las siguientes estructuras de fosfolípidos: 1.- Monocapas, 2.-Bicapas planas, (BLM) 3.-Liposomas o vesículas, (Fendler, 1982).

Cada uno de estos sistemas y sus distintas variantes poseen ventajas e inconvenientes, obteniéndose información diversa a partir de cada modelo ensayado que ha sido de gran valor a la hora de desarrollar conceptos relativos a las membranas biológicas.

En relación con los modelos anteriores se han realizado numerosos estudios, de distinto carácter: ópticos, espectroscópicos, calorimétricos, etc., no obstante cuando se trata de estudiar propiedades eléctricas de interés como por ejemplo su permeabilidad hacia especies neutras e iones que puedan sufrir procesos de transferencia de carga eléctrica, tanto directamente como incluyendo poros, canales, portadores, etc. el electrodo de mercurio recubierto de una monocapa de fosfolípidos constituye el método más conveniente (Miller, 1981; Nelson y Benton, 1986; Moncelli y Guidelli, 1992); sus características y desarrollo histórico se describen a continuación.

### **II.3. El electrodo de mercurio recubierto de una monocapa de fosfolípidos, (Miller, 1981; Nelson, 1986; Guidelli, 1992)**

A diferencia de lo que sucede con otro tipo de modelos, las dos fases que rodean a la monocapa de fosfolípidos poseen una conductividad alta, lo que constituye una característica fundamental a la hora de estudiar procesos de transporte de carga eléctrica. Por otra parte, presentan ventajas sobre los modelos de bicapa lipídica: el potencial eléctrico y el flujo de iones metálicos electrorreducibles a través de dichas monocapas se puede controlar de forma más directa y exacta que a través de las bicapas. Asimismo, poseen una estabilidad mecánica y una resistencia hacia campos eléctricos de gran intensidad que no comparten las bicapas. Pero además, hay que añadir a su favor las características propias del electrodo de mercurio, como son:

- 1.- La superficie de mercurio es líquida y suministra una interfase líquido-líquido definida que permite obtener monocapas fácilmente renovables y en condiciones de alta reproducibilidad.
- 2.- El electrodo de mercurio es casi idealmente polarizable, su sobrepotencial de hidrógeno es alto y su potencial se puede variar en un intervalo relativamente amplio sin la interferencia, en cantidad apreciable, de procesos de transferencia de carga; en consecuencia, su densidad de carga se puede controlar mediante una polarización externa que puede ser variada en una gran extensión. Por otra parte el transporte de iones depende de su estructura y dichos parámetros se encuentran bien caracterizados en la actualidad para la interfase mercurio-agua.
- 3.- La estructura hidrofóbica de la superficie de mercurio en la región del potencial de carga cero, condiciona una disposición de los fosfolípidos de forma que mantienen sus cabezas apolares adsorbidas sobre el mercurio y sus grupos polares de cabeza en contacto con la fase acuosa. Además, debido a la naturaleza altamente cooperativa de los procesos de autoorganización estas monocapas compactas, resultan muy parecidas a la media bicapa de una membrana lipídica y en especial de la interfase grupos polares/agua por lo que van a poseer propiedades muy similares a su equivalente biológica.
- 4.- Se pueden detectar fácilmente y con sensibilidad las perturbaciones sufridas por

la estructura de la membrana debidas a la penetración de compuestos orgánicos que puedan influir de alguna manera sobre las funciones de las membranas biológicas: proteínas, polipéptidos, hormonas, antibióticos, narcóticos, etc.

A continuación se da cuenta de los distintos trabajos que han contribuido al desarrollo de este tipo de modelo de membrana.

### **II.3.1. Contribucion de I. R. Miller.**

Miller (1981) ha realizado importantes trabajos de investigación orientados al estudio de procesos estructurales y energéticos de transporte de carga a través de capas lipídicas: monocapas, bicapas planas, liposomas y vesículas, etc... utilizando distintas técnicas experimentales.

Dicho autor y col. han realizado distintos experimentos diseñados para responder diferentes cuestiones en relación con la posible estructura dinámica de los grupos polares cuando se producen interacciones con polipéptidos y proteínas; algunas de estas interrogantes son:

1.- ¿Es la estructura de los grupos polares rígida o bien se producen fluctuaciones que permiten un acceso ocasional de los grupos polares hacia la superficie de mercurio a través de la capa hidrocarbonada?.

2.- ¿Cómo afecta la penetración de proteínas y polipéptidos a la orientación media de los grupos polares y sus fluctuaciones?.

3.- ¿Cómo es posible discernir entre penetración en el fosfolípido o simplemente interacción con la capa polar?.

4.- ¿En qué medida depende la penetración de proteínas de su composición en aminoácidos, naturaleza de los grupos polares y de las cadenas hidrocarbonadas?.

Para responder a las dos primeras cuestiones se introdujo una sustancia testigo, el grupo dinitrofenilo, en la región polar mediante su fijación al grupo amino de la fosfatidiletanolamina (PE) (Miller, Rishpon and A. Tenenbaum, 1976); si el grupo electroactivo posee acceso libre a la superficie electródica su voltamograma a pH=7 debería exhibir dos picos de reducción: uno a -0.6 V (4 e<sup>-</sup>) y un segundo a -0.75 V (8 e<sup>-</sup>) relativos al ECN. Esto es lo que se observa para el dinitrofenol libre en monocapas diluidas que

### *Informe bibliográfico*

---

contienen dinitrofenil-N-fosfatidiletanolamina, o en vesículas, conteniendo el testigo en la superficie externa. Por el contrario, no deberían observarse picos de reducción en la monocapa condensada si el grupo electroactivo no accede al electrodo puesto que la transferencia electrónica por efecto túnel a través de una capa de 20Å es altamente improbable; si, por el contrario, existe un equilibrio con la mayoría de los grupos polares orientados hacia la fase acuosa y una pequeña fluctuación en cantidad X orientados hacia la superficie de mercurio, debería observarse un desplazamiento del potencial  $\Delta U$  del pico de reducción en función de X, lo que de hecho se observa.

El efecto de penetración de moléculas sobre el potencial de reducción sugiere que la penetración de la capa de proteínas es gobernada por interacciones hidrofóbicas y polares dado que la penetración puede diferenciarse de una simple adherencia al plano polar; el desplazamiento de la cadena hidrocarbonada por una especie de constante dieléctrica mayor, origina un aumento de la capacidad específica. Si la proteína penetrante contiene grupos electroactivos, como por ejemplo el grupo S-S de la cistina, los procesos de transferencia electrónica van a ser proporcionales al acceso de dichos grupos a la superficie. La investigación de la penetración de hormonas (Risphon, Y., I.R. Miller, 1977), polipéptidos y de algunas proteínas, como la insulina y el citocromo C (2.4) se basa en las consideraciones anteriores. La tendencia de la polilisina a penetrar, deducida del aumento en su capacidad, es más baja que la del copolipéptido de la lisina con fenilalanina. La polilisina no penetra en la capa de fosfatidilcolina (PC) en absoluto. El copolipéptido también penetra en la PC menos que en la fosfatidilserina (PS). La más baja penetrabilidad de la PC en relación con la PS, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, cardioplipina, etc., es una propiedad general independiente de la carga de la sustancia interaccionante.

La penetración es superior en monocapas cargadas negativamente ( PS o PC+PS ) . Por otra parte, la adición de estearilamina cargada positivamente a una capa de PC no mejora la penetración alrededor del potencial de carga cero; ésta puede ser inducida por un campo eléctrico a través de la monocapa obtenida mediante polarización positiva o negativa sobre la superficie de mercurio. Dicha penetración inducida depende en cierta manera de la dirección del campo eléctrico sobre los dipolos superficiales y de la carga de los lípidos y sustancias interaccionantes (Miller, I.R., D. Bach, M. Teuber, 1978). El transporte de iones a través de monocapas lipídicas, medidas por polarografía DC, aumenta con la modificación

### *Informe bibliográfico*

---

de las capas lipídicas por penetración. La adición de pequeñas cantidades de éteres corona, que ejercen un efecto muy pequeño sobre la capacidad de monocapas lipídicas, aumenta la permeabilidad de  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Cu}^{+2}$  en un factor de 3 a 10. Los polipéptidos penetrantes, los cuales aplicando el criterio de la capacidad ocupan hasta un 40% de la monocapa de lípido puro convirtiéndolo en un mosaico, ejercen, también, un efecto considerable sobre el transporte de iones. Uno de los iones transportados de mayor interés es el protón; su transporte se puede deducir a partir de un proceso que consume protones, como por ejemplo, la reducción del oxígeno. La corriente de reducción del oxígeno es fuertemente suprimida por monocapas lipídicas, a pesar de su mayor solubilidad en lípidos que en agua. Evidentemente el acceso de protones requerido en la reducción del oxígeno para dar peróxido de hidrógeno y posteriormente agua, es inhibido por la capa de lípido. El citocromo causa una disminución de la corriente polarográfica, en tanto que el oxígeno mejora la penetración del citocromo en la monocapa. Esta penetración se demuestra mediante un aumento de la capacidad.

Las interacciones en la región de los grupos de cabeza de la monocapa de fosfolípidos también han sido estudiadas con distintas sustancias (Miller, I.R., E. Yavin, 1988; Miller, I.R., H. Vinkler, E. Yavin, 1989); así, la sustancia diurética furosemida, totalmente insoluble en hidrocarburos, se intercala entre los grupos de cabeza expandiendo el área superficial de la monocapa y disminuye, en consecuencia, el espesor de la cadena hidrocarbonada, y eleva su capacidad. A concentraciones más altas, la excesiva expansión de la capa hidrocarbonada aumenta la tendencia a formar micelas y conduce a identaciones en las monocapas con un incremento en su permeabilidad iónica.

La toxina del cólera interacciona con el receptor hidrofílico del gangliósido GM1 introducido en la capa lipídica. Esta interacción, completamente polar, conduce a la incorporación del complejo en la monocapa, perturbando la capa hidrocarbonada, lo que origina un incremento de la capacidad y conductividad iónica de la monocapa.

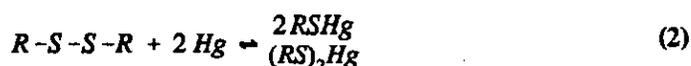
Cuando la molécula que penetra en la capa de fosfolípido contiene grupos electroactivos que sufren una reacción electródica, se produce un pico de pseudocapacidad que es proporcional en tamaño a la capacidad de acceder dichos grupos a través de la monocapa hasta la superficie electródica; tales picos permiten obtener, en muchos casos, información sobre la concentración superficial. En muchas proteínas y polipéptidos este

### Informe bibliográfico

"marcador electroactivo" son los residuos "cistina" existentes. La accesibilidad de dichos residuos a la superficie del electrodo y su posterior reducción puede emplearse como criterio para analizar cambios conformacionales en la estructura terciaria de las proteínas; por otra parte, la dependencia con el pH del potencial de reducción sirve de indicador del microambiente que rodea el respectivo grupo cistina. Como para la reducción de otros disulfuros, (Sastre, 1986), el proceso global de reducción de la cistina se puede representar como:



No obstante, se admite que la cistina forma un complejo superficial con el mercurio metálico, el cual es posteriormente reducido:



Aunque este proceso ha sido estudiado en distintas ocasiones, a lo largo de los últimos 50 años, aún existen interrogantes, particularmente en lo que se refiere a la reactividad electroquímica de la cistina, tal y como se ha puesto de manifiesto en un trabajo de revisión, muy reciente (Heyrovsky, M., P. Mader, V. Vesela, M. Fedurco, 1994).

En voltametría cíclica y en polarografía ac., en general, se observan picos de oxidación-reducción de carácter pseudocapacitivo bien desarrollados. El número de cargas transferido en la reacción electródica se puede relacionar directamente con la concentración superficial de las hormonas vasopresina, oxitocina y desaminoxitocina (Risphon, J., I.R. Miller, 1975a y b). Estas hormonas son nanopéptidos cíclicos con el anillo cerrado por un puente disulfuro entre dos grupos cistina, y todos los grupos S-S adsorbidos sufren un proceso electródico; en el caso de proteínas, solamente parte de los grupos S-S sufre reducción (Cecil, R., D. J. Weizman, 1964; Pavolvic, O., I.R. Miller, 1971), lo que ha de tenerse en cuenta a la hora de determinar la concentración superficial a partir del pico pseudocapacitivo.

Distintas moléculas de interés bioquímico conteniendo grupos -S-S- han sido estudiadas sobre monocapas de fosfolípidos depositadas en electrodos de mercurio; así, por ejemplo, la transformación protrombina-trombina, de gran importancia en los procesos de

### *Informe bibliográfico*

---

coagulación sanguínea ha sido estudiada sobre monocapas de PS ( Lecompte, M.F., I.R. Miller, J.Elion, R. Berarous, 1980; Lecompte, M.F., I.R. Miller, 1980; Lecompte, M.F., J. Clavilier, C. Dode, J. Elion, I.R.Miller, 1984; Lecompte, M.F., C. Dode, 1991), poniéndose de manifiesto un aumento de capacidad de 1.5 a  $7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  y la aparición del pico pseudocapacitivo atribuido al par cisteína/cistina que evidencia la perturbación de la capa lipídica y su penetración por la proteína; además se muestra la importancia de la carga negativa del fosfolípido y el efecto positivo del ion  $\text{Ca}^{+2}$  sobre la adsorción de la protrombina, mediante un efecto puente entre las cargas negativas de la fosfatidilserina y las del ácido carboxiglutámico de la protrombina.

No obstante, trabajos más recientes (Miller, I.R., L. Doll, 1990) han evidenciado la importancia de las interacciones hidrofóbicas, además del de las interacciones puramente iónicas expresadas en el efecto puente del ion  $\text{Ca}^{+2}$ .

La interacción de los polipéptidos formadores de canales melitina y alameticina con monocapas de PC, también han sido estudiadas empleando ac, dc y CV (Miller y Doll, 1990). La alameticina, más hidrofóbica, forma monocapas condensadas con una capacidad diferencial de  $3.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , mientras que el valor mínimo de una monocapa saturada de melitina es de  $8.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . La cinética de adsorción de la alameticina está controlada por difusión casi hasta la saturación, mientras que la de la melitina es ralentizada por repulsiones electrostáticas. Dado que el recubrimiento del electrodo es proporcional a su capacidad, el área por molécula en condiciones de saturación se ha deducido mediante extrapolación inicial de la variación de capacidad con el tiempo, hasta su valor de saturación. El área obtenida por ese procedimiento para la alameticina fue de  $2.5 \text{ nm}^2$ . El área por molécula de melitina obtenida por extrapolación del descenso inicial de la capacidad con la raíz cuadrada del tiempo es  $\approx 6.5 \text{ nm}^2$ . La alameticina o la melitina adsorbida sobre monocapas de fosfolípidos en torno al punto de carga cero (pzc) no afectan a su capacidad o a su permeabilidad iónica; a potenciales más negativos ( $\Delta V \approx -0.5 \text{ V}$  respecto al pzc) en donde las monocapas de lípidos se vuelven inestables y los polipéptidos tienden a adsorberse, origina la incorporación de éstos en las monocapas, aumentando su capacidad y permeabilidad también alrededor del pzc.

En el estudio de la proteína kinasa C ( PKC) (Lester, D.S., L. Doll, V. Brumfeld, I.R. Miller, 1990) sobre una monocapa de lípidos depositada sobre un electrodo de mercurio,

se ha puesto en evidencia el cambio de conformación de dicho compuesto a partir del número de residuos de cistina expuesto y reducidos sobre el electrodo, así como del valor de su potencial de reducción. De los 5-6 enlaces disulfuro que potencialmente pueden reaccionar con el mercurio, se observan dos picos de reducción de la cistina en diferentes microambientes dentro de la proteína adsorbida sobre mercurio. El potencial de dichos picos es más negativo cuando el pH de la disolución aumenta, lo que es coincidente con una relajación o descenso de la helice- $\alpha$  (estructura ordenada) de las proteínas. El pico a potenciales más positivos (  $-0.46$  V relativo al electrodo Ag/AgCl N a pH 7.4 ) tiende a desaparecer después de barridos cíclicos de potencial, en tanto que el que aparece a  $-0.62$  V se potencia. La adición de  $Mg^{+2}$  o  $Ca^{+2}$  no presenta un efecto significativo sobre el potencial, aunque se observa una reducción en su amplitud. La proteína kinasa-C penetra las monocapas de lípidos en alguna extensión; dicha penetración se ve mejorada con la adición de diacilglicerol o forbol; dichos compuestos estabilizan la conformación superficial de la proteína desestabilizando la monocapa a potenciales más positivos, lo que origina un aumento del pico a  $-0.42$  V , este fenómeno no se ve afectado por los iones  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ . La región de la PKC que penetra la monocapa contiene grupos cisteína y aminos primarias. Adicionalmente los estudios polarográficos sugieren que la PKC se asocia y penetra la monocapa independientemente de la presencia de cationes divalentes.

Tanto la alameticina como la melitina y la proteína C-kinasa perturban la estructura de la monocapa lipídica haciéndola mas permeable a agentes redox iónicos (Miller, I.R, L. Doll, D.S. Lester, 1992), tal y como evidencian los picos pseudocapacitivos; sin embargo, no se forman canales en el interior de la monocapa.

### **II.3.2. Contribución de A. Nelson.**

Los estudios acerca de monocapas de fosfolípidos sobre superficies de mercurio se desarrollaron originalmente en Israel por el equipo del Prof. Miller, en principio sobre electrodos de gota de mercurio (Miller, I.R., Rishpon y A. Tenenbaum, 1976) sobre los cuales se producía una transferencia continua de la monocapa desde la interfase aire-agua al electrodo de mercurio. El Dr. A. Nelson del Plymouth Marine Laboratory (Nelson y Benton, 1986) modificó el sistema anterior de forma que obtuvo monocapas estables de fosfolípidos adsorbidos sobre la superficie de mercurio, utilizando un electrodo de gota

pendiente. Además, estudia en detalle la formación y propiedades de dichas monocapas usando métodos electroquímicos. Para tal fin emplea diferentes tipos de lípidos fosfatidilcolina (PC) bovina y de yema de huevo y dioleilfosfatidilcolina (DOPC), fosfatidiletanolamina (PE) bovina y de yema de huevo y bacteriana para los cuales analiza las condiciones idóneas de formación y reproducibilidad, caracterizándolos mediante medidas de capacidad diferencial y voltametría cíclica. Barridos sucesivos de potencial sobre la misma monocapa pueden dar lugar a cambios que permiten identificar grados de recubrimiento inferiores o superiores al óptimo.

En este primer trabajo de 1986, Nelson y Benton estudian también el comportamiento faradaico del Cd (II) y del Zn(II) a través del electrodo del mercurio recubierto con la capa lipídica. Se observa que la monocapa es impermeable a estos iones hasta la zona de picos de reorientación por encima de  $-0.7$  V y también en la zona de potenciales más positivos que  $-0.1$  V.

En el caso del Cd se observa un desplazamiento del pico de reducción a potenciales que coinciden con los picos capacitivos; como consecuencia de ello el proceso se hace irreversible. En el caso del Zn(II) el pico no se desplaza ya que éste, sobre el electrodo sin modificar, aparece a potenciales más negativos que el correspondiente a los picos de reorientación.

Nelson, A. y Benton (1987) también han estudiado la capacidad de penetración de hidrocarburos aromáticos polinucleados (PAH) a través de monocapas de fosfolípidos de DOPC depositadas sobre un electrodo de mercurio. La penetración de los PAH produce modificaciones en la curva de la capacidad diferencial ( $C_d$ ); principalmente, un desplazamiento de los picos de reorientación catódica hacia potenciales más negativos y la disminución del valor del mínimo de la  $C_d$  y del potencial de carga cero, sin embargo no afecta al pico a  $-1.25$  V.

La penetración se produce en la zona del mínimo de potencial dando lugar a una estabilización de la monocapa, la cual se manifiesta en un alargamiento de la región del mínimo con el consiguiente desplazamiento de la zona de picos de reorientación hacia potenciales más negativos. Se produce, así, una disminución de la energía libre de Gibbs que actúa como fuerza conductora para la penetración de la membrana. Esta contribución a la energía libre de Gibbs entre el PAH y la monocapa de lípidos sobre el mercurio se debe

a diferencias de solubilidad relativa del hidrocarburo entre el lípido y el agua, y a la interacción de los electrones  $\pi$  del PAH con el electrodo. Este último efecto se comprueba porque el desplazamiento en el pzc y en el pico catódico provocado por los PAH es mayor cuanto mayor es el número de anillos aromáticos que contiene el mismo.

También se estudió la expulsión de los PAH que habían penetrado en la membrana para lo cual se transfirió el electrodo a una solución que contenía únicamente el electrolito soporte. El perfil de la curva de capacidad diferencial de la monocapa en función del potencial después de la expulsión de PAH es, habitualmente, muy similar al del líquido puro excepto por una pequeña cantidad residual de PAH, lo cual demuestra que la penetración de PAH no provoca una modificación importante de la estructura de la membrana.

El hecho de que la respuesta esté relacionada cuantitativamente con la concentración de PAH en disolución permite aplicar los electrodos recubiertos de DOPC para la determinación de PAH y, dado que el desplazamiento de los picos catódicos depende del número de anillos aromáticos, se pueden aplicar estas medidas a la especiación de PAH en soluciones acuosas. Este sistema analítico se ha empleado satisfactoriamente para la determinación de PAH en agua de mar. (Nelson, Auffret, 1988c).

Nelson y Auffret (1988b) analizaron las características de una monocapa perfectamente formada de DOPC sobre una gota de mercurio. Para ello comenzaron estudiando las condiciones necesarias para alcanzar el recubrimiento completo añadiendo cantidades cada vez mayores de fosfolípidos sobre la superficie de la disolución electrolítica. Una vez recubierto el electrodo se registraba la curva  $C_d$  vs.  $V$  hasta obtener la máxima altura del primer pico reversible a  $-0.910\text{ V}$  ( $\approx 55\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) junto con un valor mínimo de la  $C_d$  a  $-0.4\text{ V}$ . Las características del pico capacitivo constituyen el criterio más sensible para identificar un recubrimiento completo, el cual se corresponde con una concentración superficial de fosfolípidos de  $3.2 \cdot 10^{-10}\text{ mol}/\text{cm}^2$  que representa un área de  $0.53\ \text{nm}^2$  por molécula.

Se ha estudiado el efecto del pH, temperatura y composición de la disolución sobre las propiedades de la monocapa de DOPC adsorbida sobre mercurio: una modificación de

## *Informe bibliográfico*

---

PH entre 8.1 y 1 provoca un desplazamiento hacia potenciales positivos del primer pico catódico (16 mV) y del pico a -1.25 V (100 mV); el segundo pico catódico se desplaza negativamente (36mV), mientras que el mínimo de  $C_d$  permanece inalterado.

La variación de temperatura entre 5 y 60 °C desplaza negativamente los dos picos catódicos en 17 y 56 mV para el primero y segundo, respectivamente, y positivamente en 61 mV el pico a -1.25V. La región del mínimo de capacidad no se ve afectada.

El descenso de la fuerza iónica en un factor de 10 ejerce un pequeño efecto sobre el valor del mínimo de  $C_d$  pero sí provoca una extensión de dicha región ya que los picos catódicos a -1.25V se desplazan negativamente en 40mV y la zona de  $C_d$  a potenciales positivos también se desplaza 40mV anódicamente. La dependencia de los picos capacitivos con la fuerza iónica del electrolito es debida parcialmente al enlace de los iones del electrolito con los grupos polares del fosfolípido, fundamentalmente con el grupo fosfato, y también a la caída de potencial en la capa difusa.

Para un valor dado del potencial a través de la capa de lípidos, el campo eléctrico es menor a fuerzas iónicas bajas, debido al potencial de la doble capa difusa. Dado que los picos capacitivos están relacionados con reorganizaciones superficiales inducidas por el campo eléctrico, los potenciales de los picos se desplazarán hacia potenciales positivos cuando se aumente la concentración del electrolito, de acuerdo con lo observado experimentalmente.

El efecto de la naturaleza de los electrolitos se puede resumir en las siguientes consideraciones:

- 1.- El primer pico capacitivo es sensible a la naturaleza del catión y a su concentración. Se han observado relaciones lineales del potencial de pico frente a  $\log[Ca^{+2}]$ .
- 2.- La zona de crecimiento de la  $C_d$  a potenciales positivos se ve claramente influenciada por la naturaleza del anión, siendo especialmente notable el desplazamiento hacia potenciales negativos en presencia de aniones que se adsorben fuertemente sobre mercurio.
- 3.- Los picos capacitivos se desplaza hacia potenciales positivos por la presencia de sales de amonio cuaternario.

El efecto de los iones mencionados sobre la monocapa se debe probablemente a enlaces con los grupos polares del fosfolípido y fundamentalmente a coadsorciones como consecuencia de la naturaleza hidrofóbica de estos iones, la cual favorece

su incorporación en el interior de la monocapa.

4.- El valor del mínimo capacitivo es independiente de la naturaleza del electrolito.

Se ha analizado el efecto de la presencia de colesterol en la monocapa de fosfolípidos, para lo cual se han preparado disoluciones de colesterol y fosfolípido que se han depositado sobre la disolución. La presencia del colesterol da lugar a un doble efecto:

1º. El mínimo de capacidad disminuye en proporción directa a la fracción molar de colesterol en la monocapa.

2º. Desaparecen los picos catódicos 1 y 2, y disminuye el valor de la  $C_d$  del pico a -1.5V.

La disminución de la  $C_d$  observada al incorporar el colesterol indica un engrosamiento de la capa adsorbida, posiblemente debido a la formación de un complejo colesterol-DOPC con una configuración de la cadena hidrocarbonada diferente de la que presenta la DOPC pura.

Nelson y Auffret (1988a) realizaron también el estudio de reacciones faradaicas a través de un electrodo recubierto por fosfolípidos y evidenciaron un comportamiento redox totalmente diferente del observado sobre un electrodo de mercurio puro.

Así, en la reducción de la antraquinona-2-sulfonato (aq-2-s), la cual sufre un proceso de adsorción débil irreversible sobre un electrodo puro de mercurio, en presencia de la monocapa de fosfolípidos, el proceso pasa a ser controlado por difusión. La capa lipídica permanece estable en la disolución del electrolito conteniendo la aq-2-s, no obstante, su presencia aumenta la capacidad del mínimo, indicando una cierta interacción con la capa lipídica. Estos cambios en la capacidad son completamente reversibles como se comprueba al transferir el electrodo a una disolución que contenga únicamente el electrolito soporte.

Al analizar el comportamiento de una mezcla de aq-2-s con Cd, se obtiene que el proceso que sufre la aq-2-s es el mismo que en ausencia de Cd, sin embargo, el Cd se reduce inmediatamente después del pico de la aq-2-s y también se observa su oxidación en el barrido anódico, contrariamente a lo que sucede cuando se estudia su comportamiento redox en ausencia de aq-2-s. El hecho de que la reducción y oxidación de Cd suceda en la región del mínimo de la  $C_d$  indica que el Cd es capaz de difundir en la monocapa en esta región de

### *Informe bibliográfico*

---

potencial. Esto implica que la aq-2-s facilita el transporte del Cd a través de la monocapa y por tanto ella misma es capaz de difundir dentro de dicha región de potencial.

Posteriormente Nelson y Leeuwen (1989b) se centraron en el estudio de la forma en que la complejación del Cd(II) afecta a su transporte a través de monocapas de DOPC adsorbidas sobre mercurio. Como agentes complejantes emplearon por una parte aminoácidos, los cuales forman complejos moderadamente fuertes, que son lábiles en la reducción electroquímica del Cd(II), y por otra parte agentes quelantes como el ácido nitrilotriacético (NTA) y el ácido atilendiaminotetracético (EDTA), que forman complejos fuertes con el Cd(II) que no son lábiles en las condiciones de reducción.

Los aminoácidos aumentan la barrera de activación para la penetración electrostática de iones en la monocapa. Esto supone un decrecimiento en la permeabilidad del Cd(II) a través de la monocapa como consecuencia de la disminución de la estabilidad del ion metálico hidratado. Un incremento en la estabilidad del ion metálico en la disolución aumenta la barrera de activación para la transferencia de la forma compleja a la especie hidratada dentro de la monocapa. Esta parece ser la etapa determinante de la transferencia metálica dentro de la monocapa y su efecto consiste en desplazar negativamente el potencial de reducción. Dichos autores proponen un orden de permeabilidad decreciente del Cd a través de la monocapa en diferentes disoluciones de aminoácidos, el cual está relacionado con su orden creciente de complejación. En el caso de la histidina que tiene un coeficiente de complejación muy alto, casi no hay contribución electrostática a la velocidad de transferencia, la penetración se produce únicamente por los procesos de reorientación en la monocapa.

Cuando los complejantes son el NTA y EDTA se produce la reducción cinética del ion Cd(II) hidratado a potenciales ligeramente más positivos que los correspondientes a los picos de reorientación, mientras que la reducción de los complejos Cd NTA y CdEDTAH<sup>+</sup> aparece inhibida; esto permite suponer que el Cd(II) se disocia de sus ligandos previamente, al pasar a través de la capa lípida, lo que puede deberse a que en medios de constante dieléctrica baja está favorecido energéticamente el que los poros contengan agua en vez de electrolitos, y que a potenciales muy negativos está desfavorecida la entrada de complejos cargados negativamente en un poro. Estos resultados pueden ser de interés en relación con la ecotoxicidad de metales trazas, dado que se ha comprobado que la forma hidratada del

ion metálico es la más tóxica para los organismos vivos.

Nelson y Leeuwen, (1989a), también investigaron el comportamiento electroquímico de Cd, Cu, Eu, Pb, Zn y V sobre electrodos de mercurio recubiertos de DOPC . Como se había observado en estudios anteriores, el proceso de reducción de los iones metálicos está inhibido en la región del mínimo de capacidad diferencial y se inicia precediendo al primer pico de reorientación catódica. La etapa limitante de la velocidad de reducción parece estar asociada con el transporte de los iones metálicos a través de la monocapa. En lo que se refiere a los efectos del electrodo, se observó que el comienzo de la reducción se desplaza a potenciales más negativos en presencia de reactivos que estabilicen el ion metálico en disolución. El pico de la reducción se hace mucho más agudo por el efecto de iones que compiten por la superficie de la monocapa como son el  $Mg^{+2}$  y el  $NH_4^+$ , lo que indica que hacen la monocapa más impermeable, mientras que se desplaza hacia potenciales positivos por iones que estabilicen el ion en la monocapa, como es el  $I^-$  y el  $Br^-$ , facilitando, así, su reducción.

El análisis logarítmico de la onda voltamétrica muestra una pendiente creciente a medida que el potencial se hace mas negativo para el caso de la reducción del Cd (II) , Eu (III), Pb (II) y V (III). La pendiente inicial corresponde a la penetración electrostática del ion en la monocapa, mientras que el incremento en la corriente a potenciales más negativos se debe a un aumento en la permeabilidad de la monocapa asociado con los procesos de reorientación. A partir del valor inicial de la pendiente se ha calculado un coeficiente de transferencia aparente,  $\alpha_a$  , el cual se asocia a una barrera de energía trapezoidal para la transferencia de los iones más permeables en la capa de fosfolípidos.

Leermakers y Nelson (1990) han tratado de modelizar la adsorción y autoorganización de moléculas de lípidos sobre interfases sólido-agua con el fin de obtener expresiones termodinámicas de las transiciones de fase observadas. Dado que se trata de aplicar a la interfase mercurio-agua, se ha asumido que la superficie de mercurio se comporta como un plano fijo, es decir, como un sólido.

Se ha prestado especial atención a los cambios estructurales en la capa adsorbida cuando se alteran las propiedades superficiales manteniendo constante la cantidad de lípidos

en la superficie. Para ello han empleado la aproximación de campo autoconsistente y se han introducido parámetros del tipo Flory-Huggins para dar cuenta de las interacciones entre las colas y cabezas del fosfolípido, el agua y la superficie metálica.

La aplicación de este modelo sencillo permite explicar la presencia de los picos de reorientación catódica obtenidos a potenciales más negativos que el pzc. Debido a una modificación del potencial con respecto al pzc, la interfase mercurio-agua se hace menos hidrofóbica, lo que provoca un cambio en la energía de interacción entre la superficie metálica y los diferentes componentes del fosfolípido. Como resultado se produce el proceso de reorientación sobre la superficie, el cual también depende grandemente de la naturaleza del lípido adsorbido.

Para el caso de grupos de cabeza con una afinidad superficial alta, el modelo predice dos transiciones. La primera de ellas se origina debido a un desplazamiento de las colas apolares por los grupos de cabeza a un potencial donde las colas aún mantienen una afinidad superficial alta en comparación con el agua, dando lugar a una capa adsorbida no homogénea. Este cambio de una monocapa homogénea compacta a una capa no homogénea da lugar a un cambio capacitivo agudo en el electrodo recubierto de lípidos, es decir, a un pico en la curva  $C_d$  vs  $V$ .

A potenciales más negativos, la afinidad superficial de las colas es superada por la de las moléculas de agua generándose una competencia por la superficie de mercurio. La capa sufre un segundo cambio y se origina una nueva estructura con parte de la superficie libre de lípidos, coexistiendo con una bicapa adsorbida.

En el caso de grupos de cabeza con una afinidad superficial baja, las dos transiciones de fase coinciden, observándose un único pico. A potenciales muy negativos se produce una desorción total de la capa lipídica. Esto sucede cuando la afinidad de las moléculas de agua por la superficie es superior a la de los grupos de cabeza.

Nelson y Leermakers (1990) dan una explicación mecanística para los cambios capacitivos que aparecen en las monocapas de lípidos en la interfase mercurio-agua por aplicación de la teoría desarrollada previamente. Para ello seleccionan fosfolípidos con tres grupos polares diferentes (PC, PE y PS), dado que la primera transición de fase está relacionada con la afinidad del grupo polar por la superficie de mercurio. También analizan

el efecto de cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud, grado de saturación y fluidez, así como la influencia sobre la capacidad diferencial de grados de recubrimiento de fosfolípidos diferentes del necesario para obtener una monocapa compacta.

Sobre monocapas de PC comprueban que un incremento de la longitud de la cadena y, por tanto, de la hidrofobicidad, provoca un desplazamiento de la primera y segunda transiciones hacia potenciales más negativos. Asimismo, un número mayor de insaturaciones en la cadena origina el mismo efecto. Las insaturaciones de las cadenas lipídicas facilitan la interacción electrónica entre los electrones de los dobles enlaces y los del metal. El aumento de fluidez de los lípidos provoca que el número de contactos entre las cadenas y la superficie sea superior. Por ello, estas propiedades desplazan negativamente los picos capacitivos ya que dificultan la competición de las cabezas polares por acceder a la interfase.

En relación con la transición de fase a potenciales positivos respecto al pzc, ha llegado a observarse un pico de reorientación en lípidos con una cadena muy poco hidrofóbica como es el caso del dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

En lo relativo a la variación de los grupos polares, se ha observado que la PS presenta los dos picos coincidentes y desplazados, al igual que la PE, a potenciales más negativos que los de la PC. Esto implica que la PC y la PE manifiestan mayor afinidad superficial que la PS.

Las experiencias con modificación del grado de recubrimiento aportan una confirmación adicional del modelo teórico propuesto para la explicación de las dos transiciones de fase a potenciales negativos. Según este modelo, el primer pico capacitivo representa una competición entre las cabezas y las colas del fosfolípido para acceder a la interfase, dando lugar a una transformación de la monocapa en dos fases delgadas: una bicapa y una monocapa. El segundo pico capacitivo, asociado a la desorción de las colas de la interfase, representa la transición a una bicapa que cubre la mitad del electrodo, es decir, la formación de una bicapa porosa.

Para grados de recubrimiento superiores a la unidad, el segundo pico capacitivo decrece ya que, en la primera transición de fase, el exceso de lípido permite la formación de una mayor cantidad de una fase más gruesa y es menor el número de colas que permanecen en contacto con el mercurio, y, el segundo pico capacitivo, que representa la desorción de dichas colas, se hace insignificante. Además, el primer pico capacitivo aparece

a potenciales menos negativos como predice el modelo teórico.

Para grados de recubrimiento inferiores a la unidad, la situación se invierte y será el segundo pico el que resulte más significativo.

Nelson, Auffret y Borlakoglu (1990) han estudiado el mecanismo de interacción de compuestos orgánicos hidrofóbicos con membranas biológicas ya que éste es un factor importante en su actividad biológica. Por ello, han considerado cuatro grupos de compuestos: los hidrocarburos aromáticos polinucleados (PAH), los bifenilos policlorados (PCB), pesticidas neurotóxicos y fenotiazinas.

Como se indicó previamente, las especies que aumentan la hidrofiliidad de las cabezas o la hidrofobicidad de las colas, desplazan los picos capacitivos hacia potenciales más negativos. Este es el caso de los PAH y los PCB planos poco sustituidos, cuya interacción es debida a su penetración en el interior de la región hidrocarbonada de la capa lipídica con el consiguiente aumento de insaturación e hidrofobicidad.

Se constata que la planaridad de los compuestos aromáticos facilita su penetración, como se refleja en el caso de los PCB, los cuales dan lugar a una supresión creciente de los picos capacitivos a medida que aumenta su carácter globular. Para el PCB globular más fuertemente sustituido y, especialmente con el DDT, se observa una depresión completa de ambos picos. La mayor supresión y ensanchamiento de los picos refleja un desmoronamiento creciente de las propiedades autoorganizativas, así como, de la permeabilidad y fluidez, efectos previamente observados con la incorporación de colesterol.

Las fenotiazinas catiónicas y el DDT muestran un efecto distinto al de PAH y PCB, ya que provocan un desplazamiento del primer pico capacitivo hacia potenciales positivos, lo cual está relacionado con un aumento de la hidrofobicidad de los grupos polares del fosfolípido ( DOPC ). Esto se puede explicar suponiendo que el grupo tricíclico, idéntico para todas las fenotiazinas estudiadas, penetra en la región de las colas hidrocarbonadas, mientras que su grupo sustituyente permanece en la fase polar.

Por otra parte, se ha encontrado una correlación directa entre la actividad de las fenotiazinas en las membranas biológicas y sus efectos sobre las monocapas. Estos resultados establecen que las monocapas de fosfolípidos adsorbidos sobre mercurio constituyen un modelo de membrana relevante para el estado de la actividad de compuestos orgánicos sobre

membranas biológicas.

A. Nelson (1991a) ha realizado una modificación del electrodo cubierto de DOPC consistente en incorporar Gramicidina A, la cual es una sustancia capaz de formar canales a través de la monocapa. Estos canales están formados por monómeros en oposición a lo que sucede en bicapas, donde se encuentran como dímeros.

Este investigador comprueba que la gramicidina no ejerce un efecto significativo sobre el mínimo de capacidad diferencial y sobre los picos capacitivos reversibles de la curva  $C_d$  versus potencial de la DOPC. Esto indica que la gramicidina no actúa incrementando la permeabilidad mediante degradación de la monocapa sino que tiene un mecanismo de actuación específica. En concordancia con lo anterior, se encontró que los canales son permeables selectivamente al Tl (I) mientras que no lo son al Cd (II). También estudió el transporte de Tl (I) a través de los canales de gramicidina empleando la voltametría cíclica y analiza el efecto de la composición del electrodo y el grado de recubrimiento de gramicidina.

El Tl (I) presenta una onda de tipo cinético en presencia de gramicidina, mientras que sobre un electrodo sin recubrir es de tipo difusivo. Dicha onda aparece incrementada en presencia de Mg (II) con respecto a lo que se observa con K (I). Esto puede ser debido a que el Tl (I) debe reemplazar al K (I) que reside en el interior del canal, mientras que el magnesio no puede penetrar en el canal, facilitando así la penetración del Tl (I).

También se analizó el efecto de agentes complejantes, comprobando así que la onda es menor en presencia de cloruro que de nitrato debido a la formación de clorocomplejos que no pueden penetrar por el conducto, lo que confirma que el Tl (I) penetra en su forma hidratada. El efecto es más drástico en presencia de fosfato y pirofosfato, que provocan la desaparición de la onda del Tl (I).

En otro trabajo publicado el mismo año, A. Nelson (1991b), estudia el efecto del ionóforo carboxílico A 23187 sobre la permeabilidad de iones metálicos pesados a través de monocapas de fosfolípidos empleando voltametría cíclica. El ionóforo A 23187 es un transportador móvil de iones divalentes que actúa como ligando tridentado enlazándose al ion metálico. El sistema transportador móvil en una membrana presenta dos conformaciones A y B con dos barreras de potencial a ambos lados de la membrana. En el estado A el transportador tiene acceso a la interfase izquierda y la barrera cinética del lado derecho es

muy alta. En el estado B el transportador tiene acceso a la interfase derecha y la barrera izquierda es la que es muy alta. El ionóforo se encuentra inicialmente en el estado A con el acceso iónico hacia la solución. A un potencial crítico el complejo ionóforo - ion metálico induce un cambio conformacional de modo que se reduce la barrera próxima al electrodo. Este cambio conformacional es selectivo para un ion particular y no ocurre en su ausencia. Esta propiedad tiene dos consecuencias importantes para el transporte iónico: primero, que la velocidad de cambio conformacional en el interior de la monocapa está directamente relacionada con la velocidad de entrada del ion en el sistema ionóforo y, segundo, que una vez que la reorientación ha comenzado por un cambio de potencial, continúa en un proceso cíclico. Este proceso está forzado por el gradiente de concentración del ion metálico entre la solución y el electrodo, el cual se mantiene por la reducción continuada del ion metálico en la superficie del electrodo. Una vez que el ion ha sido abandonado sobre la superficie del electrodo, el ionóforo revierte a su conformación original, enlaza otro ion de la solución y se repite el proceso cíclico. Como resultado de este mecanismo, el transporte producido por el ionóforo tiene lugar en una única dirección y dentro de una zona de potencial concreto.

Si el cambio conformacional es muy rápido, el transporte iónico puede considerarse un caso límite de transporte por formación de canales.

Esta es la situación observada en el caso del Cd (II), donde el cambio conformacional no constituye la etapa limitante y las curvas voltamétricas presentan el aspecto de un transporte por formación de canales iniciado a un potencial crítico.

Algunas especies impiden el transporte del Cd (II), bien por competición por los puestos de complejación del ionóforo ( $H^+$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $La^{+3}$ ) o bien estabilizando el ion en solución (cloruro, acetato, glicinato).

En el caso del cobre, Cu (II), el transporte iónico a través del sistema ionóforo es lento, resultando ser la etapa limitante del proceso. Esta es la razón de la desaparición del pico de reducción del Cu (II) en presencia de especies fuertemente interaccionantes y de altas velocidades de barrido.

En ambos casos la oxidación del metal y su transporte desde el electrodo hacia la solución se encuentran inhibidos.

El modelo de membrana constituido por un electrodo de mercurio recubierto de fosfolípido también ha sido empleado por A. Nelson (1992) para estudiar por voltametría

cíclica, el comportamiento redox y de transferencia protónica del retinal dada su gran importancia en procesos fisiológicos.

Para ello se ha incorporado trans-retinal, 13-cis y 9-cis retinal a monocapas de DOPC, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina de huevo, fosfatidilserina y a monocapas formadas por mezclas de DOPC y fosfatidiletanolamina de huevo, los cuales estaban adsorbidos sobre mercurio.

Se observó que el retinal se reduce irreversiblemente a través de las monocapas de fosfolípidos, mientras que el retinol y el ácido retinoico son totalmente inactivos. A pHs superiores a 5, el retinal forma asociaciones con PS y PE cuando se incorpora a monocapas de PS y de ( 4 DOPC + PE ) respectivamente. Este producto de asociación se reduce a potenciales más positivos que el retinal en DOPC. La reducción de esta asociación es más significativa a medida que aumenta el pH de la solución y a  $\text{pH} > 9$  se produce sucesivamente en barridos de potencial consecutivos hasta que todo el retinal ha formado el producto. Esta reducción constituye un proceso bielectrónico donde la etapa determinante es la transferencia electrónica del segundo electrón, la cual está precedida por una protonación.

En monocapas de DOPC, la transferencia protónica constituye la etapa limitante a altas velocidades de barrido y este efecto limitante se puede mitigar reduciendo el grado de recubrimiento de la monocapa, la cual la hace más permeable a las especies de transferencia protónica.

Recientemente A. Nelson (1993a) ha empleado la voltametría cíclica para estudiar el transporte de Tl (I) a través de monocapas de DOPC-gramicidina y PS-gramicidina.

La permeabilidad de Tl (I) en dichas capas adsorbidas sobre mercurio depende en gran medida del tipo de lípido, del pH, carga del electrolito, concentración y relación carga-tamaño del catión del electrolito. Así se ha observado que las monocapas de PS-gramicidina cargadas negativamente son alrededor de nueve veces más permeables al Tl (I) que las monocapas zwitteriónicas de gramicidina. La sustitución de los cationes monovalentes del electrolito por cationes divalentes y la presencia de pequeñas concentraciones de cationes trivalentes en el electrolito reducen la permeabilidad de las monocapas de DOPC-gramicidina y, en mucha mayor medida, la de PS-gramicidina.

Cuando el pH de la solución se aproxima al valor del  $\text{pK}_a$  intrínseco de la PS (3.6),

la permeabilidad de la capa de PS-gramicidina desciende hasta un valor ligeramente superior al de la monocapa de DOPC-gramicidina.

Una disminución análoga se observó en el caso de la DOPC-gramicidina cuando el pH próximo es inferior al de su  $pK_a$  intrínseco (2.25).

El efecto de la carga de la monocapa sobre el transporte iónico es debido a que el flujo de TI (I) a través del conducto de gramicidina depende de su concentración en la boca del conducto, la cual, a su vez, depende del potencial superficial de la monocapa. Los cationes del electrolito pueden apantallar el potencial superficial de la monocapa de formas diversas dependiendo de su concentración, carga y relación carga-tamaño, disminuyendo la concentración del ion permeable en la superficie. Por el contrario, los fosfolípidos con grupos polares cargados negativamente aumentan el potencial superficial de la monocapa, de forma que se atrae el ion permeable y se aumenta su concentración en la superficie del lípido. Los iones divalentes y trivalentes se adsorben sobre la PS de forma que neutralizan parcialmente su carga y, por tanto, disminuyen el potencial. La protonación de PS y DOPC comienza a valores de pH alrededor de dos unidades por encima del  $pK_a$  intrínseco del lípido, disminuyendo o invirtiendo el potencial superficial. Estos dos últimos efectos provocan una disminución de la concentración de TI (I) en la boca del conducto y, consecuentemente, de la permeabilidad.

A. Nelson (1993b) también ha estudiado mediante voltametría cíclica el comportamiento electroquímico de los iones metálicos de Tl, Cd, Cu, Pb y Eu sobre electrodos de mercurio recubiertos de una monocapa de fosfolípidos cargados negativamente (PS). El comportamiento voltamétrico de dichos iones está relacionado con la permeabilidad del ion electroactivo en la capa lipídica y a sus interacciones con el electrolito y la superficie lipídica. Sobre este tipo de fosfolípidos (PS) se obtienen picos de reducción del ion metálico dentro de la región de potencial donde el lípido mantiene su orientación estable sobre el electrodo, por lo cual se observa que los iones mencionados son más permeables en el film de PS que en DOPC. A  $pH > 5$  los picos de reducción  $Cd^{II}$ ,  $Cu^{II}$  y  $Eu^{II}$  son característicos de una reducción irreversible de especies electroactivas adsorbidas mientras que los de  $Tl^I$  y  $Pb^{II}$  representa reducciones quasi-reversible e irreversible, respectivamente, de especies disueltas. Todos ellos muestran una disminución de la intensidad del pico de reducción al

disminuir el pH. En el caso del TI se observa una supresión del pico al aumentar la concentración de electrolitos univalente o la presencia de electrolitos univalentes que muestran gran afinidad por enlazarse con la PS. Cuando se alcanzan valores de pH próximos al segundo  $pK_a$  de la PS (3.6) o en presencia de  $Mg^{+2}$  o pequeñas concentraciones de  $La^{+3}$ , los voltamogramas de todos los iones adquieren una gran similitud con los obtenidos en DOPC, indicando, así, que el film ha aumentado su impermeabilidad.

El efecto del pH de la disolución está directamente relacionado con la protonación de la PS y la disminución del potencial superficial de la monocapa. Esto hace disminuir la interacción electrostática de iones electroactivos con la superficie del film, disminuyendo su concentración en esta región y su permeabilidad. Asimismo, también se altera la estructura del lípido. La influencia de la concentración y el tipo de iones monovalentes sobre la voltametría del TI<sup>1</sup> se debe a un efecto de apantallamiento del potencial de la monocapa y a la formación de enlaces de los iones con el lípido, lo que disminuye la concentración de TI<sup>1</sup> adyacente a la superficie del lípido. El  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+3}$  también se enlazan fuertemente al lípido con lo que disminuyen la concentración superficial de especie activa y alteran la estructura del mismo.

### **II.3.3. Contribución de R. Guidelli.**

Recientemente Guidelli y col. (Moncelli y Guidelli, 1992) han perfeccionado el dispositivo experimental utilizado por Nelson y Miller y han llevado a cabo el primer test sobre la validez de la teoría de Gouy y Chapman en la interfase existente entre una monocapa de fosfolípido neutro (DOPC) en contacto con una disolución electrolítica a partir de medidas de capacidad diferencial. Empleando voltametría ac con resolución de fase determinaron la variación en la capacidad diferencial de la interfase como consecuencia de un incremento en la concentración electrolítica del medio. Mediante representaciones del inverso de la capacidad diferencial experimental a diferentes concentraciones de electrolito, frente al inverso de la capacidad diferencial de la capa difusa (representación de Parsons-Zobel) estimada a partir de la teoría de Gouy-Chapman, y teniendo en cuenta que el potencial superficial vendrá afectado por la interacción de los cationes del electrolito con el grupo fosfato del fosfolípido, estos autores concluyeron que la teoría de Gouy-Chapman se puede aplicar satisfactoriamente a monocapas de PC. Dichas medidas pueden aportar, además,

### *Informe bibliográfico*

---

información acerca de la estructura de las interfases formadas por un fosfolípido neutro o ligeramente cargado en presencia de una disolución electrolítica.

Aplicando un tratamiento similar, han determinado las constantes de protonación intrínsecas del grupo fosfato de la PC y PE y de los grupos fosfato y carboxilo de la PS cuando los fosfolípidos se encuentran depositados en monocapas autoorganizadas sobre un electrodo de gota pendiente de mercurio (Moncelli y col., 1994a). En el caso de la PS, observaron que la densidad de carga de las cabezas polares variaba desde un valor ligeramente positivo a valores ligeramente negativos a medida que el pH se incrementaba desde 3 hasta 7.5; asimismo, obtuvieron una variación importante del pK del grupo fosfato cuando este fosfolípido se halla en monocapas mixtas formadas por PS+PC. Este efecto se ha explicado suponiendo cambios conformacionales de los tres grupos ionizables presentes en la cabeza polar de la PS. Recientemente han ampliado este estudio al caso del ácido fosfatídico (Moncelli y col., 1994c)

### **III. Parte experimental**

### **III. Parte experimental**

Para la obtención de los resultados que se presentan en esta memoria fue necesario la puesta a punto y perfeccionamiento de una técnica de transferencia de monocapas de lípidos ya usada por Nelson, Miller y Guidelli, de la cual no se disponía en este laboratorio, donde se ha adaptado para hacerla compatible con la alta precisión de las medidas requeridas.

#### **III.1. Reactivos.**

Mercurio: Merck suprapur, bidestilado después de lavarlo con hidróxido de sodio y ácido nítrico.

Sales: Todas productos para análisis Merck. KCl (tratado en mufla a 500°C para eliminar eventuales impurezas orgánicas),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , NaOH,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

HCl Merck suprapur.

L-Cisteína: producto para usos bioquímicos Merck.

L-Cistina: producto Sigma, grado sigma.

Cloruro de tetrafenilfosfonio Merck para síntesis y tetrafenilborato de sodio Merck para análisis.

Dioleilfosfatidilcolina grado de pureza 1 y dioleilfosfatidilserina en forma de sal monosódica, Lipid Products (South Nutfield, Surrey, England). Disoluciones conteniendo 100mg de producto en 5ml de solución de cloroformo y metanol. A partir de estas disoluciones comerciales se preparó otra diluida en pentano en las siguientes proporciones: 50 $\mu$ l de disolución comercial y 1ml de pentano. Las disoluciones se conservaron a -20°C.

Todas las medidas se realizaron en soluciones acuosas de KCl 0.1M a  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Los valores de pH deseados se obtuvieron con HCl Merck suprapur en el intervalo de pH de 2 a 5, con el sistema tampón  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ; para el intervalo de 5 a 8.5 y con el sistema tampón  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaOH}$  en el intervalo 8.5 a 9.

#### **III.2. Aparatos y procedimiento experimental.**

**Célula.** La célula electroquímica (fig III.1) empleada consta de cinco conos esmerilados que permiten la introducción de los siguientes dispositivos:

a.- Los tres electrodos característicos de la técnica potenciostática:

- Electrodo de trabajo de gota pendiente de mercurio. Dado que es necesario

subir y bajar este electrodo a través de la superficie de la disolución para realizar la transferencia de la monocapa desde la superficie de la disolución electrolítica a la superficie del mercurio, se ha dispuesto para ello el cono central de la celda en el cual se ha introducido un tapón de goma en forma de émbolo con un agujero central de las dimensiones del capilar. Este dispositivo permite proteger el capilar de golpes o tensiones a la vez que deja el mínimo espacio disponible para la entrada del oxígeno atmosférico. El oxígeno puede ser extremadamente perjudicial para la integridad de la monocapa puesto que los fosfolípidos se oxidan fácilmente.

- Electrodo auxiliar, constituido por un hilo espiral de platino soldado a un soporte de vidrio esmerilado.

- Electrodo de referencia, se ha empleado un electrodo de calomelanos saturado (ECS), el cual, de cada vez, se ponía en contacto con una disolución de composición igual a la presente inicialmente en la celda y en contacto con la propia solución de la celda a través de un tabique poroso.

b.- Un desaireador de dos vías que permite burbujear el gas inerte (Argon I.P. 99.9990, Rivoira; Nitrógeno 99.9995, Carbueros Metálicos) alternativamente dentro y por encima de la disolución, respectivamente antes y durante la realización de las medidas.

c.- La aguja de la microjeringa con la cual se añade el fosfolípido a la interfase disolución/gas inerte y, alternativamente, la aguja de la microjeringa con la cual se añade la disolución de la especie bajo estudio. La jeringa se inserta en un soporte móvil que permite desplazarla de forma controlada y así situarla justo sobre la superficie de la disolución y extraerla después de la adición.

Todo este sistema se ha introducido dentro de una caja de metacrilato con doble pared que permite la termostatación por circulación de agua y dispone de las entradas pertinentes para la conexión de los electrodos con el exterior. En su interior se encuentra el soporte para la celda con un dispositivo de agitación magnética. La temperatura del líquido en circulación se ha mantenido en todas las experiencias a  $25.0^{\circ} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  mediante un termocriostato Haake D8-G o un Selecta Frigiterm 6000382..

**Electrodo de trabajo.** Se ha empleado un electrodo de gota pendiente de mercurio. El avance del mercurio en el capilar se realiza gracias al avance de un pistón que comprime el mercurio contenido en un pequeño depósito situado en la cabeza del capilar. Desde un

### Parte experimental

punto de vista cuantitativo se ha conseguido conocer con gran precisión la cantidad de mercurio que sale del capilar y, por tanto, la dimensión de la gota mediante el uso de un tornillo micrométrico dotado de una pequeña ventana digital con las siguientes características: tornillo micrométrico Mitutoyo serie Digimatic número 350-541, campo de medida 0-25 mm, precisión 2  $\mu\text{m}$ , diámetro del tambor 18 mm. Esto permite conseguir una gran reproducibilidad de gota a gota.

#### Calibrado del electrodo.

Con tal fin, se ha hecho avanzar el tornillo micrométrico en una cantidad conocida y se ha pesado el mercurio goteado. De esta forma se obtiene una serie de parejas de datos que se pueden tratar teniendo en cuenta las siguientes relaciones:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{P}{d} \quad (1)$$

$$r = \left( \frac{3P}{4\pi d} \right)^{1/3} \quad (2)$$

$$A = 4\pi r^2 = 4\pi \left( \frac{3P}{4\pi d} \right)^{2/3} \quad (3)$$

a partir de las cuales se obtiene

$$A^{3/2} = 6 \frac{\pi^{1/2} P}{d} \quad (4)$$

donde  $r$  representa el radio de la gota de mercurio en centímetros,  $V$  el volumen de la gota en  $\text{cm}^3$ ,  $P$  el peso de mercurio en gramos,  $d$  la densidad del mercurio a  $25.0^\circ\text{C}$  y  $A$  el área de la gota en  $\text{cm}^2$ .

De los datos obtenidos se puede obtener una recta de calibrado del tipo

$$A^{3/2} = a \cdot x \quad (5)$$

donde  $x$  representa la magnitud de avance del tornillo micrométrico.

Los capilares empleados fueron Metrohm n° 6.1209.010.

### III.3. Silanización del capilar.

En la siguiente descripción del proceso se tiene en cuenta que la silanización se deteriora en el tiempo por lo que debe ser periódicamente repetida después de un tratamiento adecuado del capilar.

El tratamiento del capilar debe, por tanto, comenzar con la eliminación de la silanización vieja. Para esto se elimina el mercurio residual lavando con ácido nítrico y enjuagando con abundante agua. Se mantiene el capilar inmerso en una disolución alcohólica de hidróxido de sodio 1M. A continuación, se lava con ácido clorhídrico 0.1M y se enjuaga con agua y posteriormente etanol. Se deja secar en estufa a la temperatura de 140-150°C durante dos horas. Una vez enfriado comienza el proceso propio de silanización.

Se emplea una disolución de dimetildiclorosilano (DMS) al 5% en tolueno, el cual debe manejarse con mucha atención dado que es venenoso. Se debe prestar especial cuidado a evitar que entre en contacto con trazas de agua, lo que provocaría la polimerización inmediata. El DMS asciende por capilaridad simplemente sumergiendo la punta del capilar en un tubo de ensayo que contenga 1 o 2 cm de disolución de DMS en tolueno. A continuación se lava el DMS en exceso con mucho tolueno y se deja secar en la estufa durante dos horas a la temperatura de 140-150°C. Si la operación se ha efectuado correctamente, una vez lleno el electrodo, el mercurio asciende por el capilar un máximo de 1 o 2 mm después de la caída de una gota.

Para garantizar la limpieza del capilar, después de cada medida en presencia de fosfolípidos se ha lavado la punta del mismo con etanol y abundante agua.

La inmersión y emersión del electrodo se ha hecho posible mediante un soporte rígido situado detrás de la caja de termostatación provisto de un anillo en el cual se introduce el electrodo. La bajada del anillo se regula mediante un dispositivo de aire comprimido cuya presión depende de la de una bomba de aceite indicada en un manómetro situado junto a la cámara de termostatación y regulable manualmente. Este sistema permite, además, el control, mediante un tornillo, del flujo de aceite en la bomba y, por tanto, la velocidad de bajada del pistón. Dicho control se ha comprobado que es importante para conseguir una mejor transferencia de la monocapa. La característica más importante de este sistema oleoneumático es la total ausencia de vibraciones que permite bajar el electrodo a la velocidad adecuada sin

provocar la caída de la gota.

Dado que en ocasiones se ha realizado una serie de medidas sobre la misma gota, se ha verificado, a priori, la capacidad del electrodo para mantener el área constante. De hecho, una variación del área, aunque fuese pequeña, podría alterar significativamente las medidas de capacidad diferencial. La comprobación del mantenimiento del área se ha realizado verificando la reproducibilidad de las curvas de capacidad diferencial en el electrolito soporte. Se ha operado de la siguiente forma:

- comprobación de la reproducibilidad por barridos sucesivos del potencial E sobre la misma gota.
- comprobación mediante registros sobre la misma gota pero a intervalos de tiempo cada vez mayores.
- comprobación mediante registros sobre gotas diferentes pero de la misma dimensión.

Todas estas pruebas sólo se han podido realizar una vez garantizada la limpieza perfecta de la disolución, dado que esta técnica es muy sensible a cualquier tipo de impurezas que se puedan adsorber sobre la gota de mercurio.

#### **III.4. Limpieza del material de vidrio.**

Dado el efecto crítico de la presencia de impurezas en la disolución, la limpieza del material de vidrio y la puesta a punto de un método de lavado adecuado representa un aspecto fundamental para la obtención de medidas fiables.

Después del uso, el procedimiento de lavado será el siguiente:

- a.- Tratamiento con mezcla crómica caliente de todas las partes que estén en contacto con el fosfolípido: celda, puente salino, desaireador, etc.
- b.- Lavado de todo el material con agua Milli-Q o agua destilada en una solución alcalina de permanganato de potasio, después de una primera destilación para desionizarla. En el trabajo desarrollado en la Universidad de Florencia se ha empleado agua mineral con un bajo contenido salino, la cual se sometía al proceso de destilación indicado. Fue necesario el uso de este tipo de agua porque ni el proceso de destilación, ni el sistema Milli-Q consiguieron eliminar los compuestos orgánicos clorados que se forman como subproducto de la cloración del agua.

c.- Después del lavado, todo el material de vidrio se ha secado en estufa a 150°C envuelto en papel de aluminio previamente tratado en la estufa a la misma temperatura.

### III.5. Medidas electroquímicas.

Las medidas de capacidad diferencial se realizaron empleando un polarógrafo Metrohm Herisau Polarecord E 506, con la técnica de voltametría AC sensible a la fase. El barrido de potencial, dentro de un intervalo de 1500 mV/ECS, se ha hecho partir de -102 mV/ECS en el caso del electrolito de soporte (fig. III.3) y de -400 mV/ECS en el caso de la monocapa (fig. III.4). Como es necesario en este tipo de técnica se ha sobreimpuesto al potencial de base una señal sinusoidal de 10 mV a la frecuencia de 75 Hz, se ha trabajado con un ángulo de desfase de 90°. Se mide la corriente que pasa en el circuito, la cual está compuesta de dos contribuciones, la componente en fase y la componente en cuadratura debidas a un término resistivo y capacitivo respectivamente. En nuestras medidas la contribución resistiva es despreciable por lo que se puede deducir directamente el valor de la capacidad a partir de la expresión de la corriente en cuadratura  $I_q$ .

$$C = \frac{I_q}{\omega V} \quad (6)$$

con  $V=10^{-2}$  V y  $\omega=2\pi f$ , donde f indica la frecuencia de 75 Hz.

Para la medida de la carga se ha empleado la técnica cronocoulombimétrica computerizada mediante un ordenador Model NOVA 4X de Data General. El ordenador controla las siguientes operaciones: aplicación del potencial deseado a la celda de medida mediante un potencióstato Amel 551, integración electrónica de la corriente y memorización de los datos. Las medidas cronocoulombimétricas consisten en una serie de etapas de potencial consecutivas de amplitud progresivamente creciente desde un valor inicial fijo  $E_i$  hasta diferentes valores finales E. Cada conjunto de series se realiza sobre la misma gota de mercurio recubierta de fosfolípido. El potencial inicial  $E_i$  se escogió suficientemente positivo (negativo) para evitar la adsorción de  $T\phi P^+$  ( $T\phi B^-$ ) directamente sobre la superficie de mercurio, permitiendo la adsorción iónica en la región de las cabezas polares bajo condiciones de equilibrio. Después de 100 ms a partir del salto  $E_i \rightarrow E$ , el potencial vuelve

al valor inicial  $E_i$  y se mantiene a este potencial durante 10 s, con el objetivo de restablecer las condiciones de equilibrio inicial. La corriente  $i(E,t)$  que fluye como consecuencia de cada etapa directa de salto de potencial  $E_i \rightarrow E$  se integra electrónicamente y la carga resultante  $Q(E,t)$  se almacena en la memoria del ordenador como una función del tiempo transcurrido desde el instante en que se produce el salto de potencial  $E_i \rightarrow E$  correspondiente.

Para asegurarnos de que se alcanza el equilibrio de adsorción de los iones lipofílicos en la región de las cabezas polares al potencial  $E_i$ , se mantiene la disolución bajo agitación suave durante tiempos variables  $\tau$  y se mide la carga  $Q(E,t)$  correspondiente. Para cada tiempo dado  $t$ , esta cantidad se encontró que aumentaba progresivamente con el tiempo de agitación  $\tau$ , alcanzando un valor límite para valores de  $\tau$  mayores que un cierto valor mínimo  $\tau_{\min}$ . Debido al control por transporte de masa de la adsorción iónica,  $\tau_{\min}$  decrece rápidamente al aumentar la concentración iónica masiva,  $c$ . Cada serie de medidas coulombimétricas a  $c$  constante se realizó después de agitar la solución a potencial  $E_i$  durante un tiempo superior al correspondiente  $\tau_{\min}$ . En el caso de la concentración más baja investigada,  $c=1 \cdot 10^{-7}$  M, se encontró un valor de  $\tau_{\min}$  de 4 min.

Para las medidas de voltametría cíclica se empleó el polarógrafo Metrohm E 506 conectado a un generador de señales triangulares VA-Scanner E 612 de Metrohm y los voltamogramas se registraron en un registrador Linseis LX 1600. Se trabajó en el intervalo de velocidades entre 0 y 600  $\text{mVs}^{-1}$ .

Las medidas del pH se realizaron antes y después de cada experiencia para lo que se empleó un pH-metro Crison micro pH 2000 conectado a un electrodo de vidrio combinado con un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Se ha verificado periódicamente el correcto funcionamiento del electrodo mediante disoluciones tampones de pH conocido.

### III.6. Caracterización de la monocapa

Las curvas de capacidad diferencias frente al potencial y las curvas voltamétricas obtenidas para la mayoría de los fosfolípidos se pueden dividir en cuatro regiones:

1. Una región comprendida entre  $\approx -0.25$  y  $-0.7$  V, la cual muestra un mínimo de  $C_d$  próximo a  $2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  que experimenta pequeñas variaciones dependientes del tipo de lípido. Esta región es impermeable a la mayor parte de los iones presentes habitualmente en las disoluciones, por lo que produce una inhibición de todo tipo de proceso faradaico iónico.

## *Parte experimental*

---

2. Zona de potencial comprendida entre  $-0.7$  V y  $-1.1$  V correspondiente a picos de reorientación catódicos. A potenciales negativos, a partir de la zona de capacidad plana, aparecen unos picos de geometría y número desigual dependiendo del tipo de fosfolípidos, los cuales no corresponden a un cambio de fase sino a un proceso de reorientación reversible de los lípidos sobre el mercurio. Este proceso favorece la permeabilidad de la membrana y permite que tengan lugar reacciones redox iónicas sobre el mercurio.

3. A potenciales inferiores a  $-0.2$  V se produce un incremento de la capacidad, probablemente también, asociado a reorientaciones de la membrana. La oxidación del mercurio a potenciales ligeramente más positivos hace imposible un estudio más profundo de esta región.

4. A potenciales más negativos de  $-1.1$  V aparece una región de capacidad alta y, entre  $-1.25$  y  $-1.30$  V, se observa un pico, el cual no corresponde a un proceso de reorientación de los lípidos sino que se considera asociado a un proceso irreversible de desorción de la bicapa lipídica debido a una competición de las moléculas de agua por la superficie del mercurio.

Se han analizado las características de una monocapa perfectamente formada de di-O-PC sobre una gota de mercurio (fig III.2). Para esto se comenzó estudiando las condiciones para obtener el grado de recubrimiento completo añadiendo cantidades cada vez mayores de fosfolípidos sobre la superficie de la disolución electrolítica. Una vez recubierto el electrodo se registraba la curva  $C_d$  vs. V hasta obtener la máxima altura del primer pico reversible a  $-0.910$  V ( $\approx 55 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) junto con un valor mínimo de la  $C_d$  a  $-0.4$  V (fig. III.4). Las características del pico capacitivo constituyen el criterio más sensible para identificar un recubrimiento completo.

La formación de una monocapa sencilla da lugar a una respuesta lineal de la capacidad diferencial del mínimo frente al área superficial de la gota modificada por expansiones de la misma. En caso de sobrerrecubrimiento la  $C_d$  no cambia al expandir la gota hasta llegar a la situación de monocapa.

La presencia de un grado de recubrimiento no uniforme se puede reconocer atendiendo a los siguientes criterios:

1.- La relación  $C_d$  vs. V aparece distorsionada en la región del mínimo de capacidad.

### *Parte experimental*

---

2.- Los picos de  $C_d$  aparecen deprimidos.

3.- La relación entre el mínimo de  $C_d$  y el área del electrodo no es lineal.

Para un valor dado del potencial a través de la capa de lípidos, el campo eléctrico es menor a fuerzas iónicas bajas, debido al potencial de la doble capa difusa. Dado que los picos capacitivos están relacionados con reorganizaciones superficiales inducidas por el campo eléctrico, los potenciales de los picos se desplazarán hacia potenciales positivos cuando se aumente la concentración del electrolito, de acuerdo con lo observado experimentalmente.

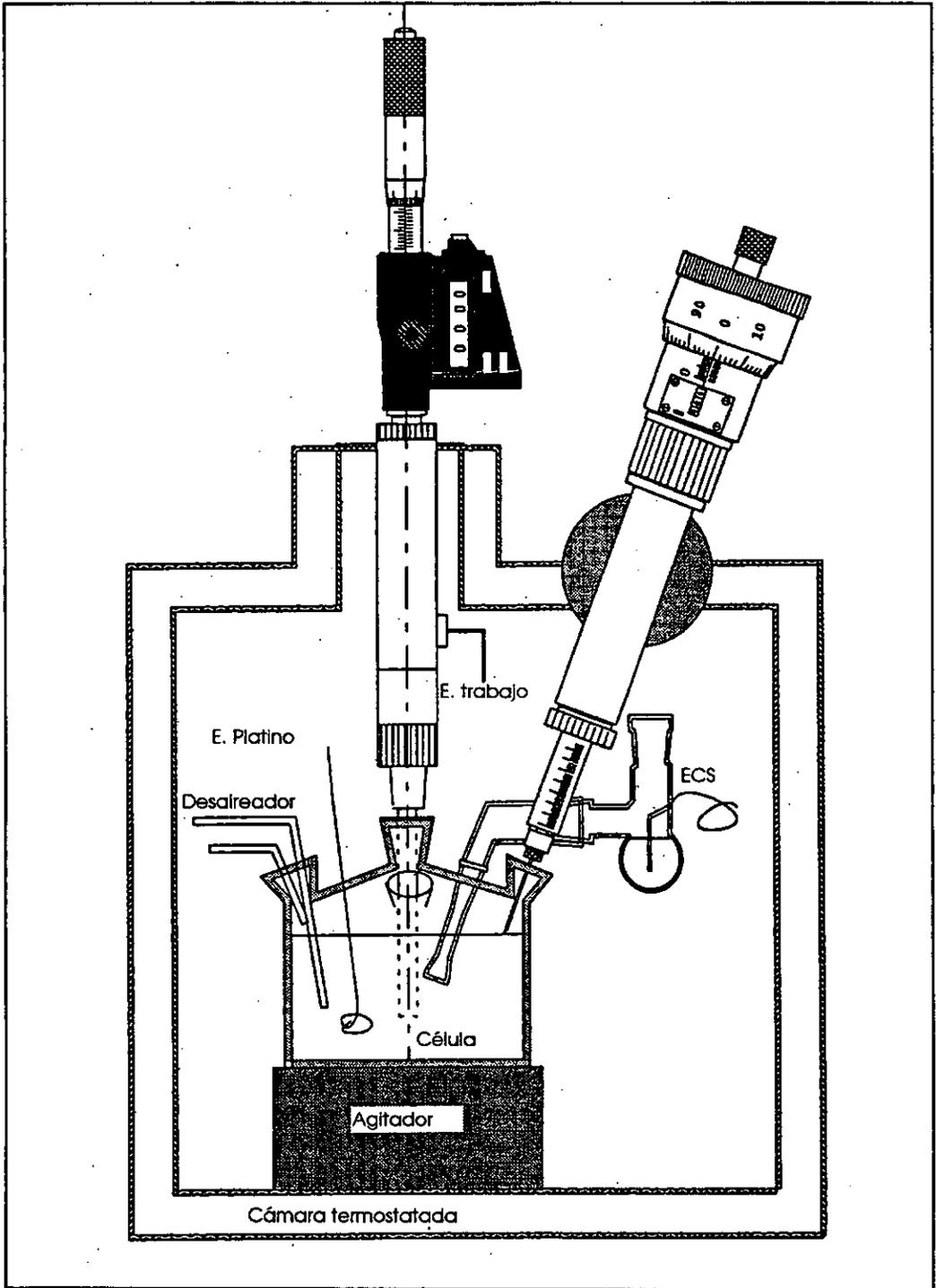


Figura III.1.

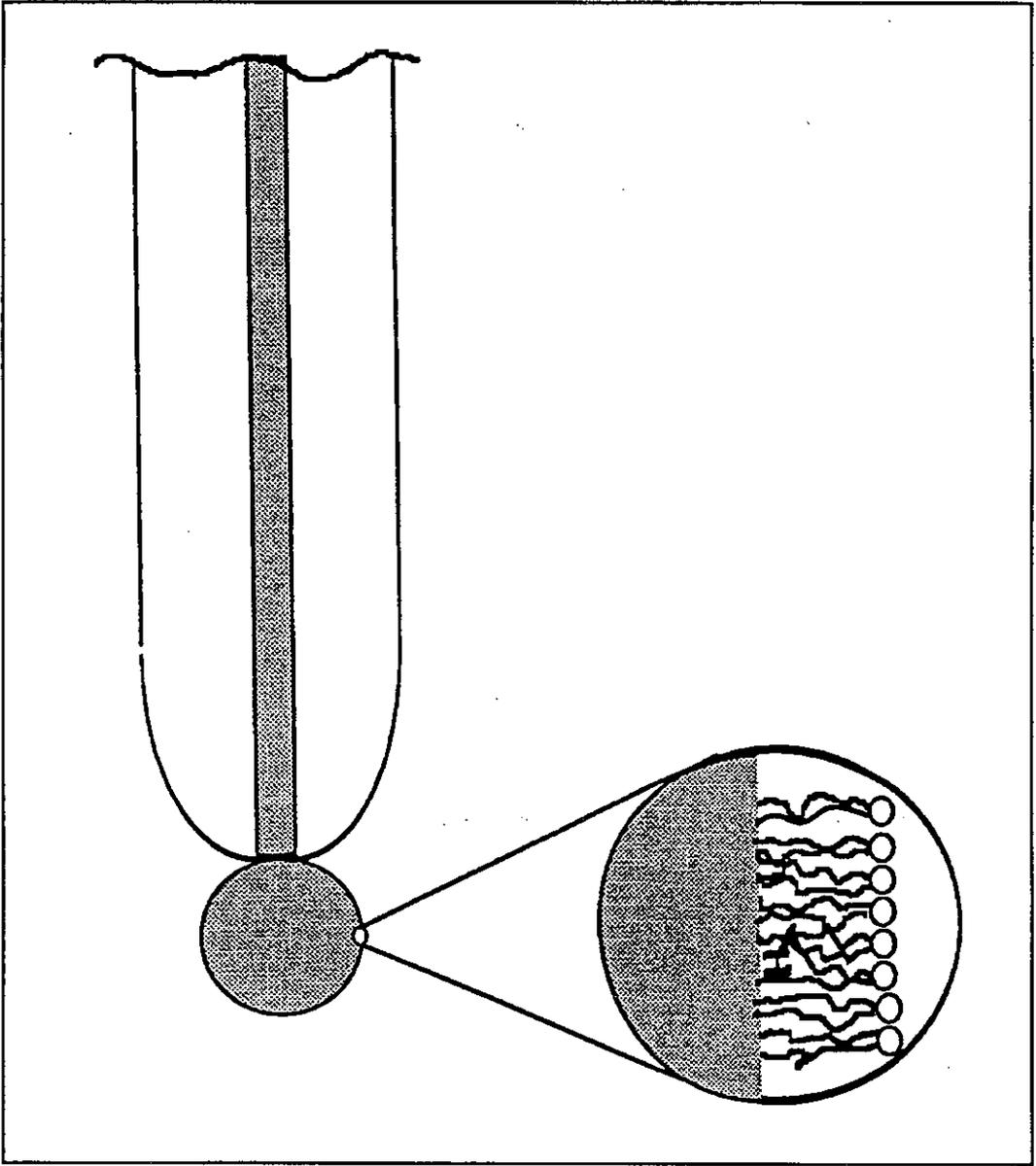


Figura III.2

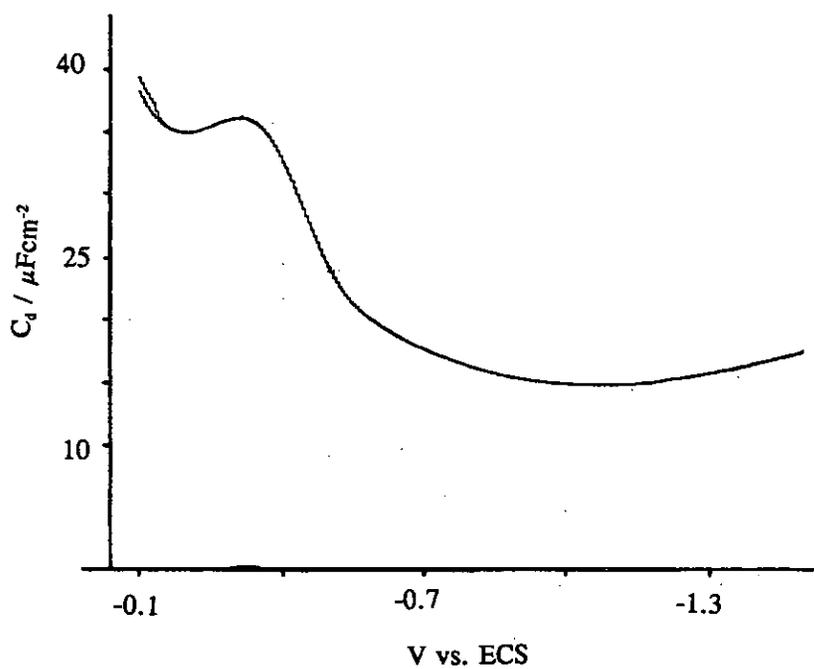


Figura III.3. Capacidad diferencial de una disolución de KCl 0.1M. En ordenadas se representa  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  y en abscisas potencial vs. ECS,

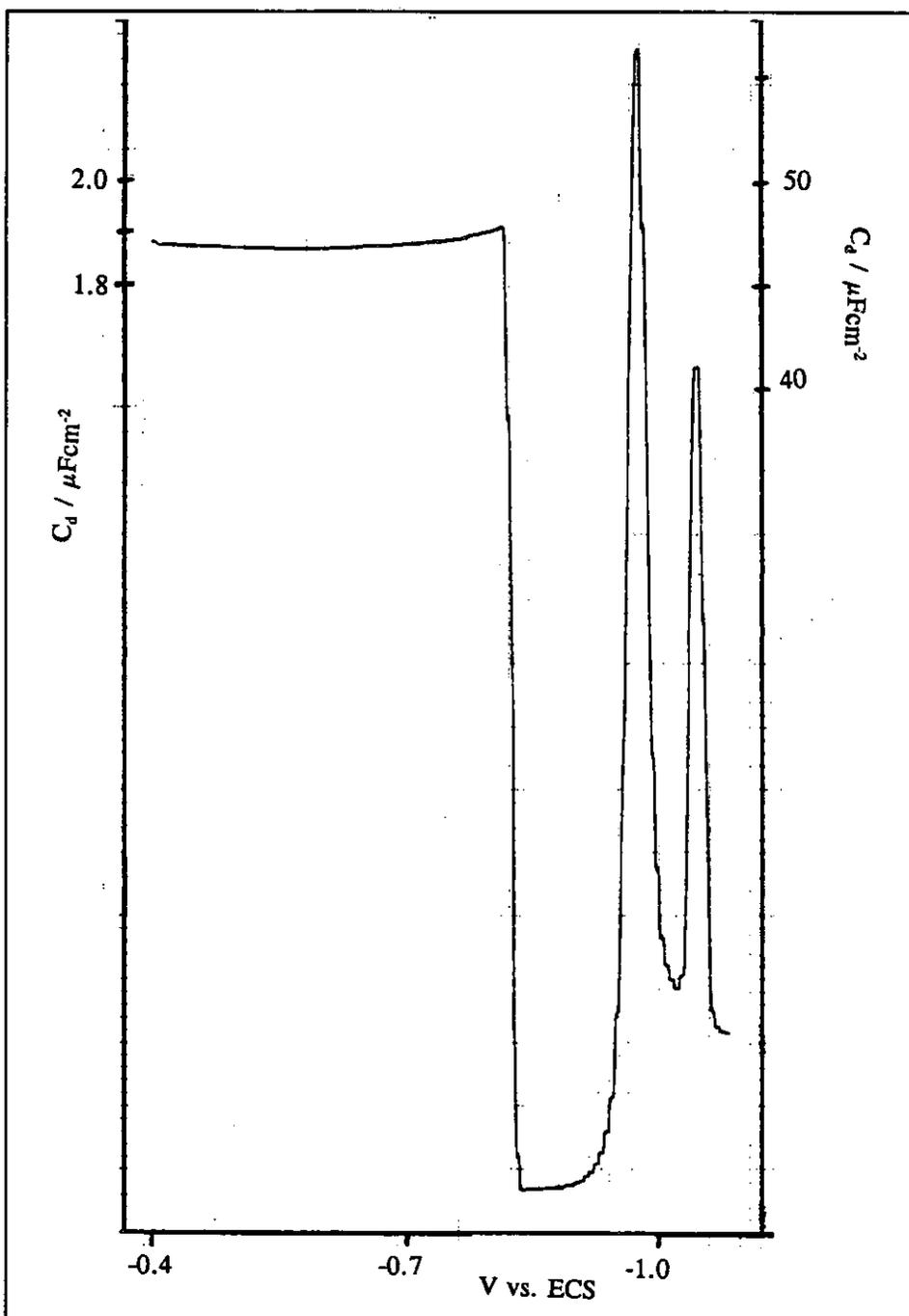


Figura III.4. Capacidad diferencial de una monocapa de DOPC en medio KCl 0.1 M. En ordenadas se representan  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  y en abscisas potencial vs. ECS.

## **IV. Resultados y discusión**

#### **IV.1. Adsorción de tetrafenilfosfonio y tetrafenilborato en monocapas autoorganizadas de fosfatidilcolina y fosfatidilserina, depositadas sobre electrodos de mercurio.**

##### **IV.1.1 Introducción:**

El transporte de iones lipofílicos a través de membranas de bicapas lipídicas (BLM) ha sido estudiado con profusión, tanto desde el punto de vista cinético como con el fin de determinar las cantidades de iones adsorbidos dentro de las regiones polares en la cabeza de las BLM (Ketterer y col., 1971; Hall y col., 1973; Andersen y Fuchs, 1975; Bruner, 1975; Benz y col., 1976; Andersen y col., 1978; Wang y Bruner, 1978a; Lauger y col., 1981; Brock y col., 1981). En general, este transporte se supone que requiere el paso a través de una barrera central de energía que separa dos pozos profundos de energía localizados en las regiones polares. Si la membrana es simétrica, la barrera de energía se supone, también, simétrica. La cinética del transporte en experimentos de relajación se aborda, frecuentemente, resolviendo la ecuación de Nernst-Planck dependiente del tiempo bajo la suposición simplificadora de que los iones lipofílicos se encuentran casi completamente localizados dentro del pozo de energía. Se asume frecuentemente que el potencial de transmembrana es pequeño en relación a  $RT/F$  (Ketterer y col., 1971; Benz y col., 1976; Lauger y col., 1981) y que el campo eléctrico varía linealmente entre los dos pozos de energía. La diferencia de potencial existente entre los dos pozos de potencial se considera, frecuentemente, que es una fracción constante del potencial de transmembrana aunque Andersen y col. (1978) emplearon un modelo de tres condensadores para mostrar que esta fracción depende de las cantidades de iones presentes en los dos pozos y, en consecuencia, varía durante su translocación.

La cinética de la translocación de iones a través de la membrana, en experimentos de relajación, se supone, generalmente, que consta de tres etapas:

- i) adsorción de iones en la región de la cabeza polar de un lado de la membrana;
- ii) translocación desde la región polar de las cabezas hacia el otro lado de la membrana a través de la barrera intermedia de energía y
- iii) desorción desde la última región polar hacia la disolución adyacente.

Distintos experimentos con salto de potencial han demostrado que en el caso de la dipicrilamina ( $DpA^-$ ) y el tetrafenilborato ( $T\phi B^-$ ) la etapa determinante de potencial a través de una bicapa de DOPC es la iii), es decir, la desorción de los iones hacia el seno de la

disolución (Ketterer y col., 1971). Sin embargo, empleando impulsos de potencial de muy corta duración y concentraciones muy bajas de iones lipofílicos en disolución se puede enfocar el estudio cinético exclusivamente hacia la etapa de translocación ii), puesto que la etapa iii) resulta demasiado lenta para ser operativa (Andersen y Fuchs, 1975); en estas condiciones experimentales se produce solamente un flujo de corriente capacitiva a través de la membrana y el número de iones permanece constante; sin embargo, al final de la etapa de potencial, la corriente aún no alcanza su valor mínimo en estado estacionario.

A continuación se describen los resultados obtenidos en la investigación de la adsorción de los iones tetrafenilborato  $T\phi B^-$  y tetrafenilfosfonio  $T\phi P^+$  sobre las cabezas polares de monocapas de PC y PS. Las técnicas utilizadas fueron la medida de la capacidad diferencial de la monocapa en función del potencial aplicado y la carga que fluye a lo largo del circuito externo en función del tiempo, ambas descritas en el capítulo dedicado al procedimiento experimental.

#### **IV.1.2.Resultados**

En ausencia de iones lipofílicos, la capacidad diferencial  $C_d$  sobre el electrodo recubierto de fosfolípido no varía, prácticamente, a lo largo de la región del mínimo de capacidad; es decir, desde - 0.2 V a - 0.8 V.

Por el contrario, en presencia de estos iones,  $C_d$  muestra un salto, el cual se manifiesta sobre el extremo negativo de dicha región de potencial en el caso del  $T\phi P^+$  sobre monocapas de PS y PC y sobre el lado positivo en el caso del ion  $T\phi B^-$  sobre monocapas de PS. La presencia de  $T\phi B^-$  sobre monocapas de PC da lugar a un pico deformado, sencillamente por el hecho de que el salto coincide con el incremento de pendiente de la curva de capacidad diferencial en las proximidades de - 0.2 V en ausencia de  $T\phi B^-$ . La figura IV.1.1 muestra los cambios de capacidad obtenidos en presencia de  $T\phi B^-$  y  $T\phi P^+$  en monocapas de PS; para dichos cambios se encontró que la componente en fase de la corriente AC fue prácticamente despreciable en relación a la componente en cuadratura excluyendo, en consecuencia, la presencia de una contribución faradaica.

Los picos de capacidad debidos a la presencia de iones  $T\phi P^+$  se obtuvieron variando el potencial aplicado E en dirección negativa, después de mantener la gota de mercurio bajo agitación a un potencial positivo respecto al máximo, durante un período de tiempo  $\tau > \tau_{\text{mín}}$ .

## *Resultados y discusión*

---

Dichos picos se deben al desplazamiento de carga eléctrica resultante de la translocación de  $T\phi P^+$  desde las cabezas polares hacia la superficie de mercurio y vuelta hacia atrás a lo largo de la región hidrocarbonada como consecuencia de la señal ac sobrepuesta al potencial base E al cual dichos iones se encuentran presentes tanto en la región de las cabezas polares como sobre la superficie de mercurio, esta condición no se satisface a potenciales positivos respecto al máximo en los que el ion  $T\phi P^+$  solamente se encuentra presente en la región polar. En el caso de los iones  $T\phi B^-$  el barrido de potencial E se efectuó en dirección positiva después de mantener la gota de mercurio con agitación suave a un potencial negativo respecto al máximo durante un tiempo  $\tau > \tau_{\min}$ .

En la figura IV.1.2 se observan las curvas cronocoulombimétricas  $Q(E, t)$  vs.  $t$  para la translocación de  $1 \times 10^{-5}$  M de  $T\phi P^+$  a través de la monocapa de PS a pH 8.9; tales curvas se obtuvieron aplicando distintos saltos de potencial desde un potencial inicial fijo:  $E_i = -0.200$  V hasta diferentes valores finales del mismo regularmente espaciados.

Para valores finales del potencial E, suficientemente positivos como para impedir la translocación de los iones  $T\phi P^+$ , la densidad de carga  $Q(E, t)$  sufre un abrupto incremento a partir del cual permanece constante dado que la corriente de capacidad necesaria para cargar la interfase en su conjunto, fluye en menos de un milisegundo después de la aplicación del salto de potencial  $E_i \rightarrow E$ . Para valores del potencial E a los que comienza a producirse la translocación de los iones  $T\phi P^+$  la brusca elevación de carga viene seguida de un gradual incremento con el tiempo, cada vez más pronunciado, a medida que E se hace más negativo. Finalmente, a potenciales suficientemente negativos las curvas  $Q(E, t)$  vs.  $t$  se desplazan regularmente hacia arriba a medida que E se hace más negativo, aunque mantienen la misma apariencia externa. Para la translocación de los iones  $T\phi P^+$  a través de una monocapa de PC las curvas  $Q(E, t)$  vs.  $t$  exhiben el mismo comportamiento que para las monocapas de PS. Todas las curvas obtenidas conducen a gráficas  $Q(t)$  vs.  $t^{1/2}$  lineales cuya pendiente S aumenta proporcionalmente a la concentración de  $T\phi P^+$  en disolución, al menos hasta valores de  $c$  del orden de  $1 \times 10^{-4}$  M. Para concentraciones más altas, las curvas comienzan a mostrar desviaciones al aumentar  $c$  y a tiempos progresivamente más pequeños.

De acuerdo con la ecuación de Cottrell la densidad de carga  $Q(t)$  para un proceso controlado por difusión es :

$$Q(t) = 2nF\left(\frac{Dt}{\pi}\right)^{1/2} c \quad (1)$$

donde  $n$  es el número de faradays que fluyen en el circuito externo como consecuencia de la translocación de un mol de ion lipofílico, siendo  $D$  el coeficiente de difusión de este último.

Si aplicamos la ecuación anterior a la pendiente constante del gráfico de  $S=Q(t)/t^{1/2}$  vs.  $c$  (véase la figura IV.1.3 parte superior), se obtiene un valor razonable de  $2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  para el coeficiente de difusión para un valor  $n = -1$ . El presente resultado evidencia una velocidad elevada de las etapas de adsorción del ion  $T\phi P^+$  en la región polar y la subsecuente translocación de forma que se alcanza un control por difusión en 1 ms, contado a partir de la aplicación del salto de potencial. La desviación de las representaciones  $Q(t)$  vs.  $t^{1/2}$  del comportamiento lineal a valores de  $c$  superiores a, aproximadamente,  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  se debe, sencillamente, a la saturación de las posiciones destinadas a la adsorción sobre la superficie de mercurio, lo que impide una eliminación completa de la región de cabeza polar después del salto hacia potenciales negativos; en consecuencia, la concentración volumétrica de iones  $T\phi P^+$  en la inmediata vecindad de la monocapa de lípido comienza a ser comparable con la concentración en el seno de la disolución causando una disminución del gradiente de concentración en la superficie de la membrana con respecto al cociente  $c/(\pi Dt)^{1/2}$  predicho por la ecuación de Cottrell.

La extrapolación del gráfico lineal  $Q(t)$  vs.  $t^{1/2}$  en la figura IV.1.3 en  $t^{1/2}=0$  conduce a una ordenada en el origen que mide la carga a través del circuito externo debido a la carga de la interfase posterior al salto de potencial  $E_i \rightarrow E$  y a la translocación completa de los iones  $T\phi P^+$  inicialmente presentes en la región polar. Las ordenadas en el origen correspondientes a distintas concentraciones  $c$  en disolución obtenidas adoptando un salto de potencial fijo lo suficientemente negativo como para asegurar la translocación completa de los iones  $T\phi P^+$  inicialmente adsorbidos a  $E_i = -0.200 \text{ V}$ , se midieron respecto a la ordenada en el origen calculada solamente con el electrolito soporte y posteriormente representadas en función de la concentración  $c$ , lo que conduce a la carga puesta en juego en el proceso de translocación; dicha carga es, prácticamente, una medida de la carga  $\sigma_i$  de los iones  $T\phi P^+$  adsorbidos a  $E_i$ .

en función de  $c$ , o lo que es equivalente, la isoterma de adsorción de dichos iones en la región polar de la monocapa lipídica. La figura IV.1.4 muestra esta representación para la adsorción de los iones  $T\phi P^+$  en una monocapa de PS para tres valores de pH diferentes.

De forma alternativa, los valores  $\sigma_i$  se obtuvieron ajustando a una línea recta los datos  $Q(t)$  vs.  $t^{1/2}$  relativos a una serie de saltos de potencial desde  $E_i = -0.200$  V hasta distintos potenciales finales (véase las series en la figura IV.1.2) y representando las correspondientes ordenadas en el origen  $Q_0$  a  $t^{1/2}=0$  frente a  $E$ . Las curvas resultantes se muestran en la figura IV.1.5; dichas figuras presentan un aspecto sigmoidal cuya altura medida a partir de la correspondiente al electrolito soporte es, una vez más, una medida de  $\sigma_i$ . Es de observar, sin embargo, que la exactitud del procedimiento de extrapolación a lo largo del tramo de mayor pendiente de dichas curvas, en donde la translocación de los iones  $T\phi P^+$  inicialmente adsorbidos a  $E_i$  es parcial, no es tan buena como la obtenida a potenciales más negativos para los que la translocación es completa. La adsorptividad de  $T\phi P^+$  en PC es mucho menor que en PS tal como se observa a partir de las curvas  $\sigma_i$  vs.  $c$  para la adsorción en PC a partir de una disolución no tamponada de 0.1 M de KCl (curva a en la figura IV.1.6).

Las curvas  $Q(E,t)$  vs.  $t$  para la translocación de los iones  $T\phi B^-$  a través de monocapas de PS o PC obtenidas a partir de saltos de potencial desde un potencial  $E_i = -0.750$  V hacia valores progresivamente más positivos, muestra un comportamiento distinto (fig. IV.1.7). Así, a potenciales a los que la translocación de  $T\phi B^-$  tiene lugar, la abrupta elevación inicial en la carga es seguida por un lento, casi lineal, incremento de  $Q(t)$  con el tiempo, el cual depende muy levemente de la concentración de  $T\phi B^-$  en el seno de la disolución  $c$ . Este hecho es indicativo de que la adsorción de los aniones de  $T\phi B^-$  en la región polar es, al menos parcialmente, controlada por la propia etapa de adsorción en la escala de tiempo de nuestras medidas cronocoulombimétricas. Las isotermas de adsorción de  $T\phi B^-$  tanto en PS como en PC fueron, por lo tanto, obtenidas extrapolando a  $t=0$  el gráfico lineal  $Q(E,t)$  vs.  $t$  relativo a los saltos progresivamente más positivos de potencial  $-0.750$  V  $\rightarrow$  E y representando las correspondientes ordenadas en función de  $E$ . Las representaciones resultantes poseen un aspecto sigmoidal tal como el mostrado en la figura IV.1.5 y su altura, medida a partir de la representación del electrolito soporte, solamente suministra una medida de  $\sigma_i$ . Las representaciones gráficas de  $|\sigma_i|$  vs.  $c$  para la adsorción del  $T\phi B^-$  en monocapas de PS y PC se muestran en la fig. IV.1.6 (curvas b y c).

## Resultados y discusión

Todas la isothermas de adsorción muestran una clara porción lineal (la región de la isoterma de Henry) cuya pendiente mide el coeficiente de adsorción  $K$  (Fig. IV.1.8 y IV.1.9). Los valores de  $K$  relativos a la adsorción de  $T\phi P^+$  y  $T\phi B^-$  en monocapas de PC y PS a diferentes valores de pH figuran en la tabla IV.1.1. El valor de  $K=6.5 \cdot 10^{-3}$  cm para el  $T\phi B^-$  en una monocapa de PC, es intermedio entre los dos valores de  $T\phi B^-$  en una bicapa de PE  $\approx 4 \cdot 10^{-3}$  cm y  $3.7 \cdot 10^{-2}$  cm estimados por Andersen y Fuch (1975) y por Andersen y col. (1978) y son ligeramente más pequeños que el valor de  $K$  para  $T\phi B^-$  en una bicapa de PC,  $2 \cdot 10^{-2}$  cm según Benz y col. (1976). Obsérvese que el coeficiente de adsorción de  $T\phi B^-$  en PC es, normalmente, más de un orden de magnitud mayor que los otros coeficientes de adsorción determinados en este trabajo. La figura IV.1.10 muestra una representación de  $\ln K$  vs. pH para la adsorción de  $T\phi P^+$  en PS, nótese el relativamente abrupto incremento de  $\ln K$  en un estrecho intervalo de pH desde 5 a 6; es decir, sobre el intervalo de pH en donde las monocapas de PS se encontró que eran eléctricamente neutras, sobre la base de medidas de capacidad diferencial (Moncelli y col., 1994a).

**Tabla IV.1.1. Coeficientes de adsorción para  $T\phi P^+$  y  $T\phi B^-$  en monocapas de PC y PS, en cm.**

	pH	$K_{T\phi P^+}$	$K_{T\phi B^-}$
PS	2.6	$3.5 \cdot 10^{-4}$	$2.3 \cdot 10^{-4}$
	4.0	$4.5 \cdot 10^{-4}$	
	5.05	$5.4 \cdot 10^{-4}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$
	6.2	$8.9 \cdot 10^{-4}$	$2.6 \cdot 10^{-4}$
	7.4	$9.0 \cdot 10^{-4}$	
	8.9	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$
PC	no tamponada	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$6.5 \cdot 10^{-3}$

### IV.1.3. Discusión

Durante el registro de la curva de capacidad diferencial en función del potencial, la translocación de iones lipofílicos tiene lugar progresivamente en el tiempo a lo largo del pico; puesto que el tiempo requerido para tal registro es de algunas décimas de segundos, durante este tiempo la translocación de iones desde las cabezas polares hasta la superficie de

mercurio arrastrará otros iones (especialmente en el caso del  $T\phi P^+$ ) en la región de la cabeza polar mediante difusión y, posteriormente, sobre la superficie de mercurio. Dicha inconveniencia no se encuentra con las medidas cronocolumbimétricas, puesto que la situación de equilibrio inicial al potencial  $E_i$  se restaura antes del salto del potencial  $E_i \rightarrow E$  y cualquier contribución a  $Q(E,t)$  proveniente de la difusión hacia la monocapa lipídica, siguiendo el salto de potencial, es adecuadamente corregida.

El  $T\phi P^+$  se adsorbe mucho más rápidamente que el  $T\phi B^-$  a partir de la disolución adyacente a la región polar de las monocapas de PS y PC, incluso aunque su adsorividad en PC es mucho menor que la de  $T\phi B^-$ . Esta observación parece contradecir varios trabajos previos (Lieberman y Topaly, 1968; Neumcke y Lauger, 1969) según los cuales los aniones lipofílicos no solamente se unen a las bicapas de lípido neutro en varios órdenes de magnitud superior a los cationes estructuralmente análogos, en concordancia con nuestros resultados, sino que también translocan varios órdenes de magnitud más rápidamente a través de estas bicapas. Debe observarse, sin embargo, que la translocación a través de una bicapa comprende el paso desde una de las regiones polares, a un lado de la bicapa, hacia la otra del lado opuesto, en tanto que en nuestro caso incluye el paso de la región polar de la monocapa hasta la superficie de mercurio. Un intento de explicación para este diferente comportamiento es el siguiente. Las cabezas polares de PC se caracterizan por dipolos P-N aproximadamente paralelas a la capa lipídica (Hauser y Phillips, 1979). La penetración de iones lipofílicos de gran tamaño a través de la región polar de la cabeza probablemente provoque una reorientación de dichos dipolos, con el extremo negativo más o menos orientado hacia el interior de la capa lipídica dada la estrecha vecindad del grupo fosfato a la región de la cadena hidrocarbonada. La diferencia de potencial negativa resultante acelerará la adsorción de cationes lipofílicos ralentizando, al mismo tiempo, la de los aniones estructuralmente análogos. Sin embargo, la subsecuente permanencia de los cationes en la región de la cabeza polar se ve impedida por el potencial del dipolo superficial debido a los grupos éster del esqueleto de glicerol, el cual se considera que es positivo hacia el interior (Büldt y col., 1978.; Pearson y Pascher, 1979; Zaccai y col., 1979); contrariamente, este dipolo superficial favorecerá la permanencia de aniones lipofílicos. La etapa final en la translocación a través de bicapas lipídicas consiste en la desorción a partir de la región polar de la cabeza en el lado opuesto de la bicapa hacia la disolución adyacente. La reorientación

temporal de los relativos dipolos P-N con el extremo positivo hacia afuera que acompaña a tal desorción acelerará la desorción de aniones y ralentizará la de cationes. La ausencia de una etapa de desorción con estas características en la translocación a través de monocapas lipídicas podría, en consecuencia, explicar las relativas diferencias resultantes en las velocidades de translocación de aniones y cationes.

#### IV.1.4. Un modelo

Para interpretar el comportamiento de la carga Q en función del potencial, se hará uso del modelo de tres condensadores mostrado esquemáticamente en la fig. IV.1.8, de alguna manera similar al propuesto por Andersen y col. (1978) para una bicapa plana. Aquí  $x=0$  es el plano que contiene la superficie de mercurio en donde se encuentra localizada la densidad de carga sobre el metal  $\sigma_M$ ;  $x=\alpha$  y  $x=\beta$  representan los planos que contienen los centros de carga de los iones adsorbidos sobre el mercurio y sobre la región polar respectivamente;  $x=d$  es el plano que separa la monocapa de la disolución adyacente; más allá de esta superficie encontramos la capa difusa cuyo espesor  $1/\kappa$  viene dado por la teoría de Gouy-Chapman. Las densidades de carga de los iones lipofílicos adsorbidos sobre  $x=\alpha$  y  $x=\beta$  se representan con  $\sigma'_i$  y  $\sigma''_i$ , y se consideran uniformemente distribuidas sobre dichos planos. Además, se supone, para simplificar el modelo, que la densidad de carga  $\sigma_b$  debida a los grupos ionizados de las cabezas polares de los lípidos se encuentran en  $x=\beta$  y que las dos capas ( $0 < x < \alpha$ ) y ( $\alpha < x < \beta$ ) se caracterizan por la misma constante dieléctrica  $\epsilon_1$ .

Si se representa por  $\epsilon_2$  la constante dieléctrica en la región polar comprendida entre  $\beta < x < d$  y por  $\epsilon_b=78$  la de la disolución acuosa, la diferencia de potencial  $\psi_0$ , a lo largo de la interfase en su conjunto viene dada por:

$$\Psi_0 = \frac{4\pi\alpha}{\epsilon_1} \sigma_M + \frac{4\pi(\beta-\alpha)}{\epsilon_1} (\sigma_M + \sigma'_i) + 4\pi \left( \frac{\gamma}{\epsilon_2} + \frac{1}{\epsilon_b \kappa} \right) (\sigma_m + \sigma_i + \sigma_h) = \frac{\sigma_M}{C} + \frac{\sigma'_i}{C_i} + \frac{\sigma_i + \sigma_h}{C_b} \quad (2)$$

con:

$$\frac{1}{C} \equiv 4\pi \left( \frac{\beta}{\epsilon_1} + \frac{\gamma}{\epsilon_2} + \frac{1}{\epsilon_b \kappa} \right); \quad \frac{1}{C_1} \equiv \frac{4\pi(\beta - \alpha)}{\epsilon_1}; \quad \frac{1}{C_b} \equiv 4\pi \left( \frac{\gamma}{\epsilon_2} + \frac{1}{\epsilon_b \kappa} \right) \quad (3)$$

$$\sigma_i \equiv \sigma'_i + \sigma''_i; \quad \gamma \equiv d - \beta$$

En las ecuaciones anteriores  $\sigma_i$  es la densidad de carga total en la región polar en equilibrio con la correspondiente concentración en el seno de la disolución y al potencial inicial  $E_i$ .  $\sigma_i$  se puede considerar como una constante independiente de la amplitud del salto de potencial  $E_i \rightarrow E$  una vez que la contribución de la difusión iónica es apropiadamente corregida en medidas cronocoulombimétricas; dicha corrección se asumirá de aquí en adelante. Debe observarse que la expresión  $\Psi_d = 4\pi(\sigma_M + \sigma_i + \sigma_b) \kappa^{-1}/\epsilon_b$ , para el potencial iónico superficial empleado en la ecuación 2 resulta de la linealización de la ecuación de Poisson-Boltzmann y, en consecuencia, sobreestima  $|\Psi_d|$  apreciable para valores de  $(\sigma_M + \sigma_i + \sigma_b)$  mayores que algunos  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ . Sin embargo, bajo las presentes condiciones experimentales, esta aproximación es aceptable debido a que la longitud de Debye  $\kappa^{-1}$  es 9.6 Å en KCl 0.1 M; si se asigna a  $\gamma$  y  $\epsilon_2$  los valores razonables de 5 Å y 10, entonces el término  $\gamma/\epsilon_2$  en la expresión de  $1/C_b$  en la ecuación 3 es cuatro veces mayor que el término aproximado  $1/(\epsilon_b \kappa)$  que contiene la contribución de la capa difusa y sería incluso mayor si se reemplazase la expresión exacta de  $\Psi_b$  que proporciona la teoría de Gouy-Chapman. También debe tenerse en cuenta que  $1/C_b$  es mucho menor que  $1/C_1$  y  $1/C$ , debido a que  $(\beta - \alpha)$  es del orden de 20 Å y  $\epsilon_1 \approx 2$ ; en consecuencia, la contribución del término  $(\sigma_i + \sigma_b)/C_b$  en la diferencia de potencial total  $\Psi_0$  en la ecuación 2 es pequeña.

Al potencial  $E_i$  la carga iónica  $\sigma'_i$  en contacto directo con la superficie de mercurio se hace cero y la ecuación 2 se transforma en:

$$\sigma_M = C\Psi_0 - \frac{C}{C_b}(\sigma_i + \sigma_b) \quad (4)$$

Por el contrario, para un salto importante de potencial  $E_i \rightarrow E$ ,  $\sigma'_i$  llega a hacerse casi inmediatamente igual a  $\sigma_i$  y la ecuación 2 toma la forma:

$$\sigma_M = C\Psi_0 - \frac{C}{C_1}\sigma_i - \frac{C}{C_b}(\sigma_i + \sigma_h) \quad (5)$$

La diferencia de potencial  $\Psi_0$  a través de la interfase en su conjunto difiere del potencial aplicado E en una cantidad constante que depende exclusivamente de la elección del electrodo de referencia. Las ecuaciones 4 y 5 muestran que la representación  $Q_0(E) = \sigma_M(E) - \sigma_M(E_i)$  frente  $E = (\Psi_0 + \text{constante})$  en el intervalo de potencial que precede a la translocación y el correspondiente a la translocación completa se espera que consistan en dos segmentos paralelos de pendiente C, separados por una distancia vertical  $\Delta Q_0$  igual a:

$$\Delta Q_0 = -\frac{C}{C_1}\sigma_i \approx -\frac{\beta - \alpha}{\beta}\sigma_i \quad (6)$$

Esta ecuación es estrictamente correcta si la densidad de carga  $\sigma_h$  de los grupos polares no cambia durante la translocación y, en consecuencia, mantiene el mismo valor en las ecuaciones 4 y 5; sin embargo, incluso si no se verifica esta condición, la ecuación 6 mantiene una validez satisfactoria debido a la pequeña contribución del término  $-C(\sigma_i + \sigma_h)/C_b$  en las ecuaciones 4 y 5.

A la vista de las consideraciones precedentes, las curvas  $Q_0$  vs. E, tales como las que aparecen en la fig. IV.1.5 una vez medidas a partir de las correspondiente curva en ausencia de iones lipofílicos, se pueden considerar curvas de  $-(\beta - \alpha)\sigma'_i/\beta$  vs. E. Además, a la vista de la ecuación 6, la altura  $\Delta Q_0$  de dichas curvas permite estimar una medida de  $-(\beta - \alpha)\sigma_i/\beta$ . Dentro de los límites en los que se puede despreciar  $\alpha$  en relación a  $\beta$ , las curvas de  $-Q_0$  vs. E se pueden considerar como curvas de  $\sigma'_i$  vs. E; en consecuencia, su altura es una medida directa de la densidad de carga  $\sigma_i$  de los iones lipofílicos adsorbidos en la región polar a  $E_i$ , en tanto que las representaciones en las figuras IV.1.4 y IV.1.6 son las isotermas de adsorción de dichos iones.

#### IV.1.5. Curvas de capacidad diferencial

Una sencilla y aproximada correlación entre las curvas  $C_d$  vs. E y las correspondientes

*Resultados y discusión*

curvas cronoculombimétricas  $\sigma'_i$  vs.  $\sigma_M$ . Se puede deducir si en la ecuación 2 la diferencia de potencial a través de la capa difusa y la región polar se desprecia frente a la existente a lo largo de la región hidrocarbonada:

$$\Psi_0 = \frac{4\pi\alpha}{\epsilon_1} \sigma_M + \frac{4\pi(\beta-\alpha)}{\epsilon_1} (\sigma_M + \sigma'_i) = \frac{4\pi\beta}{\epsilon_1} \sigma_M + \frac{4\pi(\beta-\alpha)}{\epsilon_1} \sigma'_i \quad (7)$$

Siguiendo a Andersen y Fuchs (1975), supondremos que en el estado de equilibrio la relación de densidades de carga  $\sigma'_i$  y  $\sigma''_i$  en los dos pozos de potencial en  $x=\alpha$  y  $x=\beta$  viene dado por la ecuación de Boltzmann:

$$\frac{\sigma'_i}{\sigma''_i} = \exp\left[-\frac{zF}{RT} \frac{4\pi(\beta-\alpha)}{\epsilon_1} (\sigma_M + \sigma'_i) + \frac{U}{RT}\right] \quad (8)$$

en donde  $z$  es la valencia del ion lipofílico. El primer término en el exponente es la diferencia en la energía potencial electrostática entre los dos pozos en unidades  $RT$ , en tanto que el segundo término tiene en cuenta la diferencia  $U$  en la energía potencial no-electrostática que existe en una capa lipídica asimétrica, tal como la que es objeto de nuestro estudio. Supongamos, otra vez, que  $\sigma'_i + \sigma''_i = \sigma_i$  es una constante. Después de sustituir  $\sigma''_i = \sigma_i - \sigma'_i$  en la ecuación 8 y diferenciando la  $\sigma_M$  obtenida respecto a  $\sigma'_i$ , se obtiene:

$$\frac{d\sigma_M}{d\sigma'_i} = -\frac{RT}{zF} \frac{\epsilon_1}{4\pi(\beta-\alpha)} \frac{\sigma_i}{\sigma'_i(\sigma_i - \sigma'_i)} - 1 \quad (9)$$

La diferenciación de  $\Psi_0$  en la ecuación 7 respecto a  $\sigma_M$  conduce al recíproco de la capacidad diferencial  $C$ :

$$\frac{1}{C} = \frac{d\Psi_0}{d\sigma_M} = \frac{1}{C_0} + \frac{4\pi(\beta-\alpha)}{\epsilon_1} \frac{d\sigma'_i}{d\sigma_M} \quad (10)$$

donde  $C_0 = \epsilon_1/(4\pi\beta)$  es la capacidad diferencial en ausencia de iones lipofílicos. Al sustituir  $d\sigma_M / d\sigma'_i$  de la ecuación 9 en la ecuación 10, y considerando  $\alpha$  despreciable en relación a  $\beta$ , como es habitual, después de reajustar la ecuación se obtiene:

$$C = C_0 + \frac{zF}{RT} \frac{\sigma'_i(\sigma_i - \sigma'_i)}{\sigma_i} \quad (11)$$

Se ve fácilmente a partir de esta ecuación que el máximo de la capacidad diferencial se obtiene en el punto medio de la curva  $\sigma'_i$  vs. E, es decir, para  $\sigma'_i = \sigma_i / 2$ .

La curva punteada de la figura IV.1.1 se calculó empleando la ecuación 11 sobre la base de las curvas  $\sigma'_i$  vs. E correspondiente a la curva C vs. E (a) en la misma figura. Se observa que aunque el pico de la curva  $C_d$  vs. E posee aproximadamente la misma altura que la curva calculada, su posición relativa al eje de potenciales se desplaza en la dirección negativa. Por el contrario, se encuentra que las curvas experimentales para la adsorción de  $T\phi P^+$  en PS se desplazan hacia potenciales positivos en relación a las calculadas a partir de la ecuación 11. Se puede decir, en resumen, que las curvas experimentales  $C_d$  vs. E para ambos iones lipofílicos están desplazadas en la dirección de un mayor incremento de la translocación hacia la superficie de mercurio en relación a las curvas calculadas sobre la base de las correspondientes gráficas  $\sigma'_i$  vs. E. Este fenómeno se puede adscribir a la progresiva difusión de los iones lipofílicos desde el seno de la disolución hasta la superficie de mercurio durante el registro de las curvas de capacidad. La ecuación 11 predice que la altura máxima de dichas curvas se obtiene cuando la densidad de carga  $\sigma''_i$  en la región de las cabezas polares es la mitad de la correspondiente densidad de carga  $\sigma_i$  antes de la translocación. Mientras que en las medidas cronocoulombimétricas esta situación se produce cuando la densidad de carga  $\sigma'_i$ , en contacto directo con el mercurio, es también igual a  $\sigma''_i = \sigma_i / 2$ , en las medidas de capacidad diferencial se produce para  $\sigma'_i > \sigma_i / 2$  debido a la gradual difusión de los iones lipofílicos hacia el electrodo. La mayor repulsión electrostática resultante ejercida por  $\sigma'_i$  sobre los iones que translocan, en las medidas de capacidad diferencial, es responsable del desplazamiento observado del potencial de los picos de capacidad con respecto al punto medio de las correspondientes curvas  $\sigma'_i$  vs. E.

#### IV.1.6. Una isoterma de adsorción que tiene en cuenta los efectos de cargas discretas.

Las isotermas de adsorción de los iones  $T\phi P^+$  en una monocapa de PS (ver fig. IV.1.4) y del  $T\phi B^-$  en una monocapa de PC (ver fig. IV.1.6) muestran desviaciones apreciables del comportamiento de la isoterma de Henry, que son similares a los descritos

por otros investigadores para el  $T\phi B^-$  (Grigor'ev y col., 1972; Benz y col., 1976; Andersen y col., 1978). A la vista de las bajas densidades de carga presentes, es altamente improbable que estas desviaciones se puedan adscribir a la saturación de un número limitado de posiciones de unión en la monocapa lipídica. Con mucha mayor probabilidad se deben a interacciones repulsivas y, en consecuencia, son entálpicas más que entrópicas en su naturaleza. Andersen y col. (1978) explicaron estas desviaciones representando la isoterma de adsorción en la forma general válida hasta la saturación:

$$|\sigma_i| = K_0 c \exp\left(-\frac{zF\psi}{RT}\right) \quad (12)$$

donde  $K_0$  es el coeficiente de adsorción para  $\psi=0$ . Estrictamente hablando,  $\psi$  es el potencial eléctrico local (también llamado micropotencial) en la posición ocupada por un ion adsorbido de carga  $ze$ , relativo a la disolución adyacente. El coeficiente de adsorción  $K$  obtenido directamente a partir de la pendiente del gráfico  $|\sigma_i|$  vs.  $c$  en la región de la isoterma de Henry viene dado por:

$$K \equiv \lim_{\sigma_i \rightarrow 0} \left( \frac{|\sigma_i|}{c} \right) = K_0 \exp\left[-\frac{zF\psi(\sigma_i=0)}{RT}\right] \quad (13)$$

Andersen y col. (1978) identificaron  $\psi$  con el correspondiente potencial medio  $\Psi$  (el macropotencial) por sencillez; el último potencial se adscribió, por tanto, a la diferencia de potencial media a través de la zona interna  $\gamma$  más la diferencia de potencial  $\Psi_d$  a través de la capa difusa estimada a partir de la teoría de Gouy-Chapman linealizada. Al interpretar las isotermas de adsorción de  $DpA^-$  en bicapas de PC a distintas fuerzas iónicas, Wang y Bruner (1978a) utilizaron también la ecuación 12 empleando  $\psi$  igual a  $\Psi_d$ . Al interpretar las medidas de potencial superficial sobre monocapas de PE en presencia de iones  $T\phi P^+$ , distintos autores (Andersen y col., 1978) vieron la necesidad de tener en cuenta los efectos de carga discreta empleando una expresión del micropotencial  $\psi$  en la ecuación 12 a través de otros modelos (Tsien y Hladky, 1982; Andersen y col., 1978; Tsien, 1978; Wang y Bruner, 1978b).

Los distintos tratamientos existentes tienen en cuenta los efectos de las cargas discretas y representan las monocapas o bicapas lipídicas como placas de constante dieléctrica

uniforme  $\epsilon$  y, en consecuencia, desprecian una característica importante de estas capas, es decir, la presencia de una región hidrocarbonada con una constante dieléctrica  $\epsilon_1$  de valor aproximado  $\epsilon_1 \approx 2$  y de una región polar con una constante dieléctrica que oscila entre 8 y 50 (Flewelling y Hubbell, 1986). Además, desdeñan completamente el efecto del potencial  $\Psi_d$  a través de la capa difusa, lo que permite explicar por qué ajustando las predicciones de los diferentes modelos a las isothermas experimentales de adsorción conduce a valores completamente distintos para la constante dieléctrica  $\epsilon$  y para el parámetro  $\gamma$ . Así, en el "modelo hexagonal" adoptado por Andersen y col. (1978) se le asignan los valores de  $\epsilon=10$  y  $\gamma=8\text{\AA}$ . Por el contrario, en la isoterma del tipo virial propuesta por Tsien y Hladky (1982)  $\epsilon$  se supone 2.1 y a  $\gamma$  se le dan valores que oscilan entre 1.5 y 2.5 $\text{\AA}$ ; incluso un valor más bajo de  $\gamma=0.5\text{\AA}$ , casi despreciable en relación al espesor de las regiones polares, es el empleado por Wang y Bruner (1978b) en su modelo de "disco de corte" a la hora de ajustar los tiempos experimentales de relajación. Esta dispersión observada en los valores de  $\epsilon$  y  $\gamma$  refleja claramente las características particulares de los distintos modelos.

Recientemente Guidelli y col. (Moncelli y col., 1994b), tomando como referencia los distintos tratamientos previos han obtenido la siguiente expresión:

$$\ln\left(\frac{|\sigma_i|}{c}\right) = \ln K_0 - \frac{zF}{RT} \left[ \frac{4\pi\gamma}{\epsilon_2} \left( \sigma_M + \sigma_i \frac{\gamma/\epsilon_2}{\gamma/\epsilon_2 + \beta/\epsilon_1} \right) + \Psi_d \right] \quad (14)$$

la cual depende de los parámetros de la capa lipídica solamente a través de los cocientes  $\beta/\epsilon_1$  y  $\gamma/\epsilon_2$ . Si la densidad de carga  $\sigma_b$  en las cabezas polares de los lípidos es distinta de cero y se puede suponer que su "profundidad" es igual a  $\gamma$ , entonces  $\sigma_i$  se debe sustituir por  $(\sigma_i + \sigma_b)$  tanto en esta ecuación 14 como en la ecuación 16. Dentro de los límites en los que  $\sigma_M$  y  $\Psi_d$  varían sólo lentamente al variar  $\sigma_i$ , la isoterma de adsorción de la ecuación 14 tiene la misma forma que la de la isoterma de virial truncada (Tsien y Hladky, 1982) o también la isoterma propuesta por Andersen y col., (1978), sobre la base del modelo de tres condensadores; además, predice una pendiente lineal del gráfico  $\ln(|\sigma_i|/c)$  vs.  $\sigma_i$ .

#### IV.1.7. Comparación de la isoterma de adsorción con el experimento.

A la vista de la isoterma de la ecuación 14, se ha creído conveniente expresar los datos experimentales de adsorción para los iones  $T\phi B^-$  y  $T\phi P^+$  en monocapas de PC y PS en forma de representaciones gráficas de  $\ln(|\sigma_i|/c)$  vs.  $\sigma_i$  (véase la fig. IV.1.12). Es evidente que las representaciones son aproximadamente lineales con pendientes que oscilan desde  $-0.4$  a  $-0.7 \text{ cm}^2/\mu\text{C}$ . Las líneas continuas a' y b' en la fig. IV.1.12 se han calculado empleando la ecuación 14, asignando un valor de  $\beta/\varepsilon_1 = 20\text{\AA}/2$  y adscribiendo a  $\gamma/\varepsilon_2$  los valores extremos  $10\text{\AA}/8$  y  $4\text{\AA}/30$ . Dichos gráficos se refieren a la adsorción del ion  $T\phi B^-$  en el lípido neutro PC a un potencial aplicado  $E_i = -0.750 \text{ V}$ . La dependencia de  $\sigma_M$  sobre  $\sigma_i$  se estimó considerando que la diferencia de potencial media  $\Psi_0$  a través de la interfase viene dada por:

$$\Psi_0 = \frac{4\pi\beta}{\varepsilon_1} \sigma_M + \frac{4\pi\gamma}{\varepsilon_2} (\sigma_M + \sigma_i) + \chi + \Psi_d \quad (15)$$

donde  $\chi$  es el potencial del dipolo superficial. El valor de  $\Psi_0$  no es accesible experimentalmente pero difiere del potencial aplicado  $E_i$  en una constante, la cual depende exclusivamente de la elección del electrodo de referencia. En consecuencia,  $\Psi_0$  es constante a  $E_i$  constante. Si suponemos que  $\chi$  permanece aproximadamente constante a  $E_i$  constante al variar las condiciones experimentales, y empleamos la ecuación de Gouy-Chapman para estimar  $\Psi_d$ , medidas independientes de  $\sigma_M$  llevadas a cabo en ausencia de iones lipofílicos (es decir,  $\sigma_i = 0$ ) nos permiten adscribir un valor de aproximadamente  $-0.75 \text{ V}$  a la cantidad  $(\Psi_0 - \chi)$  a  $E_i = -0.750 \text{ V}$  utilizando la ecuación 15 en la que  $4\pi(\beta/\varepsilon_1 + \gamma/\varepsilon_2)$  se iguala al recíproco del valor experimental de la capacidad diferencial  $C \approx 1.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  en primera aproximación. La ecuación 15 con  $\Psi_d$  expresado como una función de  $(\sigma_M + \sigma_i)$  y  $c$  sobre la base de la teoría de Gouy-Chapman es una función implícita de  $\sigma_M$  a partir de la cual se puede calcular fácilmente  $\sigma_M$  para cada valor de  $\sigma_i$  mediante un procedimiento de tipo Newton-Raphson. Las curvas calculadas a' y b' en la fig. IV.1.12 son prácticamente lineales con una pendiente media de  $-0.38 \text{ cm}^2/\mu\text{C}^{-1}$  para  $\gamma/\varepsilon_2 = 1.25\text{\AA}$  y  $-0.46 \text{ cm}^2/\mu\text{C}^{-1}$  para  $\gamma/\varepsilon_2 = 0.133\text{\AA}$ . Se puede ver que dichas pendientes son poco sensibles a los cambios en los valores de los parámetros de la monocapa de lípido. Esto es debido al hecho de que un cambio en  $\sigma_i$  a potencial aplicado constante  $E_i$  es acompañado por un cambio de  $\sigma_M$  en

dirección opuesta, de tal modo que el primer término entre corchetes en la ecuación 14 se vuelve relativamente despreciable en relación a  $\Psi_d$ .

La ecuación 14 puede aplicarse también a las bicapas lipídicas como una buena aproximación. De hecho la distancia,  $\approx 2\beta$ , de los iones adsorbidos sobre un lado de la membrana respecto a los adsorbidos del otro lado, junto con sus contraiones en la capa difusa es grande en relación a la distancia,  $\gamma$ , desde la disolución adyacente en el mismo lado; esto nos permite considerar la carga total sobre el otro lado de la membrana, incluyendo los contraiones de la capa difusa, como aproximadamente localizados sobre la superficie de la membrana. En la bibliografía, las medidas de adsorción han sido llevadas a cabo, generalmente, sobre bicapas simétricas partiendo de un valor cero de potencial de transmembrana. Bajo estas condiciones la carga total sobre la otra cara de la membrana es igual a cero; en consecuencia, la ecuación 14 se puede aplicar directamente a estas bicapas empleando  $\sigma_M=0$  y sustituyendo  $\beta$  por  $2\beta$ :

$$\ln |\sigma_i| + \frac{zF}{RT} \left[ 4\pi \sigma_i \frac{(\gamma/\epsilon_2)^2}{\gamma/\epsilon_2 + 2\beta/\epsilon_1} + \Psi_d \right] = \ln K_0 + \ln c \quad (16)$$

La curva d en la fig. IV.1.12 muestra la representación de  $\ln(|\sigma_i|/c)$  vs.  $\sigma_i$  obtenido a partir de la isoterma de adsorción para el  $T\phi B^-$  en una bicapa de PE en NaCl 1M (Andersen y col., 1978). La pendiente de esta representación,  $-0.46 \text{ cm}^2\mu\text{C}^{-1}$  es próxima a la pendiente de  $-0.48 \text{ cm}^2\mu\text{C}^{-1}$ , de la curva c' en la misma figura, calculada a partir de la ecuación 16 empleando  $\beta/\epsilon_1 = 10\text{\AA}$  y  $\gamma/\epsilon_2 = 1.25\text{\AA}$  y estimando  $\Psi_d$  a partir de la teoría de Gouy-Chapman para un electrolito 1:1 1M.

Los puntos en la fig. IV.1.13 son datos de Wang y Bruner (1978a) para la adsorción de  $DpA^-$  en una bicapa de PC a partir de una disolución de NaCl a distintas concentraciones. Las líneas continuas en esta figura son representaciones de  $\ln|\sigma_i|$  vs.  $(\log c + \text{cte})$  calculada con la ecuación 16 para las mismas concentraciones de electrolito usando los mismos parámetros que en la curva c' de la fig. IV.1.12; el conjunto de curvas calculadas se ha desplazado a lo largo del eje  $\log c$  para obtener el mejor solapamiento con los puntos experimentales. La coincidencia es realmente buena. A la concentración más baja de electrolito el potencial iónico superficial  $\Psi_d$  prevalece claramente sobre el primer término

entre corchetes en la ecuación 16,  $4\pi\sigma_i(\gamma/\epsilon_2)^2/(\gamma/\epsilon_2 + 2\beta/\epsilon_1)$ , el cual tiene en cuenta la presencia de un espesor  $\gamma$  a través de la contribución del potencial medio  $4\pi\sigma_i(\gamma/\epsilon_2)$  multiplicando por el factor  $(\gamma/\epsilon_2)/(\gamma/\epsilon_2 + 2\beta/\epsilon_1)$  que engloba los efectos de las cargas discretas; esto explica por qué Wang y Bruner (1978a) pudieron adscribir el efecto repulsivo completo a  $\Psi_d$  a las concentraciones más bajas del electrolito. Sin embargo, un aumento en la concentración de electrolito causa que  $\Psi_d$  sea comparable y finalmente pequeño en relación al primer término de la ecuación 16; esto obligó a Wang y Bruner (1978a) a usar de forma ficticia valores bajos para la constante dieléctrica en la expresión de Gouy-Chapman para  $\Psi_d$ , postulando, en consecuencia, una saturación dieléctrica de la disolución acuosa adyacente a la bicapa. Debe observarse que el efecto experimental de repulsión mayor que el predicho sobre la base del potencial sencillo  $\Psi_d$  no puede tenerse en cuenta satisfactoriamente añadiendo a  $\Psi_d$  la diferencia de potencial media  $4\pi\sigma_i(\gamma/\epsilon_2)$  a menos que a  $\gamma$  se le den valores muy bajos carentes de significado físico. Esto muestra que la contribución de la capa difusa y el efecto de la carga discreta se debe considerar con el fin de justificar el comportamiento experimental sobre la base de parámetros reales de la capa lipídica.

#### IV.1.8. Dependencia del pH de la adsorción iónica en monocapas de fosfatidilserina.

La porción lineal inicial de la isoterma de adsorción de los cationes  $T\phi P^+$  en una monocapa de PS exhibe un comportamiento aparentemente anómalo al variar el pH (ver fig. IV.1.10). Claramente en dicha porción lineal la progresiva repulsión electrostática entre los cationes  $T\phi P^+$  adsorbidos como consecuencia de un incremento en su densidad de carga  $\sigma_i$  continúa siendo despreciable. Sin embargo, la interacción electrostática de estos cationes con la densidad de carga  $\sigma_b$  de las cabezas polares PS ha de tenerse en cuenta ya que es responsable del cambio de pendiente K, en la región de la isoterma de Henry, con el cambio en el pH. La interacción entre los iones adsorbidos  $\sigma_b$  se tiene en consideración, fácilmente, sustituyendo  $\sigma_i$  por  $(\sigma_i + \sigma_b)$  en el miembro derecho de la isoterma de adsorción en la ecuación 14. Empleando las constantes de protonación de los grupos fosfato y carboxilo para una monocapa de PS estimada a partir de medidas de capacidad diferencial (Moncelli y col., 1994a) y calculando  $\Psi_d$  en función de  $(\sigma_M + \sigma_b)$  y de la concentración de electrolito sobre la base de la teoría de Gouy-Chapman, la ecuación 14 con  $\sigma_i = 0$ ,  $\beta/\epsilon_1 = 10\text{\AA}$  y  $\gamma/\epsilon_2 = 0.133\text{\AA}$  conduce a la curva de  $-F\psi(\sigma_i = 0) / RT = (\ln K + \text{constant.})$  en función del pH representada

en la figura IV.1.10.

Se encontró que las monocapas de PS depositadas sobre mercurio en ausencia de las especies incorporadas poseían una densidad de carga que va desde un pequeño valor positivo de alrededor de  $+4 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  a pH 3 a un pequeño valor negativo de alrededor de  $-3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  a pH 9 (Moncelli y col., 1994a). En consecuencia, en las proximidades de pH 6, donde la PS es eléctricamente neutra, la curva calculada  $-F\psi(\sigma_i = 0) / RT$  vs. pH muestra una región plana interpuesta entre dos regiones de elevada pendiente a bajos y altos valores de pH. Esta curva calculada contrasta con la curva experimental, que muestra una máxima pendiente, aproximadamente a pH 6. Este comportamiento se puede explicar postulando que las películas autoorganizadas de PS pueden asumir, al menos, dos conformaciones diferentes de cabezas polares con energías de Gibbs análogas pero acideces completamente distintas de los grupos ionizables (Moncelli y col., 1994a). Cuando un aumento de pH causa que la monocapa se aproxime a la neutralidad, la presencia de un catión lipofílico adsorbido tenderá a favorecer la conformación con un grupo fosfato cargado negativamente en las proximidades de las cabezas polares. La representación  $\ln K$  vs. pH en la fig. IV.1.10 exhibe un relativamente abrupto incremento de 0.5 en el intervalo de pH 5 y 6, atribuible a la presencia de un catión adsorbido  $T\phi P^+$  que induce un cambio conformacional en un grupo de cabeza polar vecino, conduciendo a la desprotonación de su grupo fosfato.

El aumento progresivo en la cantidad de carga negativa  $\sigma_b$  de las cabezas polares PS con un incremento de pH más allá de 6 se espera que tenga un efecto relativamente pequeño sobre el micropotencial  $\Psi$  en la posición de un catión  $T\phi P^+$  adsorbido, cuando se compara con el efecto ya producido entre pH 5 y 6 por una cabeza polar negativa inmediatamente adyacente al catión dado. Sin embargo, esto no puede justificar enteramente el modesto incremento en  $\ln K$  con el aumento en el valor del pH por encima de 6 comparado con el que predice la ec. 14. De cualquier forma, medidas independientes de  $\sigma_M$  y de la capacidad diferencial sobre monocapas de PS depositadas sobre mercurio (Moncelli, Becucci, Guidelli, resultados no publicados) parecen indicar un desplazamiento positivo apreciable en el potencial del dipolo superficial  $\chi$ , con un aumento del pH superior a 6, lo que puede oponerse a una rápida adsorptividad de  $T\phi P^+$ .

La progresiva densidad de carga positiva  $\sigma_b$  asumida por cabezas polares de PS al disminuir el pH por debajo de 6 se espera que tenga un efecto menor sobre  $\Psi$  debido a que

## *Resultados y discusión*

---

la profundidad a que se encuentran los grupos amino cargados positivamente es casi ciertamente menor que la de los grupos fosfato y en consecuencia su carga es apantallada con más efectividad por las moléculas de agua y por los iones de carga difusiva adyacente; esto explica la ausencia de un aumento apreciable en  $\ln K$  para la adsorción de  $T\phi B^-$  en PS con un descenso del pH por debajo de 6 (véase curva b en la fig. IV.1.10b). Estos aniones lipofílicos tampoco muestran un descenso apreciable en  $\ln K$  con un aumento en densidad de carga negativa  $\sigma_b$ , al aumentar el pH por encima de 6. Esto puede deberse, al menos parcialmente, a la tendencia de los aniones  $T\phi B^-$  a imponer una configuración neutra con un grupo fosfato protonado sobre las cabezas polares vecinas, incluso cuando su densidad de carga media  $\sigma_b$  se aproxima al valor  $-3\mu C/cm^2$ . Un efecto adicional en esta dirección puede producirse por un desplazamiento positivo de  $\chi$  al aumentar el pH.

El efecto electrostático notablemente diferente ejercido por las cabezas polares de PS sobre los iones  $T\phi P^+$  y  $T\phi B^-$  de estructura similar pero carga opuesta plantea alguna duda sobre la validez de su uso y el de otros iones lipofílicos como pruebas de densidad de carga o del potencial iónico superficial  $\Psi_s$  en membranas que contienen moléculas de PS. De hecho, estos iones experimentan un potencial eléctrico local que ellos mismos contribuyen a alterar de forma apreciable incluso cuando su concentración en la membrana es muy baja.

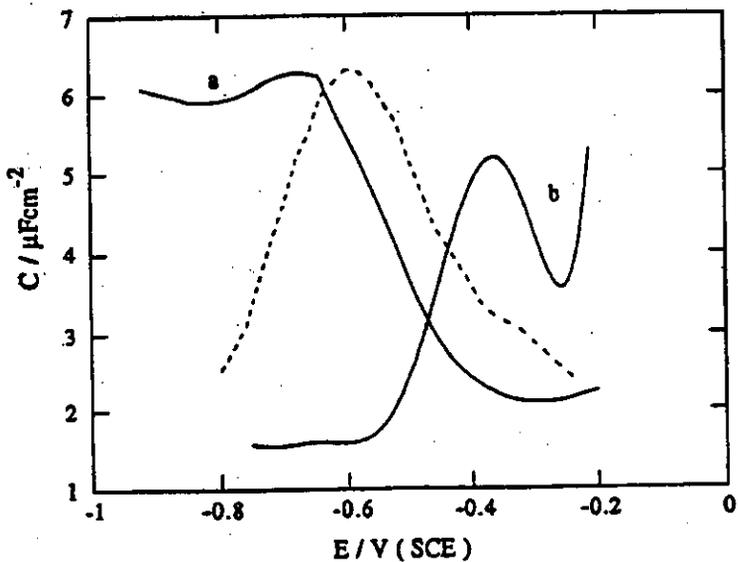
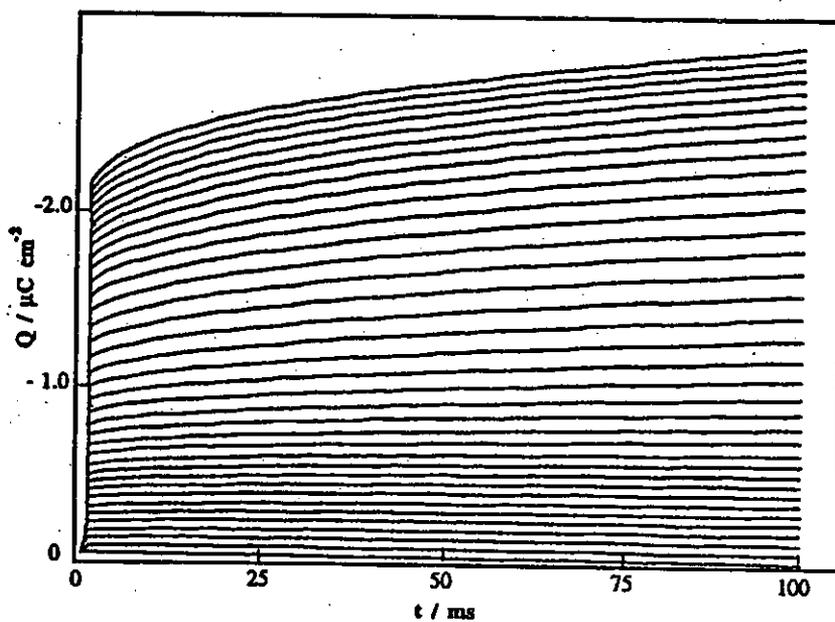


Figura IV.1.1. Curva  $C_d$  vs E para monocapas de PS en contacto con  $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$  de  $\text{T}\phi\text{P}^+$  a pH 8.9 (a) y con  $6 \cdot 10^{-6}\text{M}$  de  $\text{T}\phi\text{B}^-$  a pH 2.7 (b). La curva punteada se calculó a partir de la representación  $\sigma'_i$  vs E correspondiente a la curva  $C_d$  vs E (a) empleando la ecuación 11;  $C_0 = 1.74 \mu\text{Fcm}^{-2}$ ,  $\sigma_i = 0.47 \mu\text{Ccm}^{-2}$ .



**Figura IV.1.2.** Curvas  $Q(E, t)$  para la translocación de  $T\phi P^+ 1 \cdot 10^{-5} M$  a través de una monocapa de PS a pH 8.9 obtenidas efectuando saltos de potencial desde un valor inicial  $E_i = -0.200 V$  a un cierto valor final variable desde  $-0.200$  hasta  $-0.900 V$  a incrementos de  $-20 mV$ .

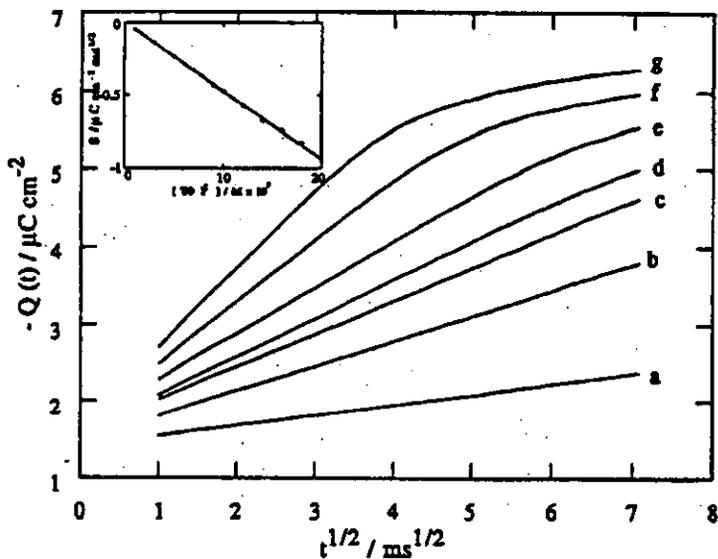


Figura IV.1.3. Curvas  $Q(t)$  vs  $t^{1/2}$  para la translocación de  $3 \cdot 10^{-5}$  (a),  $7 \cdot 10^{-5}$  (b),  $9 \cdot 10^{-5}$  (c),  $1 \cdot 10^{-4}$  (d),  $1.2 \cdot 10^{-4}$  (e),  $1.6 \cdot 10^{-4}$  (f) y  $2 \cdot 10^{-4}$  M (g) de  $T\phi P^+$  a través de una monocapa de PC a partir de un salto de potencial desde un valor inicial  $E_i = -0.200\text{V}$  hasta  $E = -0.900\text{V}$ . En el recuadro se muestra la representación de la pendiente  $s = Q(t)/t^{1/2}$  vs  $c$ , cuya pendiente es  $-160 \text{ cm s}^{1/2} \text{ mol}^{-1}$ .

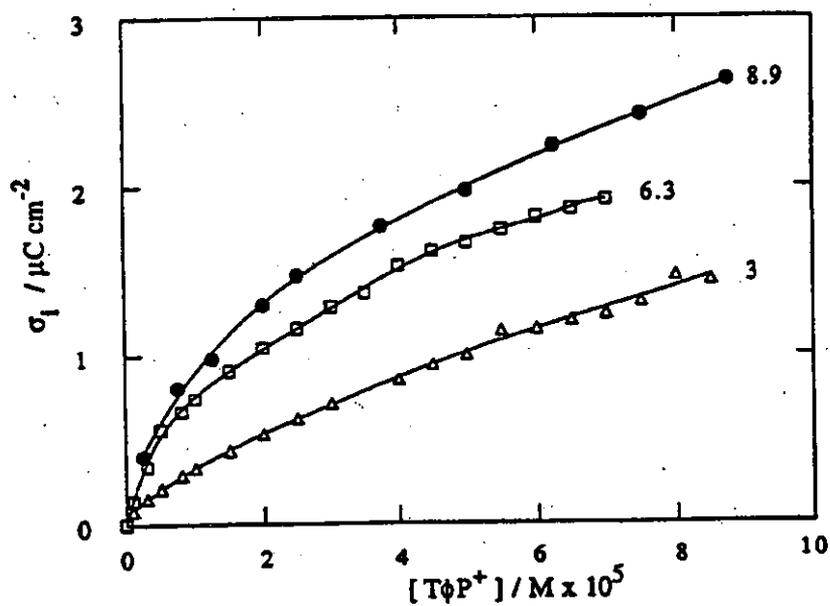


Figura IV.1.4. Representación gráfica  $\sigma_1$  vs c para la adsorción de  $\text{T}\phi\text{P}^+$  sobre una monocapa de PS. Los números en cada curva denotan valores de pH.

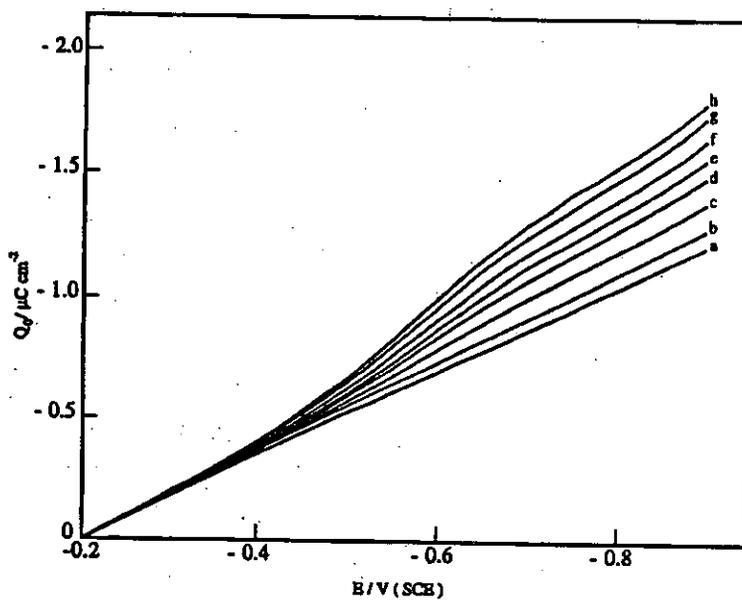


Figura IV.1.5. Curvas  $Q_0$  vs E para la translocación de  $T\phi P^+$  de concentración 0 (a),  $1 \cdot 10^{-7}$  (b),  $1.75 \cdot 10^{-6}$  (c),  $3.4 \cdot 10^{-6}$  (d),  $5.05 \cdot 10^{-6}$  (e),  $6.7 \cdot 10^{-6}$  (f),  $8.35 \cdot 10^{-6}$  (g) y  $1 \cdot 10^{-5}$ M (h) a través de una monocapa de PS a pH 4.

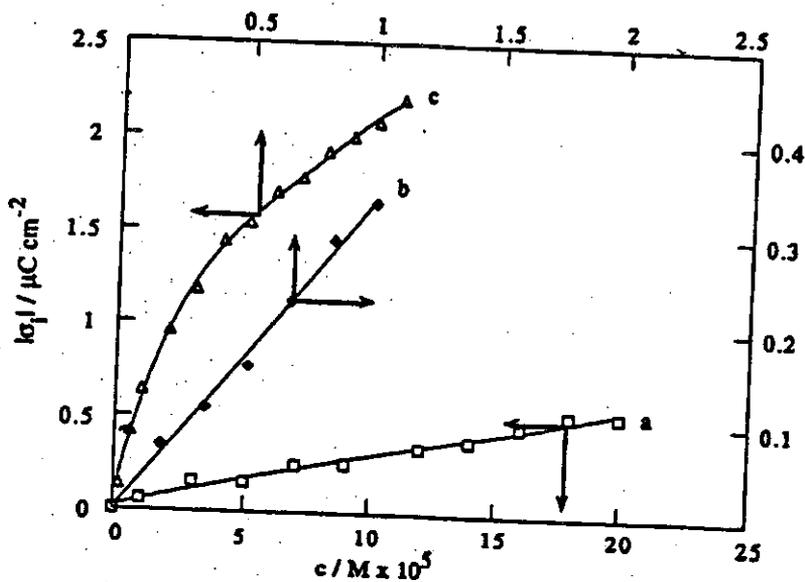


Figura IV.1.6. Representación de  $|\sigma_i|$  vs  $c$  para la translocación de  $T\phi P^+$  (a) y de  $T\phi B^-$  (c) en una monocapa de PC a partir de una disolución no tamponada de KCl 0.1M y de  $T\phi B^-$  (b) en una monocapa de PS a partir de una disolución tampón pH 5 en KCl 0.1M. Las flechas indican las escalas relativas para cada gráfico.

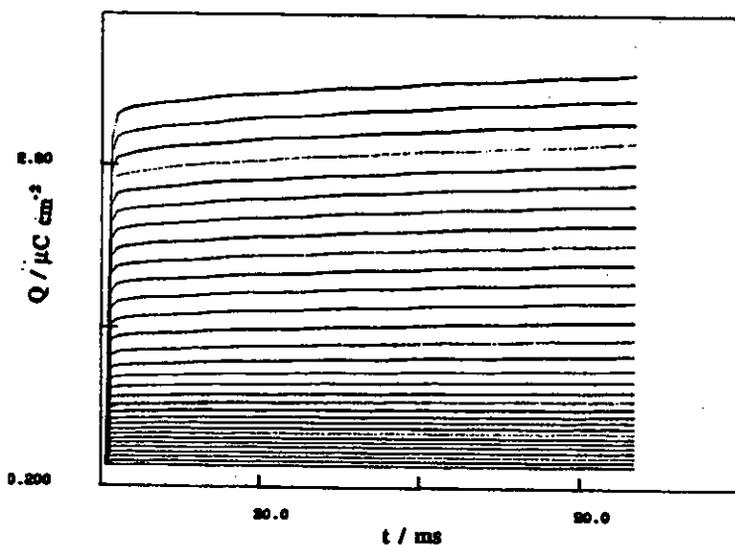


Figura IV.1.7. Curvas  $Q(E,t)$  para la translocación de  $T\phi B^-$   $1.0 \cdot 10^{-5} M$ . a través de una monocapa de PC a pH 5.4 obtenidas efectuando saltos de potencial desde un valor inicial  $E_i = -0.750V$  a un cierto valor final variable desde  $-0.750V$  hasta  $-0.150V$  a incrementos de  $-20mV$ .

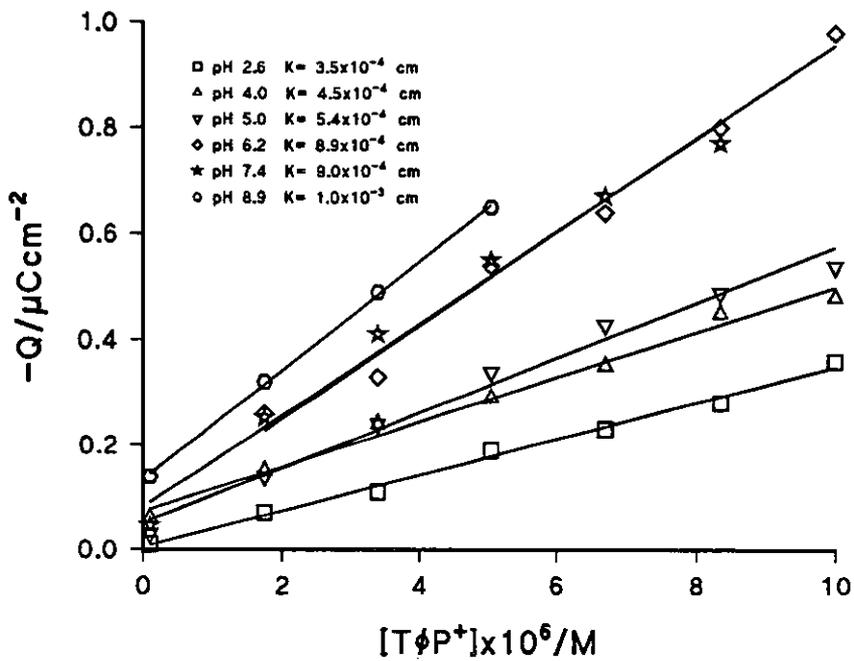


Figura IV.1.8. Representación de  $|\sigma_i|$  vs  $c$  para la translocación de  $T\phi P^+$  en una monocapa de PS a diferentes pH correspondiente a la región de Henry.

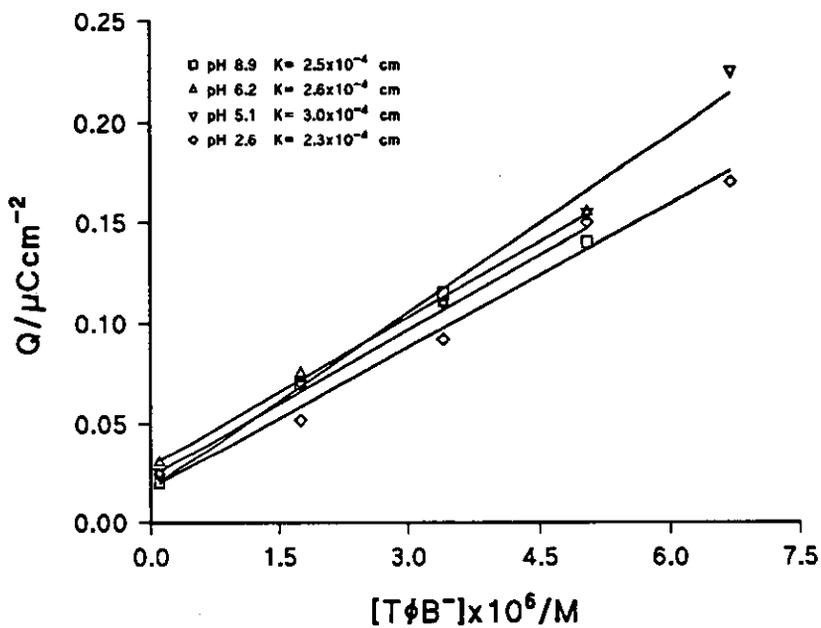


Figura IV.1.9. Representación de  $|\sigma_i|$  vs  $c$  para la translocación de  $T\phi B^-$  en una monocapa de PS a diferentes pH correspondiente a la región de Henry.

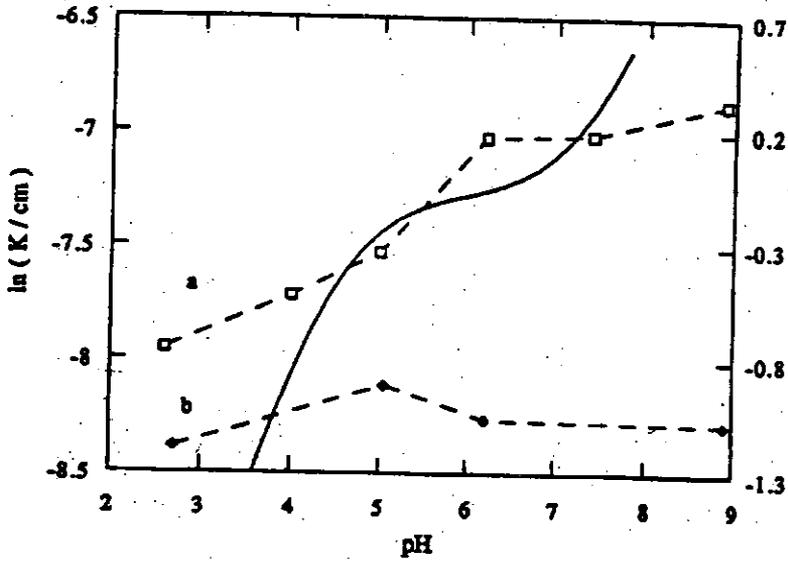


Figura IV.1.10. Gráficas de  $\ln K$  vs pH para la adsorción de  $T\phi P^+$  (a) y  $T\phi B^-$  (b) en una monocapa de PS. La curva a trazo continuo es una representación de  $-F\Psi(\sigma_i=0)/RT$  vs pH calculada a partir de la ecuación 14.

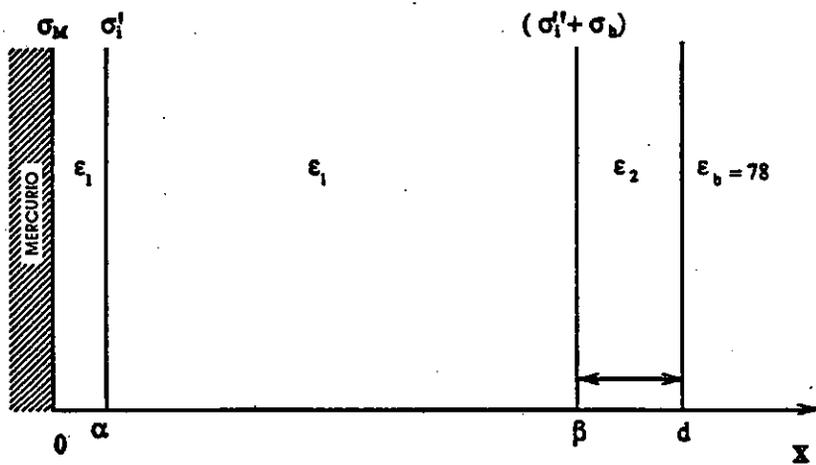


Figura IV.1.11. Representación esquemática de una monocapa lipídica depositada sobre mercurio.

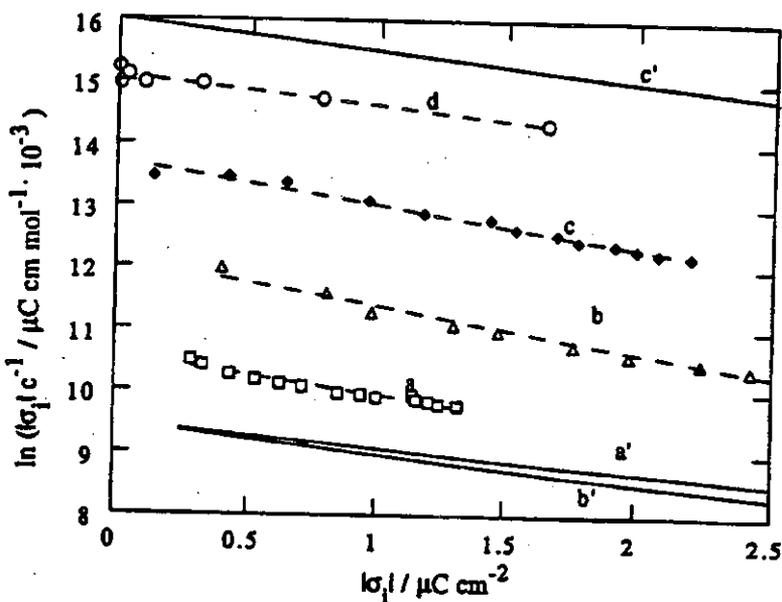


Figura IV.1.12. Representación gráfica de  $\ln(|\sigma_1|/c)$  vs  $|\sigma_1|$  para  $T\phi P^+$  sobre una monocapa de PC con disoluciones tampón a pH 3 (a) y pH 9 (b) en KCl 0.1M, para  $T\phi B^-$  en una monocapa de PC en contacto con una disolución no tamponada de KCl 0.1M (c) y para  $T\phi B^-$  en una bicapa de PC en contacto con NaCl 1M (Andersen y col., 1978) (d). Las curvas a' y b' se calcularon a partir de la ecuación 14 para una monocapa de lípido empleando  $\beta/\epsilon_1=10\text{\AA}$  e igualando  $\gamma/\epsilon_2$  a 1.25 y 0.133  $\text{\AA}$  respectivamente, mientras que la curva c' se calculó a partir de la ecuación 16 para una bicapa lipídica asumiendo un valor de  $\beta/\epsilon_1=10\text{\AA}$  y  $\gamma/\epsilon_2=1.25\text{\AA}$ . Las pendientes de dichas curvas son -0.62(a), -0.73(b), -0.68(c), -0.46(d), -0.38(a'), -0.46(b') y -0.48  $\text{cm}^2\mu\text{C}^{-1}$ (c').

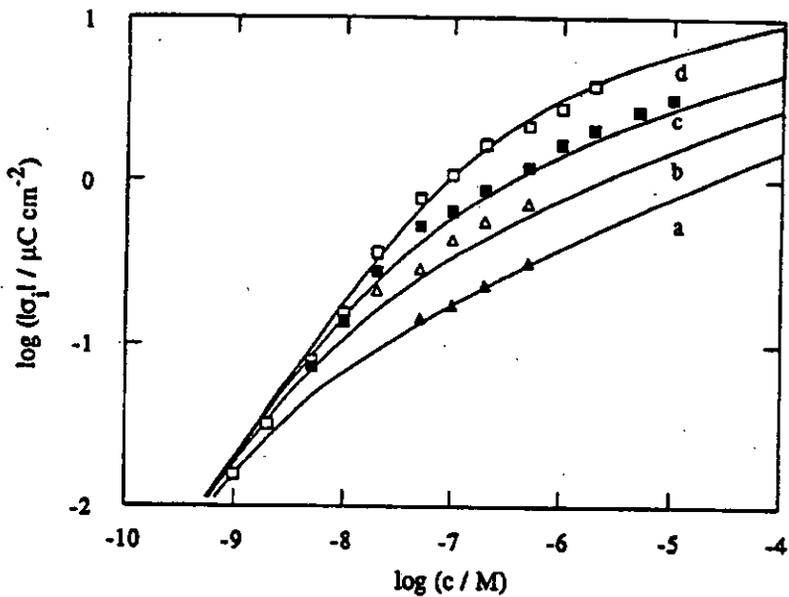


Figura IV.1.13. Gráfico de  $\log(|\sigma_1|)$  vs  $\log c$  para la adsorción de  $\text{DpA}^-$  sobre una bicapa de PC en una disolución de NaCl  $1 \cdot 10^{-4}$  (a),  $1 \cdot 10^{-3}$  (b),  $1 \cdot 10^{-2}$ (c) y 1M (d) (Wang y Bruner, 1978a). Las curvas continuas se calcularon a partir de la ecuación 16 considerando  $\beta/\epsilon_1 = 10\text{\AA}$  y  $\gamma/\epsilon_2 = 1.25\text{\AA}$ .

## **IV.2.1. Comportamiento de la L-Cisteína**

### **IV.2.1.1 Comportamiento en ausencia de fosfolípido**

Se han realizado barridos entre -800 y -200 mV/ECS comenzando por el barrido anódico a pH 7.4. Las concentraciones analizadas varían desde  $3.37 \cdot 10^{-5}$  hasta  $1.32 \cdot 10^{-4}$  M. Los voltamogramas (fig. IV.2.1, IV.2.2, IV.2.3 y IV.2.4) presentan una morfología característica de una adsorción débil de la especie reaccionante, esto es, un pico catódico con forma de parábola simétrica correspondiente a un proceso de adsorción y un pico anódico de carácter difusivo, con una separación entre ambos del orden de 60 mV. Se observa, análogamente, la presencia de los picos agudos a potenciales más anódicos, los cuales también aparecen a velocidades bajas y velocidades altas. Estos picos agudos no se observan en ningún caso a la concentración  $3.37 \cdot 10^{-5}$  M, aparecen en el caso de la velocidad más baja a  $5.10 \cdot 10^{-5}$  M al efectuar barridos sucesivos. Al aumentar la concentración, aparecen a velocidades cada vez mayores e incluso en el primer barrido. En todos los casos se observa que el pico agudo catódico aparece antes y mucho más desarrollado que el anódico, el cual frecuentemente, no se observa. El prepico catódico aparece al mismo potencial que en el caso de la cistina (véase más adelante) ( $\sim -465$  mV) mientras que el anódico aparece a potenciales más positivos, manifestándose, en el caso de la cisteína, alrededor a -385 mV mientras que para la cistina lo hace alrededor de -420 mV, si bien la concentración estudiada de cistina es mayor que la de cisteína.

Se ha determinado la carga adsorbida por integración del pico catódico, los resultados obtenidos figuran en la tabla IV.2.1:

**TABLA IV.2.1: Carga adsorbida en  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  a diferentes velocidades y concentraciones de L-cisteína sobre mercurio. Error máximo  $\pm 1.5 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ .**

V(mV/s)	[RSH]			
	$3.37 \cdot 10^{-5}$	$6.69 \cdot 10^{-5}$	$9.97 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$
50				87.1
100	38.4	63.8	74.4	78.8
300	20.5	36.2	43.2	
500	15.0	26.1	40.9	48.9

Se aprecia una disminución de la carga con el aumento de la velocidad, lo que puede deberse a una eliminación o, al menos, disminución de contribuciones difusivas que siempre son más importantes a velocidades bajas. Considerando el valor de la carga a las velocidades superiores parece que se alcanza un valor en torno a  $45 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ . Stankovich y Bard (1977) obtiene  $80 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  en condiciones de saturación de la gota lo cual se alcanza a  $3.2 \cdot 10^{-4}$  M. Interpolando el valor de la carga a  $1.3 \cdot 10^{-4}$  M en la fig. IV.2.5 se obtiene un valor cercano a  $50 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ , bastante parecido al obtenido en las presentes experiencias.

#### IV.2.1.2. Comportamiento en presencia de fosfolípido

##### IV.2.1.2.1. Efecto de la cisteína sobre el fosfolípido

Un registro de la curva voltamétrica entre 0.0V y -1.20 V permite observar el efecto de la cisteína sobre la monocapa. Se comprueba en todos los voltamogramas que a medida que aumenta la concentración de cisteína aparece una variación en la forma de los picos catódicos de reorientación de la PC (fig IV.2.6). Dicha variación consiste en modificar el primero de los picos de reorientación catódica en modo tal que disminuye su intensidad y se hace mucho más ancho. A concentraciones cada vez mayores de cisteína, llega a convertirse en una pequeña inflexión e incluso a desaparecer. En ningún caso se ha observado un desplazamiento en el potencial de los picos, que, tanto en presencia como en ausencia de cisteína aparecen a -975mV y -1050 mV/ECS, el efecto consiste, como se ha señalado, en una disminución de intensidad y un gran ensanchamiento.

De acuerdo con los estudios de Nelson y Leermakers (1990), este pico se asociaba a un proceso competitivo de la cabeza polar del fosfolípido por la superficie de mercurio, dando lugar a un cambio de orientación del fosfolípido previo a la competición del agua que originaba el segundo pico y la formación de la bicapa. Los efectos estudiados por estos autores consistían en modificar la polarizabilidad de las cabezas polares, la fluidez e insaturación y longitud e las cadenas lipídicas, lo que originaba un desplazamiento de los picos hacia potenciales más positivos o más negativos dependiendo de cada situación concreta. En este caso no parece que la presencia de cisteína modifique la hidrofobicidad de las cadenas alquílicas ni la afinidad superficial de las cabezas polares dado que no se produce modificación del potencial al cual aparece la transición, sino que se origina dicha transición de una forma más lenta, lo que puede justificar el ensanchamiento del pico.

#### **IV.2.1.2.2. Variación del potencial de inversión**

La monocapa de DOPC adsorbida sobre mercurio se muestra bastante impermeable a la cisteína, por lo que es necesario recurrir a potenciales extremos para observar los picos redox de este compuesto.

Se ha comprobado que el tiol no penetra de forma apreciable a través del fosfolípido en la región de picos catódicos puesto que realizando barridos catódicos desde -100 hasta -1200 mV no se observaba ningún comportamiento faradaico (fig IV.2.7). Por el contrario, la penetración se ha observado realizando barridos desde -800 o -600 mV iniciales hasta 0 mV. Cuando se modifica el potencial de inversión desplazándolo sucesivamente 20 mV en dirección catódica se observa que el pico de reducción obtenido en el barrido de vuelta disminuye considerablemente, de forma que cuando se llega a -80 mV consiste únicamente en una pequeña ondulación. Todas estas pruebas se efectuaron a 200 mV/s sobre la misma gota y sobre gotas diferentes. En ambos casos el resultado es el mismo. Se observa una disminución muy grande de la intensidad de los picos y un ligero desplazamiento del potencial de pico  $\sim 10$  mV en dirección anódica cuando el potencial de inversión se desplaza de 0 a -80 mV.

Dada la forma del pico, los resultados ponen de manifiesto la disminución de sustancia adsorbida, probablemente cisteinato mercúrico. El desplazamiento del pico hacia potenciales más positivos sugiere una disminución de las interacciones en fase adsorbida,

consecuencia de la disminución de la concentración superficial tal y como han puesto de manifiesto Conway y colaboradores (1974).

#### **IV.2.1.2.3. Experiencias con barrido sencillo**

La cisteína se ha estudiado a concentraciones comprendidas entre  $3.39 \cdot 10^{-5}$  M. y  $1.93 \cdot 10^{-4}$  M. y en la escala de velocidades accesible por el registrador XY.

#### **Comportamiento de la L-cisteína a través de monocapas de DOPC a pH=7.4.**

Se comenzará analizando las características del voltamograma obtenido al realizar un barrido sencillo de potencial entre -0.7 V y 0.0 V vs. ECS comenzando por el barrido anódico.

En líneas generales cabe destacar el comportamiento completamente diferente del correspondiente a la situación obtenida en ausencia de fosfolípidos (fig IV.2.8, IV.2.9, IV.2.10, IV.2.11, IV.2.12).

En el presente caso se obtiene un barrido anódico inicial completamente plano en la zona de estabilidad del fosfolípido, es decir, entre -0.8 y -0.2 V. A potenciales más anódicos de -0.2 V se constata la aparición de un pico, o más bien, una serie de picos de difícil caracterización. Esto parece indicar que la monocapa de DOPC es perfectamente impermeable a las moléculas de cisteína de la disolución y la llegada de estas a la superficie del mercurio se produce únicamente como consecuencia de la formación de los poros en la membrana debidos a los procesos de reorientación de los fosfolípidos en la región anódica. Esto produce un comportamiento irreversible, en clara asimetría con la situación en ausencia de fosfolípido. El barrido catódico siguiente presenta una banda ancha en la zona inmediatamente siguiente al potencial de inversión (0.0 V) a partir del cual pueden distinguirse tres picos de características diferenciadas. El primero de ellos (el más anódico) es un pico pequeño, muy agudo y simétrico. Experimenta un ligero desplazamiento hacia potenciales más anódicos al aumentar la concentración de cisteína en disolución (fig IV.2.13), variando entre -220V y 170 mV; esto parece indicar que el proceso asociado a la aparición de este pico se ve favorecido a altas concentraciones. El aumento de la velocidad de barrido modifica fundamentalmente su morfología, de forma que cada vez se vuelve menos agudo y más ancho. No se observa una dependencia clara de su intensidad con la velocidad.

## *Resultados y discusión*

---

El segundo de ellos consiste en una pequeña inflexión en el voltamograma en forma de triángulo, aparece alrededor de -280 mV y es independiente de la concentración y de la velocidad de barrido.

Este pico es idéntico en sus características al descrito por Laviron como pico A (ver figura A.10 en el apéndice)(Laviron, 1974) asociado a una modificación de la estructura de la monocapa de sustancia adsorbida; si bien, es necesario suponer una monocapa compacta para justificar la presencia de este pico. El tercero de los picos, el más catódico, es el más desarrollado de todos ellos. En principio se podrá describir como un pico de adsorción con una forma distorsionada respecto a la parábola simétrica.

Resulta muy difícil analizar la variación del potencial y, especialmente, de la intensidad de este pico con la velocidad de barrido y la concentración de cisteína en la disolución. Los motivos para ello son dos: el pico experimenta frecuentemente modificaciones en su morfología que van desde obtener distorsiones en forma de joroba en cualquiera de sus lados hasta dividirse claramente en dos picos. Este fenómeno se produce frecuentemente a concentraciones del orden de  $1 \cdot 10^{-4}$  M y superiores, pero también pueden apreciarse a concentraciones inferiores. Este problema dificulta la precisión en la medida del potencial y la intensidad del pico, a la vez que nos permite cuestionar si tal pico corresponde a un único proceso. Según las teorías clásicas (Laviron, Conway) no es posible la división de un pico voltamétrico de adsorción en dos al modificar la velocidad de barrido, a menos que se trate de un proceso complejo. Únicamente el tratamiento estadístico de Matsuda, Aoki, Tokuda (1987a,1987b) empleando un modelo cuasiquímico (Figura A.19 apéndice) permite explicar la aparición de dos picos en un voltamograma correspondientes a un proceso de electrodo que transcurre en una única etapa sencilla (figura A.23). Dichos autores han simulado la aparición de dos picos voltamétricos de adsorción a partir de un tratamiento estadístico de las interacciones basado en un modelo de red bidimensional y obtienen el comportamiento tipo Frumkin como caso particular.

Otro problema adicional reside en que la intensidad de este pico depende de la cantidad de cisteína que se ha podido oxidar en el barrido anódico precedente. Este hecho está ligado a la estabilidad de la membrana de forma que si el pico anódico aparece un poco antes o después, la cantidad de cisteína oxidada será diferente y esto influirá decisivamente sobre la altura del pico catódico. Como consecuencia de ello se observa que cuando se varía

la velocidad se modifica, a la vez, la cantidad de especie electroactiva, lo que justifica que no se deba esperar una dependencia excesivamente rigurosa de la intensidad con la velocidad. Las representaciones  $\log i$  vs.  $\log v$  (fig IV.2.14) no presentan nunca una pendiente próxima a 1 como correspondería a un proceso de adsorción sino que se obtienen pendientes muy variables que suelen oscilar entre 0.3 para las concentraciones más bajas y 0.6 para las más altas. Los resultados anteriores tampoco parecen sugerir la presencia de transición de fase al menos basándonos en ciertos criterios sugeridos en la bibliografía (Noel, Chandrasekaran y Basha, 1987; Sánchez Maestre, Rodríguez-Amaro, Muñón, Ruiz y Camacho, 1994) para caracterizar este tipo de procesos, lo que concuerda, en nuestro caso, con una situación física no correspondiente a una monocapa (bajas concentraciones).

#### **Cálculo de constantes de velocidad**

Se puede intetar el cálculo de la constante de velocidad a partir de los datos  $E$  vs.  $\log v$ , dado que a partir de las representaciones  $i$  vs.  $\log v$  pueden venir afectadas de mayor error como se comentó anteriormente. El cálculo a partir de  $E$  vs.  $\log v$  adolece también de algunos inconvenientes como el referido a la imprecisión del potencial de pico debido a la división en dos picos. Asimismo el intervalo de velocidades estudiado es muy estrecho y en la zona de velocidades bajas donde no se puede suponer un comportamiento claramente irreversible, las curvas  $E$  vs.  $\log v$  (fig IV.2.15) parecen indicar que nos hallamos en la zona de cuasirreversibilidad. De hecho, Matsuda, Aoki y Tokuda (1987a,1987b) observan en la simulación de los voltamogramas la aparición de dos picos, principalmente en la zona de transición de cuasirreversibilidad a irreversibilidad (figura A.23). Realmente, el cálculo de la constante se ha efectuado en una situación con condiciones lo más cercanas posible a aquellas en que se ha deducido la ecuación empleada; de forma particular, ausencia de contribución difusiva y mínima posibilidad de interacciones intermoleculares, es decir, bajas concentraciones de especie electroactiva. Con estos condicionamientos presentes se puede abordar el cálculo aproximado de las constantes a partir de la expresión deducida por Srinivasan y Gileadi (1966) (ecuación A.10) o su equivalente por Laviron (1974a y 1974b) (ec. A.44 y A.48) para un proceso irreversible con intervención de una especie adsorbida.

$$\begin{aligned}
 E_p &= E^{0'} + \frac{RT}{\alpha n_a F} \ln \left[ \frac{RT}{\alpha n_a F} \frac{k^0}{v} \right] \\
 &= E^{0'} + \frac{RT}{\alpha n_a F} \ln \left[ \frac{RT}{\alpha n_a F} k^0 \right] - \frac{RT}{\alpha n_a F} \ln v
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Para la cisteína, todos los resultados sugieren, análogamente a lo que se produce directamente sobre mercurio, que el pico 1 corresponde a la reducción del mercurial previamente formado como consecuencia de la oxidación de la cisteína a potenciales positivos. No obstante, contrariamente a lo que sucede sobre la interfase Hg/disolución acuosa, el proceso ahora es irreversible o cuasirreversible.



Conocido el valor de  $E^{0'}$  se puede estimar  $k^0$  a partir de la pendiente y la ordenada en el origen de la representación  $E$  vs.  $\log v$ . Si se admite que una vez que la cisteína penetra por la zona próxima a potencial 0 V se forma un compuesto mercurial adsorbido, tal y como sucede directamente sobre mercurio y todos los indicios así lo sugieren, el potencial  $E^{0'}$  que aparece en la ecuación se refiere al correspondiente al par redox mercurial/tiol y no a la cistina/cisteína. Para dicho valor se ha tomado -0.486 V vs ECS que corresponde al proceso redox sobre mercurio, situación en la que se comporta de forma reversible (Ralph, Hitchman, Millington y Walsh, 1994; Stankovich y Bard, 1977). Los cálculos empleando la ecuación anterior figuran en la tabla IV.2.3. donde se puede apreciar que los valores de las constantes de velocidad calculadas se encuentran dentro del orden de magnitud calculado por Laviron para distintos compuestos. Debe enfatizarse que dicho valor ha de considerarse muy aproximado dadas las suposiciones realizadas para su cálculo. En la tabla IV.2.2 se recogen los valores de las constantes de velocidad correspondientes a la reducción de algunos compuestos obtenidas de la bibliografía.

TABLA IV.2.2:

$k_p / s^{-1}$	Compuesto	Referencia
0.08-2.3	derivado de azobenceno	Degrad y Laviron, 1981
38.9	benzo-cinnoline	Laviron, 1979b
630	benzo-cinnoline	Laviron y Roullier, 1980

La tabla IV.2.3 contiene los valores de  $k^0$  calculados para los distintos valores de pendiente, ordenada en el origen y potencial de referencia.

TABLA IV.2.3:

pendiente	orde. origen	$k^0(E^0 = -0.486) / s^{-1}$	$\alpha$
$-50 \pm 7$	$-388 \pm 17$	$4 \pm 3$	0.59
$-42 \pm 5$	$-399 \pm 13$	$6 \pm 5$	0.70
$-46 \pm 5$	$-394 \pm 12$	$5 \pm 3$	0.64
$-44 \pm 6$	$-404 \pm 15$	$4 \pm 3$	0.67
$-44 \pm 6$	$-398 \pm 16$	$5 \pm 4$	0.67
$-53 \pm 9$	$-376 \pm 24$	$5 \pm 4$	0.56
$-62 \pm 6$	$-367 \pm 15$	$3 \pm 2$	0.48

Los valores de las pendientes tienen que dividirse por el  $\ln 10$  para incluirlas en el cálculo. El valor de  $\alpha$  se ha calculado a partir de la pendiente considerando un proceso bielectrónico.

#### Isoterma de adsorción

En la tabla IV.2.4 se recogen los resultados obtenidos para la carga adsorbida por integración del pico de adsorción, donde la carga se expresa en  $\mu Ccm^{-2}$ .

*Resultados y discusión*

**TABLA IV.2.4: Carga adsorbida en  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  a diferentes velocidades y concentraciones de L-cisteína sobre un electrodo de mercurio recubierto por DOPC. Er. máx.  $\pm 3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$**

V/mVs <sup>-1</sup>	[Cisteína]				
	$6.61 \cdot 10^{-5}$	$9.84 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	$1.62 \cdot 10^{-4}$	$1.93 \cdot 10^{-4}$
50	29.5	56.8	66.8	76.4	84.3
100	24.9	37.3	55.1	65.9	75.6
200	16.6	29.0	40.2	57.3	61.2
300	14.2	22.3	33.6	44.1	60.3
400	10.8	18.2	30.3	38.7	47.4
500	9.6	16.9	27.4	43.8	50.5

Los datos indican un recubrimiento del electrodo por la cisteína, mucho menor que el obtenido en ausencia de fosfolípidos. En la figura IV.2.5 se comparan los valores de la carga obtenidos en la presente memoria con los calculados por Stankovic y Bard (1977) (figura IV.2.5). Puede observarse que, a velocidades moderadas  $\sim 0.5 \text{ V/s}$ , son coincidentes con los obtenidos por nosotros correspondientes a la interfase Hg/disolución y menores en presencia de la monocapa de fosfolípido lo que resulta lógico si se considera que el electrodo, en estas condiciones, se encuentra parcialmente recubierto por una fracción de mercurial y otra de fosfolípido (fig IV.2.16). A velocidades más bajas, la contribución difusiva es evidente y no permite efectuar comparaciones directas.

**IV.2.1.2.4. Descripción de los voltamogramas de multibarrido.**

Al realizar barridos múltiples sobre una misma gota se produce una modificación en la forma e intensidad de los picos como se describirá a continuación (fig IV.2.17, IV.2.18).

En el barrido catódico, la modificación debida a barridos múltiples consiste fundamentalmente en un aumento de la intensidad de los picos. El primer pico ( $\sim 210 \text{ mV}$ ) experimenta un incremento bastante pequeño de intensidad a velocidades bajas. El segundo de los picos, el que aparece alrededor de  $-280 \text{ mV}$ , no sufre ningún tipo de modificación por el hecho de realizar barridos múltiples, ni en el potencial ni en la intensidad.

Es el pico más catódico el que experimenta modificaciones más importantes. Muestra

un incremento muy grande de la intensidad que aumenta progresivamente en cada barrido consecutivo hasta alcanzar el estado estacionario. Dicho estado se alcanza mucho más rápidamente a velocidades bajas que altas, lo que puede explicarse teniendo en cuenta que la cantidad de cisteína que puede penetrar es mayor cuanto más pequeña sea la velocidad, por lo que, en un número menor de barridos se puede alcanzar el estado estacionario. Este hecho puede racionalizarse al considerar dos factores: en primer lugar, la contribución de difusión, mayor a velocidades bajas, y, por otra parte, hay que tener presente que cada vez que se completa un ciclo, la membrana pasa durante un cierto tiempo por la región de potenciales positivos, donde experimenta reorientaciones que conducen a la formación de poros (Nelson y Leermakers, 1990). En esta región es donde la cisteína puede penetrar hacia la gota de mercurio, por lo que, en cada barrido se estará aumentando la cantidad de especie electroactiva que llega al electrodo. Este mismo razonamiento explica que se alcance dicho estado más rápidamente a concentraciones altas que bajas como, en efecto, se observa.

Cuando el pico obtenido en el primer barrido presenta una fuerte asimetría o incluso se encuentra dividido en dos picos, se comprueba que, generalmente, este efecto se acentúa en barridos sucesivos. En cada barrido se modifica la forma y puede cambiar la relación de alturas entre los dos picos iniciales, de modo que en el estado estacionario la forma y relación de intensidades de los dos picos puede ser diferente al obtenido inicialmente.

El efecto más importante observado al efectuar barridos múltiples es el que aparece en el barrido anódico. Como se había comentado, el barrido inicial consiste en una línea horizontal que muestra una clara impermeabilidad de la membrana a este tipo de compuestos hasta un potencial de cerca de -200 mV a partir del cual aparece un primer pico. A potenciales más positivos puede observarse la aparición de más picos a las velocidades más bajas, pero generalmente lo que se obtiene es una zona de gran crecimiento de la intensidad y de muy difícil caracterización asociada a la oxidación de mercurio y la formación de diferentes derivados mercuriales del producto oxidado.

La realización de barridos consecutivos sobre la misma gota modifica notablemente esta situación. En cada barrido hay un cambio gradual que consiste en una disminución de intensidad del pico inicial y en la aparición de un nuevo pico a otro potencial, el cual comienza a formarse a un potencial más anódico aunque la intensidad máxima aparezca a un valor más positivo que el inicial; consecuentemente hay un ensanchamiento del intervalo de

respuesta en la zona anódica (fig. IV.2.17 y IV.2.18).

Este proceso gradual de ensanchamiento de la zona anódica de respuesta conduce a la aparición de otro pico de carácter difusivo entre -400 y -500 mV asociado al pico principal en el barrido catódico y que es debido, probablemente, a la difusión del tiol a través de las colas de hidrocarburo hacia la disolución. Como se había comentado previamente, el proceso inverso, paso del tiol a través de la barrera de las cabezas polares, no se observa en ningún caso. La aparición de este pico está especialmente favorecida a las concentraciones más altas y velocidades más bajas, es decir, en las situaciones más favorables que inciden en un aumento de la concentración de tiol sobre la superficie de mercurio. Cuando el número de barridos es muy elevado, esta situación puede complicarse aun más apareciendo un prepico a un potencial menos anódico respecto al pico difusivo. Dicho prepico aparece a concentraciones del orden de  $1.5 \cdot 10^{-4}M$  y superiores y, en este caso, a las velocidades más elevadas.

Análogamente a lo comentado para el barrido catódico, se constata que todos los cambios mencionados más arriba se producen más rápidamente, es decir, con un número menor de barridos, para las velocidades más bajas, situación en la que se alcanza más rápidamente el estado estacionario.

#### **IV.2.1.2.5. Tiempo de agitación y potencial de preelectrolisis**

Se ha registrado la curva voltamétrica sobre una gota recién formada y después de agitar durante 5, 10, 15 y 20 minutos aplicando un potencial de -800 mV, es decir, un potencial donde la cisteína no penetra a través de la monocapa, y no se ha observado ninguna modificación apreciable en los registros (fig IV.2.19).

Una situación totalmente opuesta es la obtenida cuando la agitación se realiza bajo potencial 0.0V (fig IV.2.20). En este caso se está originando una alteración de la membrana que facilita la porosidad y, en consecuencia, la oxidación de mercurio. Por lo tanto, en esta situación se obtienen unos picos mucho más desarrollados en comparación con los obtenidos sobre una gota recién formada. Después de agitación durante 1 o 3 minutos con potencial 0.0 V la forma de los voltamogramas en el primer barrido es análoga a la forma obtenida en estado estacionario con una gota sin agitación, es decir, picos catódicos muy desarrollados y aparición de un pico anódico difusivo a  $\sim -325$  mV. Sin embargo, se observa una diferencia

## *Resultados y discusión*

---

muy importante al realizar barridos sucesivos manteniendo o sin mantener la gota a potencial 0.0V, que consiste en que sobre una gota recién formada se obtiene el registro correspondiente al primer barrido y se observa un crecimiento de los picos en los barridos siguientes, así como la aparición de los picos anódicos. Cuando se mantuvo el potencial inicialmente a 0.0V durante un cierto tiempo, se obtiene un registro en el primer barrido correspondiente al obtenido en estado estacionario en el caso anterior y al efectuar barridos sucesivos se observa una disminución de los picos que afecta principalmente al pico catódico de adsorción ( $\sim -465$  mV) y al anódico de difusión en menor medida. Todo ello sugiere que después del tiempo de preelectrolisis a potencial 0.0 V se alcanza el recubrimiento total del electrodo, por lo que, en barridos sucesivos disminuye la intensidad de corriente debido a la disminución de la cantidad de sustancia que llega a la superficie electródica por difusión (IV.2.20).

Se ha comprobado que después de agitar 3 minutos con potencial 0.0 V la capacidad diferencial del sistema se ha modificado con respecto a la del fosfolípido. Se observa un pico a potencial  $\sim -0.4$  V que desciende hasta alcanzar un mínimo alrededor de  $-530$  mV de  $C_d \approx 2.53 \mu\text{Fcm}^{-2}$  que se mantiene durante  $-120$  mV, vuelve a crecer muy rápidamente formando un pico y posteriormente se observa un nuevo pico; ambos coinciden prácticamente en potencial y capacidad con los picos de reorientación catódica del fosfolípido, es decir, los correspondientes a la formación de la bicapa porosa. El pico a  $-0.4$  V corresponde al de desorción del cisteinato sobre mercurio; a continuación se vuelve a un mínimo de  $C_d$  ligeramente superior al de la DOPC pero marcadamente diferente del correspondiente al electrolito soporte a este potencial ( $\sim 15 \mu\text{Fcm}^{-2}$ ). A continuación se obtienen dos picos, el primero corresponde al primer pico catódico de reorientación de la PC dado que el segundo corresponde claramente a este proceso. Por tanto, se ve que después de agitar al potencial de 0.0V, la cantidad de cisteína adsorbida sobre mercurio es muy grande y enmascara el efecto del fosfolípido hasta que la cisteína se ha desorbido, no obstante, el fosfolípido permanece como se comprueba del hecho que se obtengan sus picos de reorientación catódica prácticamente inalterados. También se han efectuado experiencias a aplicando el potencial de preelectrolisis 0.0 V sin agitar durante un cierto tiempo. El resultado es similar a lo que sucedía en presencia de agitación; se observa una disminución en la intensidad de los picos en barridos sucesivos, si bien, en menor medida que cuando hay agitación.

#### **IV.2.1.2.6. Comportamiento de la cisteína a diferentes valores de pH.**

Hasta ahora se ha prestado especial atención al valor de pH 7.44, al cual se refieren los resultados descritos anteriormente; no obstante, se realizaron experiencias de variación de la concentración y velocidad de barrido a los pHs 2.7, 5.9, 6.5, 7.1 y 8.2. Además del desplazamiento de los picos se pueden observar pequeñas modificaciones de los mismos, lo que revela un comportamiento ligeramente distinto dependiendo del estado de protonación de los grupos amino y carboxílico de la cisteína.

A pH 5.9 los voltamogramas (fig IV.2.21) tienen una apariencia más sencilla que a pH 7.4. En el barrido anódico, la región de reactividad aparece a potenciales más anódicos que -150 mV y presenta igualmente una apariencia confusa en la que no se distinguen claramente picos bien definidos excepto, algunas veces, a las velocidades más pequeñas.

En el barrido catódico siguiente, el número de picos se reduce a dos, no aparece el pico intermedio. El pico más anódico, que se observa alrededor de -130 mV, está mucho mejor formado que a pH 7.4. A velocidades de 50 y 100 mVs<sup>-1</sup> está muy desarrollado y es muy estrecho, presentando un ancho de semipico comprendido entre 5 y 10 mV. A medida que aumenta la velocidad disminuye de intensidad y se hace más ancho. El pico principal aparece alrededor de -400 mV y presenta aspecto adsorptivo en forma de parábola asimétrica con una cola. A la concentración más baja, no se observan distorsiones en el pico que indiquen una posible división en dos, y se aprecia un claro ensanchamiento del mismo con la velocidad de barrido. A las concentraciones de  $9.84 \cdot 10^{-5}M$  y  $1.30 \cdot 10^{-4}M$  se perciben divisiones en el pico a las velocidades más bajas, 50 y 100 mVs<sup>-1</sup>, retornando a la forma normal al aumentar la velocidad.

A pH 6.52 la forma general del voltamograma (fig IV.2.22) es la misma, si bien cabe destacar un comportamiento especial asociado al primer pico catódico, que a este pH aparece alrededor de -150 mV. Este efecto consiste en la aparición de un pequeño pico ancho pegado a él a potenciales ligeramente más catódicos que le hace disminuir de intensidad. Cuando aumenta la concentración se llega a la situación en que desaparece totalmente el primer pico y aparece este nuevo pico a un potencial más catódico ( $\sim -200mV$ ) con la misma forma que el pico número dos descrito a pH 7.44. Esta situación se produce únicamente a la velocidad de barrido de 50 mVs<sup>-1</sup>.

A la velocidad de barrido de 100 mVs<sup>-1</sup> se observan los dos picos, uno pegado al otro,

## *Resultados y discusión*

---

y a velocidades superiores se vuelve a la situación de un solo pico, desapareciendo totalmente cualquier indicio de este nuevo tercer pico. El efecto mencionado anteriormente comienza a observarse a la concentración de  $9.84 \cdot 10^{-5} \text{M}$  donde únicamente a  $50 \text{ mVs}^{-1}$  aparece como una pequeña joroba pegada al pico a  $-135 \text{ mV}$ , el cual, como se indicó, sufre una pequeña disminución de intensidad. A  $1.30 \cdot 10^{-4} \text{M}$  se repite la situación anterior pero a la velocidad de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ , mientras que a  $50 \text{ mVs}^{-1}$  el primer pico se ha reducido muchísimo y el nuevo pico aparece más separado ( $\sim -190 \text{ mV}$ ). A las concentraciones  $1.62 \cdot 10^{-4}$  y superiores el primer pico ha desaparecido totalmente a  $50 \text{ mVs}^{-1}$  y la presencia del nuevo pico es apreciable hasta velocidades de  $200 \text{ mVs}^{-1}$  con características idénticas al descrito a pH 7.4.

A pH 7.07 el efecto anteriormente descrito se hace más evidente, de forma que se observa a todas las concentraciones excepto a  $6.61 \cdot 10^{-5} \text{M}$  donde sólo se aprecia a las velocidades más bajas. Para el resto de las concentraciones aparece claramente y de forma más persistente ya que la presencia del tercer pico se aprecia a todas las velocidades. En este caso ambos picos ya aparecen perfectamente separados, el primero alrededor de  $-170 \text{ mV}$  y el segundo a  $-250 \text{ mV}$ . Asimismo, se constata que cuanto mayor es la concentración, mayor es la disminución experimentada por el primer pico a  $50 \text{ mVs}^{-1}$  ( fig IV.2.23) hasta el punto que a  $1.93 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  prácticamente no se observa.

Al pH 8.16, el más básico estudiado, se pueden apreciar algunas peculiaridades en los voltamogramas (fig IV.2.24). En este caso, aparecen en todas las situaciones los dos picos catódicos a potenciales alrededor de  $-270$  y  $-320 \text{ mV}$ . El primer pico no mantiene su característica habitual de ser un pico muy agudo, sino que, a este pH, es un pico de muy poca intensidad, por tanto, bajo y ancho. El pico siguiente ( $-320 \text{ mV}$ ) aparece más desarrollado a este pH y es comparable en intensidad y forma al anteriormente descrito. Su potencial se mantiene constante con la concentración y la velocidad. El pico más catódico sigue siendo el principal y mantiene su característica de pico adsorptivo con una gran cola. Comienza siendo un pico bastante estrecho a la velocidad más baja ( $30 \text{ mV}$  de ancho de semipico) y se hace más ancho ( $70 \text{ mV}$ ) a medida que aumenta la velocidad. En toda esta serie de experiencias, este pico se mantiene como un único pico, sin observarse división en dos ni la aparición de jorobas. Todos los picos aparecen desplazados hacia potenciales más catódicos.

A pH 2.7 el comportamiento es bastante diferente porque, dado el desplazamiento

## *Resultados y discusión*

---

experimentado por todos los picos hacia potenciales anódicos, sólo se detecta el pico principal (fig IV.2.25) que aparece entre -150 y -190 mV dependiendo de la concentración y velocidad. Este pico presenta aspecto adsorptivo con una forma de parábola más simétrica que la obtenida a pHs más alcalinos, donde es más notable la presencia de una cola de difusión. Generalmente en su lado anódico presenta una pequeña inflexión que, a las velocidades más bajas, se define como un pico cuyo potencial varía entre -115 y -160 mV según se desplace el pico principal.

El análisis de la dependencia del potencial de cada uno de los picos con el pH (fig IV.2.26) proporciona una pendiente de -33 para el más anódico, -59 para el pequeño pico intermedio y -66 para el pico principal. Hay que señalar que del pico principal se poseen datos a todos los pHs. El pico intermedio sólo se analizó a los tres pHs más alcalinos dado que a 5.9 no aparece y a 6.4 no está claramente diferenciado del primer pico catódico. Para el primer pico, el más anódico, no se consideró el pH 2.7, donde no aparece, ni el pH 8.2 dado que este valor se separa bastante del comportamiento lineal. Es de destacar que este pico, a este pH, presenta características bastante diferentes de las mostradas a pH inferiores.

En relación con los resultados anteriores se pueden efectuar las siguientes observaciones:

-En general, se observa una caída brusca del pico A en la reducción a medida que vamos hacia pHs más ácidos y a altas concentraciones, lo que sugiere una mayor compacidad del mercurial, que puede estar asociado a una menor solubilidad del mismo y a mayores interacciones tipo puente de hidrógeno en la capa adsorbida.

-Los picos que aparecen en la zona B, dada su forma aguda y magnitud de los mismos, sugieren una naturaleza capacitiva.

-Las alteraciones en la forma de los picos observadas al modificar la concentración y velocidad (aparición de picos con diferente morfología, dobles picos, ...) se pueden interpretar, como se ha dicho previamente a pH 7.4, como consecuencia de un aumento de las interacciones intermoleculares. Algunos de estos hechos se pueden explicar mediante los desarrollos de Matsuda, Aoki y Tokuda (1987a, 1987b), el menos de forma cualitativa.

-La presencia de lazos en la corriente base (fig. IV.2.10-12, IV.2.21-24) sugiere una modificación importante de la capacidad como consecuencia de la formación de mercuriales.

## IV.2.2. Comportamiento de la L-Cistina

### IV.2.2.1. Comportamiento de cistina en ausencia de fosfolípidos

El estudio de la cistina se realizó únicamente a pH 7.4. Este compuesto presenta una dificultad experimental añadida debido a su baja solubilidad, lo que obliga a partir de disoluciones inicialmente muy diluidas, y, consecuentemente, se requieren adiciones muy grandes en célula para alcanzar concentraciones de trabajo del orden de  $10^{-5}$ M. El tampón empleado fue el fosfato en concentración del orden  $10^{-3}$ M y se observó que se mantenía el pH incluso para las adiciones más elevadas.

Se ha estudiado el comportamiento redox de la cistina en agua a dos concentraciones  $4.59 \cdot 10^{-5}$  y  $2.14 \cdot 10^{-4}$ M en el intervalo de potencial de -200 a -800 mV vs. ECS comenzando por el barrido catódico (fig IV.2.27, IV.2.28, IV.2.29).

El comportamiento observado es muy diferente para cada concentración. A la concentración de  $4.59 \cdot 10^{-5}$ M (fig IV.2.27, IV.2.28) se obtiene un voltamograma que presenta un pico catódico de adsorción y un pico anódico difusivo, lo que constituye la morfología característica de un sistema donde la especie reaccionante se encuentra débilmente adsorbida. Las intensidades de pico catódico y anódico son proporcionales a la velocidad y la raíz cuadrada de la velocidad respectivamente (fig IV.2.30, IV.2.31). En lo que se refiere al potencial de pico, se observa una independencia con respecto a la velocidad para ambos picos, si bien, esta independencia se obtiene preferentemente a las velocidades más elevadas (fig IV.2.32, IV.2.33). En el caso del pico catódico hay un desplazamiento del orden de 40 mV en dirección catódica cuando la velocidad varía de 40 a 400 mV/s, siendo a partir de esta velocidad cuando el potencial se mantiene constante.

De la relación  $i_{pa}/i_{pc}$  se obtienen siempre valores inferiores a la unidad (fig IV.2.34), alrededor de 0.30 como se postula para este tipo de procesos (Sastre y López Fonseca 1993, Bard 1980) a altas velocidades. No obstante, para velocidades muy bajas se postula una relación igual a la unidad que no se cumple para el presente caso donde a las velocidades más bajas ( $\sim 40$  mV/s) se obtienen valores de la relación de corrientes próximas a 0.5.

La medida de la diferencia de potencial entre el pico catódico y el anódico conduce a un valor prácticamente constante a todas las velocidades e igual a 60 mV (fig IV.2.34). Si se tratase de un proceso difusivo esta separación correspondería a un comportamiento nernstiano con intercambio de un electrón.  $\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = 59/n$  (25 °C) (Bard 1980).

## Resultados y discusión

---

A la concentración de cistina  $2.14 \cdot 10^{-4}$  M (fig IV.2.29) el voltamograma presenta diferencias importantes respecto al descrito anteriormente. En primer lugar muestra un aspecto que recuerda mucho más el de un comportamiento difusivo, especialmente a velocidades bajas. A velocidades altas los voltamogramas ya son mucho más parecidos a los obtenidos para  $[RSSR] = 4.59 \cdot 10^{-5}$  M. Este hecho es perfectamente congruente con un proceso de adsorción débil de la especie oxidada como el observado anteriormente, dado que en este caso la diferencia de energías entre la especie adsorbida y disuelta es pequeña y no permite observar un postpico de adsorción separado del pico difusivo. Por tanto, los dos efectos aparecen reflejados en la misma onda. La dependencia de la forma del voltamograma con la velocidad de barrido puede explicarse teniendo en cuenta que la cantidad de sustancia adsorbida y, consecuentemente, la carga eléctrica producida en su reducción son independientes de  $v$ , mientras que el valor de esta variable, al modificar el tiempo de electrolisis, afecta a la cantidad de sustancia aportada por difusión. A valores bajos de  $v$  la cantidad de sustancia que llega por difusión es mayor que la cantidad adsorbida y los resultados se aproximan a los obtenidos en ausencia de adsorción, mientras que a velocidades altas predomina la aportación de sustancia adsorbida obteniéndose un voltamograma similar al de un proceso de adsorción sin complicación por difusión, tal y como se observa experimentalmente.

Los potenciales de estos dos picos siguen la línea de lo discutido anteriormente a bajas concentraciones (fig IV.2.32, IV.2.33), es decir, se mantienen constantes a partir de una velocidad de 400 mV/s con la salvedad que el pico anódico experimenta un ligero desplazamiento hacia valores más positivos entre 50 y 300 mV/s contrariamente a lo que sucedía a  $4.59 \cdot 10^{-5}$  M donde el desplazamiento en esta región era hacia valores más negativos. El pico catódico permanece constante en todo el intervalo de velocidades. Con respecto a las intensidades de pico se mantiene la dependencia con  $v$  y con  $v^{1/2}$  para el pico catódico y anódico respectivamente (fig IV.2.30, IV.2.31) y el cociente entre ambos se mantiene inferior a la unidad para todas las velocidades (fig IV.2.34). La diferencia de potencial entre el pico catódico y el anódico varía ligeramente entre 40 mV para las velocidades más pequeñas (30, 50 mV/s) y 65 o 70 mV para las más altas, tomando un valor medio de 56 mV (fig IV.2.35).

Un hecho relevante observado en estos voltamogramas es la presencia de un par de

picos muy agudos a potenciales ligeramente más positivos que el pico catódico y anódico por tanto, al principio (-470 mV) y al final (-430 mV) del pico catódico y anódico respectivamente (fig IV.2.29). Las características más señaladas observadas en estos picos son el ser muy estrechos, estar más desarrollado el catódico que el anódico, ensancharse y disminuir de intensidad al aumentar la velocidad de barrido y aparecer menos desarrollados en el primer barrido mostrando un importante crecimiento en barridos posteriores. A velocidades altas es frecuente que no se observen en el barrido inicial y aparezcan en posteriores barridos consecutivos.

Dado que la presencia de estos picos no se observó a la concentración más baja parece probable que estén asociados a una situación de saturación de la gota y, por las características indicadas, a fenómenos de transición de fase debidos a las fuertes interacciones entre las moléculas adsorbidas. El desarrollo de estos picos en barridos sucesivos puede explicarse considerando que inicialmente la sustancia adsorbida sobre el electrodo será mayoritariamente la cistina. Después del barrido catódico, esta se transforma en cisteína, la cual, en la posterior reducción, origina un derivado mercurial que es el que se encuentra mayoritariamente adsorbido en posteriores barridos, dado que no se regenera la cistina.

Considerando que esta es la principal diferencia entre la situación inicial en el primer barrido y la que se tiene después de él, cabe suponer que es el derivado mercurial el que experimenta interacciones muy importantes al saturar la gota de mercurio y genera el pico capacitivo consecuencia de un proceso de transición de fase que, probablemente, conduzca a la formación de una capa más compacta sobre la gota de mercurio como proponen Stancovich y Bard (1977).

Se ha calculado la carga adsorbida por integración del pico catódico para las dos concentraciones estudiadas y a diferentes velocidades obteniéndose los resultados que figuran en la tabla IV.2.6.

### Resultados y discusión

**TABLA IV.2.6: Carga adsorbida en  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  a diferentes velocidades y concentraciones de L-cistina sobre mercurio. Error máximo  $\pm 3 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ .**

[RSSR] = $2.14 \cdot 10^{-4}$ M		
$v / \text{mVs}^{-1}$	200	500
$Q / \mu\text{Ccm}^{-2}$	47.0	36.8
[RSSR] = $4.59 \cdot 10^{-5}$ M		
$v / \text{mVs}^{-1}$	200	500
$Q / \mu\text{Ccm}^{-2}$	38.9	33.1

Estos valores indican que la carga es un poco mayor a velocidades bajas, especialmente en el caso de la concentración más elevada, lo que confirma el mayor aporte de sustancia debido a la difusión; en consecuencia, se pueden considerar valores más fiables los obtenidos a velocidades elevadas ya que se minimiza el aporte difusivo. Dado que el valor a ambas concentraciones es muy parecido se puede pensar que se ha alcanzado la saturación de la gota lo que corresponde, según esto, a un valor de  $\sim 39 \mu\text{Ccm}^{-2}$ . El valor obtenido por Stancovich y Bard (1977) en condiciones análogas es de  $41 \mu\text{Ccm}^{-2}$ .

#### IV.2.2. Comportamiento redox de la cistina en presencia de fosfolípidos

Se comenzó analizando la capacidad de penetración de la cistina a través de la monocapa. Se encontró que la cistina no posee el suficiente carácter lipofílico para atravesar la membrana en la región del mínimo de capacidad diferencial, siendo necesario llegar a la zona de reorientación del fosfolípido y, por tanto, a la zona de formación de poros para obtener una respuesta voltamétrica del proceso redox de la cistina sobre el mercurio. Asimismo se comprobó que dicha penetración se produce preferentemente por la zona anódica, es decir, cuando se somete a la membrana a potencial cero. Para comprobar este hecho se realizaron barridos comenzando en dirección anódica y en dirección catódica.

Se observó que cuando se realizaba un barrido comenzando por el barrido anódico y partiendo de un potencial catódico respecto al de los picos de reorientación, la penetración de cistina era mínima (fig. IV.2.7a). Asimismo, si se mantenía la gota a un potencial de -1400 mV durante tres minutos con agitación y posteriormente se realizaba un barrido entre -

## *Resultados y discusión*

---

0.7 y 0.0 V no se observaba respuesta importante. Cuando se comenzaba por el barrido catódico se obtuvo una fuerte dependencia del potencial inicial. Cuando dicho potencial era -100 mV no se obtenía respuesta ni siquiera llegando hasta -1200 mV. Sin embargo, se obtenían picos muy desarrollados cuando el potencial inicial era de 0.0 V.

La morfología general de las curvas (fig IV.2.36) es muy similar a la discutida previamente para la cisteína.

En el barrido catódico se obtienen dos picos, el primero de ellos muy agudo aparece a un potencial de -240 mV independientemente de la velocidad de barrido. El segundo es un pico mucho más grande y ancho con la morfología típica de un pico de adsorción, experimenta un desplazamiento hacia potenciales más negativos al aumentar la velocidad de barrido y aparece en torno a los -400, -500 mV. Se observa que la intensidad de estos picos es muchísimo mayor cuando el barrido comienza en dirección catódica que cuando se barre el mismo intervalo de potencial comenzando en dirección anódica (fig IV.2.37). Esto es debido a que al comenzar por el barrido catódico la gota está más tiempo a potencial cero, con lo que el tiempo que los poros en la membrana permanecen abiertos para la penetración de cistina es mucho mayor. Dada la dificultad de controlar exactamente este tiempo previo al barrido, resulta inútil realizar medidas cuantitativas de intensidad de pico, puesto que estarán muy influidas por este tiempo de apertura del poro. En el barrido anódico se obtiene un pico alrededor de -350 mV asociado al pico catódico principal pero de carácter difusivo y de mucha menor intensidad que su homólogo catódico. No obstante, la separación entre ellos es superior a 100 mV, lo que no permite pensar en un proceso reversible.

A potenciales más anódicos, y no siempre, se puede observar un cuarto pico que parece asociado con el primer pico descrito en el barrido catódico (fig IV.2.36). Aparece a un potencial próximo a -190mV y es de difícil caracterización por su proximidad a la zona de oxidación del mercurio.

El hecho más relevante observado es que si se realiza un segundo ciclo (fig IV.2.36) y posteriores barridos, la intensidad de estos picos disminuye de manera muy importante, comportamiento justamente opuesto al de la cisteína, donde la intensidad de los picos aumenta en barridos sucesivos. La explicación de este hecho probablemente resida también en el tiempo inicial que ha podido penetrar la cistina a través de los poros. Este tiempo previo al primer barrido es muy superior al tiempo que se abre el poro cuando se realiza un

segundo barrido o barridos consecutivos, puesto que en este caso depende de la velocidad de trabajo e incluso para el barrido más lento ( $200 \text{ mVs}^{-1}$ ) es un tiempo mucho más pequeño. Por tanto, el aporte de cistina después del primer barrido es mucho menor que en el instante inicial, y de la disminución del pico, se puede concluir que este aporte es también menor que la pérdida por difusión del producto reducido hacia el interior de la membrana.

Cuando se parte de la disolución de cisteína se produce un aporte difusivo de cisteína de la disolución que será mayor que la pérdida por difusión del producto reducido desde la gota hacia el exterior con lo que los barridos sucesivos aumentará la intensidad de los picos. Cuanto mayor sea la velocidad más desfavorecido se verá el proceso más lento, es decir, la pérdida de especie oxidada y, por tanto, mayor será el incremento de intensidad.

Si se parte de una disolución de cistina el razonamiento es el mismo pero cambian los sentidos de las corrientes difusivas. Se tendrá un aporte de cistina desde la disolución a velocidad más lenta que la pérdida de cisteína formada sobre el mercurio por lo que el segundo barrido da lugar a una intensidad de picos menor dado que es mayor la pérdida que la ganancia de especie electroactiva. Asimismo el aumento de velocidad desfavorece especialmente la difusión de cistina desde la disolución para la que la disminución de la intensidad de los picos resulta más evidente.

Otra diferencia en los voltamogramas de las dos especies consiste en que, para el caso de la cisteína, el pico catódico presenta siempre la forma de pico adsorptivo a cualquier velocidad y concentración, mientras que el de la cistina tiene forma de pico difusivo a la concentración más elevada y las velocidades más bajas, como se discutió previamente. Esta diferencia es fácilmente explicable considerando que para la cistina, esta era la especie presente en el medio de la disolución por lo que había cantidad suficiente para generar un aporte importante por difusión que llegase a ser mayor que la cantidad adsorbida sobre la gota. Cuando se parte de cisteína, la única especie oxidada es la generada en el barrido anódico inicial, por lo que no se dispone de una cantidad importante de especie oxidada que pueda llegar a la gota por difusión, ni siquiera en el caso de las concentraciones más altas. Esto hace que cuando se parte de cisteína se observe siempre un pico de reducción de carácter adsorptivo.

Se realizaron medidas de la carga adsorbida por integración del pico catódico a la [RSSR] de  $4.59 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  cuando se partía del barrido catódico. Los resultados figuran en la

tabla IV.2.7.

**TABLA IV.2.7: Carga adsorbida en  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  a diferentes velocidades de L-cistina sobre un electrodo de mercurio recubierto de DOPC. Error máximo  $\pm 2 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ .**

$V/\text{mVs}^{-1}$	200	300	400	500
$Q/\mu\text{Ccm}^{-2}$	23.9	30.2	27.7	30.8

Si se comparan los potenciales de pico en ausencia y en presencia de fosfolípido se puede comprobar que ambos picos aparecen desplazados catódicamente con respecto a los obtenidos en DOPC. Esto podría explicarse suponiendo un efecto del fosfolípido sobre la doble capa de forma que su presencia provoca una caída de potencial positiva con lo que la superficie del mercurio se encontraría a un potencial más negativo respecto al que tendría directamente sobre la interfase mercurio/agua para la misma diferencia de potencial total aplicado. Si sólo se considerase este efecto cabría esperar un desplazamiento idéntico del pico catódico y del anódico, sin embargo, esto no es así y el desplazamiento en agua respecto al fosfolípido es del orden de  $-40 \text{ mV}$  para el pico catódico y de  $-220 \text{ mV}$  para el anódico. Ahora bien, hay que considerar que la presencia del fosfolípido no sólo modifica el potencial sobre la gota de mercurio sino que también aumenta la irreversibilidad del proceso, lo que se manifiesta, entre otras cosas, con el aumento de la diferencia de potencial entre el pico catódico y anódico.

### IV.2.3. Comportamiento de la 2-mercaptopiridina

#### IV.2.3.1. Voltametría cíclica de la 2-mercaptopiridina

Se ha estudiado el comportamiento redox de la 2-mercaptopiridina (SHPy) a través de monocapas autoorganizadas de dioleilfosfatidilcolina adsorbida sobre mercurio a pH 7.4.

En primer lugar se constata que esta sustancia posee una capacidad de permeación a través de la monocapa lipídica mucho mayor que la observada para la cistina y cisteína estudiadas previamente. Esto se comprueba por el hecho de que aparezcan los picos voltamétricos sin que sea necesario llegar a las zonas de potenciales correspondientes a procesos de reorientamiento de la monocapa donde se facilita la penetración del medio acuoso a través de los poros formados en la capa lipídica (fig IV.2.38). Este hecho sugiere que la

## Resultados y discusión

naturaleza aromática y la baja polaridad de la molécula de SHPyr a este pH le confieren el suficiente carácter lipofílico para atravesar la zona apolar correspondiente a la cadena hidrocarbonada de la monocapa de DOPC tal y como se discutirá más adelante.

En el barrido anódico inicial, realizado entre -700 y 0 mV, se observa la presencia de un pico de oxidación del tiol de carácter difusivo proporcional a la concentración y a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (fig IV.2.39, IV.2.40). El potencial de pico se desplaza anódicamente al aumentar la velocidad de barrido. La magnitud de este desplazamiento disminuye a medida que se aumenta la concentración de SHPyr en solución (fig IV.2.41), lo que no permite determinar claramente la naturaleza reversible o irreversible del proceso. Considerando un proceso de transferencia bielectrónico y comportamiento irreversible con  $\alpha = 0.45$ , obtenido a partir de la diferencia entre el potencial de pico y el de semipico ( ec. 3), se ha calculado el coeficiente de difusión de la SHPyr obteniéndose un valor de  $D_R 3.9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

$$E_p - E_{p/2} = \frac{47.5}{\alpha n} \quad (3)$$

$$I_p = 2.99 \cdot 10^{-5} n (\alpha n_\alpha)^{1/2} A C_0^* D_o^{1/2} v^{1/2}$$

El barrido catódico presenta un comportamiento muy variable dependiendo de la velocidad de barrido y de la concentración de SHPyr en solución (fig IV.2.42, IV.2.43, IV.2.44). A concentraciones bajas y velocidades altas aparece un único pico de adsorción a potencial alrededor de -350 mV. Este pico experimenta un desplazamiento en dirección catódica al aumentar la velocidad de barrido. El hecho más llamativo es el incremento de complejidad en el comportamiento catódico cuando aumenta la concentración de SHPyr. A las velocidades más bajas, se observa la aparición de otro pico a potenciales más positivos que el pico principal de adsorción. Para la  $[\text{SHPyr}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  este nuevo pico se manifiesta únicamente a la velocidad de 50 mV/s en forma de una pequeña ondulación en el voltamograma. A medida que aumenta la concentración de SHPyr, dicho pico aparece perfectamente definido y se manifiesta a velocidades mayores. A la  $[\text{SHPyr}] = 9.9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  y superiores el comportamiento se hace mucho más complejo, llegando a aparecer hasta

cuatro picos muy irreproducibles, dado que se observan variaciones en el número de ellos y en la intensidad de cada uno al realizar barridos sucesivos sobre la misma gota. El hecho de que este comportamiento se manifieste al aumentar la concentración permite relacionarlo con fenómenos de interacción entre las moléculas adsorbidas debido a una progresiva saturación de la gota. Parece evidenciarse, además, un control cinético lento del hecho que el aumento de la velocidad de barrido conduce a la situación sencilla de un único pico, obtenida inicialmente a las concentraciones más bajas. Estos hechos sugieren un proceso de cambio de fase faradaico sobre el mercurio que justificaría la complejidad de los voltamogramas descritos anteriormente.

#### **Cálculo de la constante cinética.**

Análogamente a como se ha hecho para el caso de la cisteína, se puede abordar el cálculo de la constante cinética del proceso asociado al pico catódico de adsorción mediante el tratamiento propuesto por Srinivasan y Gileadi (1966) a partir de los datos del ajuste  $E$  vs  $\log v$ . Para esto se considera un proceso bielectrónico y se estima el valor de  $E^{0'}$  a partir de la onda anódica difusiva empleando la aproximación que considera (Bard y Faulkner, 1980)  $E^{0'} \approx E_{1/2} = -286$  mV. El cálculo se ha realizado empleando los datos correspondientes a la concentración de 2-mercaptopiridina más baja, es decir,  $5 \cdot 10^{-5}$  M dado que a concentraciones superiores se encuentran los problemas relacionados con el incremento de complejidad de los voltamogramas que conducen a la aparición de varios picos en esta región de potencial. El valor obtenido en estas condiciones es de  $k^0 = 0.9 \pm 0.3$  s<sup>-1</sup>, obteniéndose un valor de  $\alpha = 0.50$ .

#### **IV.2.3.2. Permeabilidad de la 2-mercaptopiridina. Un modelo de solubilidad-difusión**

La difusión dentro de las membranas biológicas y bicapas lipídicas difiere marcadamente de la difusión en líquidos sencillos, fundamentalmente en que muestra una aguda dependencia del tamaño de la molécula que difunde. Esta misma propiedad la comparten los procesos de difusión en polímeros y puede explicarse mediante un mecanismo de salto entre huecos existentes en el medio. Tal proceso se denomina difusión no-stokesiana. Por otra parte, la permeabilidad de una membrana a especies neutras viene determinada por dos factores (Stein, 1986): la facilidad con la que entra el agente permeante

## Resultados y discusión

y la facilidad con la que cruza la membrana. Cuantitativamente, el primer factor está asociado al coeficiente de reparto  $K$  entre ambos medios y el segundo por el coeficiente de difusión en el medio  $D_{mem}$ ; A su vez,  $D_{mem}$  está determinado por el valor de la selectividad volumétrica  $m_v$  de la membrana, el volumen  $V$  del agente permeante y el valor máximo del coeficiente de difusión,  $D_{mem}^{v=0}$ , de tal forma que para este sencillo modelo, el coeficiente de permeabilidad es:

$$P = \frac{D_{mem}^{v=0}}{\lambda} K \cdot 10^{-m_v V} = f_k \cdot f_v \quad (4)$$

donde  $\lambda$  es el espesor de la barrera al transporte. Puesto que los parámetros  $D_{mem}^{v=0}$ ,  $\lambda$  y  $m_v$  son independientes de la naturaleza de la especie que difunde, la permeabilidad para diferentes sustancias va a depender únicamente del valor de los coeficientes de reparto  $K$  y del volumen  $V$ . ¿Es posible desglosar las contribuciones relativas de ambos factores y descubrir si existen contribuciones de grupo en la molécula permeante? Sin saber el verdadero valor de los coeficientes de reparto, la respuesta se convierte en suposiciones razonables. En primer lugar es necesario elegir un modelo de disolvente que permita estimar  $K$ , lo que va a determinar el valor de  $D_{mem}^{v=0}$  y  $m_v$ . En general, dos disolventes que han sido empleados con mucha frecuencia son el hexadecano y el n-octanol; también se ha empleado el aceite de oliva. Los coeficientes de reparto en dichos disolventes vienen determinados por la diferencia de potenciales químicos en el estado estándar, cuyo valor en cada estado está asociado a la energética de la interacción en el soluto y cada disolvente (s):

$$K_{s/H_2O} = \exp \left[ \frac{\mu_i^o(H_2O) - \mu_i^o(s)}{RT} \right] \quad (5)$$

Muchas sustancias orgánicas que poseen grupos hidrofóbicos (metilos o bencilos), interaccionan menos favorablemente con agua que el disolvente orgánico en cuestión y tendrán, en consecuencia, mayores valores del potencial químico estándar en agua y, por tanto, coeficientes de reparto mayores de la unidad. Para los disolventes comentados, en general, se encuentra una buena correlación lineal entre el coeficiente de permeabilidad  $P$  y

*Resultados y discusión*

la constante de reparto para distintos solutos (Stein, 1986). En las tablas IV.2.8 y IV.2.9 se pone de manifiesto el descenso de hidrofobicidad provocada por distintos grupos de sustituyentes expresada como energía libre de reparto en función de la polaridad del grupo y su posición.

**TABLA IV.2.8. n-hexadecano como disolvente modelo (Stein, 1986)**

Grupo	Energía libre de reparto /kJmol <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub> (metilo)	-3.8
OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> (etoxi)	6.7
OH (hidroxilo)	24
COOH (carboxilo)	26
CONH <sub>2</sub> (amida primaria)	34
HNCONH <sub>2</sub> (urea)	34
(OH) <sub>2</sub> ( $\alpha,\beta$ -diol)	38
(OH) <sub>2</sub> ( $\alpha,\omega$ -diol)	44
(OH) <sub>3</sub> ( $\alpha,\beta,\gamma$ -triol)	47

**TABLA IV.2.9. n-octanol como disolvente modelo**

Grupo	Energía libre de reparto/ kJmol <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub> (metilo)	-3.6
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (fenilo)	-8.0
OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> (etoxi)	5.4
OH (hidroxilo)	12
COOH (carboxilo)	9.0
CONH <sub>2</sub> (amida primaria)	15
(OH) <sub>2</sub> (diol-vecinal)	22

Puede observarse claramente la contribución hidrófoba de los grupos metilo y,

### Resultados y discusión

sobre, todo fenilo; A pesar de que no poseemos datos precisos sobre la contribución exacta del grupo piridina, los datos anteriores sugieren que la cisteína, con una estructura de grupos alifáticos y polares, va a ser menos hidrófoba que la 2-mercaptopiridina, que posee un anillo aromático; En la tabla IV.2.9 puede observarse el valor de 12 kJ/mol positivo de la contribución del grupo OH frente al valor negativo del fenilo, lo que sugiere para el grupo -SH una contribución hidrófoba análoga o mayor en el caso de la 2-mercaptopiridina.

Datos más directos sobre la previsible mayor hidrofobicidad de la 2-mercaptopiridina parecen desprenderse también de la tabla IV.2.10 (Cantor y Schimel, 1980).

**TABLA IV.2.10. Energía de transferencia de cadena lateral para distintos aminoácidos**

Compuesto	$\Delta G_{cl}/\text{kcalmol}^{-1}$
Cisteína	1.00
Fenilalanina	2.65
Prolina	2.60

donde  $\Delta G_{cl}$  representa la energía de transferencia de cadena lateral. Dicho valor se refiere a las diferencias energéticas entre glicina y otros aminoácidos. Considerando la glicina como aminoácido de referencia carente de cadena lateral, los valores de la tabla representan la contribución de las cadenas laterales respecto a la glicina y son una manifestación de las fuerzas hidrofóbicas. Obsérvese el valor positivo en los tres casos, indicativo de una transferencia espontánea agua  $\rightarrow$  etanol y, como este efecto es superior en la fenilalanina (grupo fenilo) respecto a la cisteína, lo que nuevamente sugiere una mayor hidrofobicidad de la 2-mercaptopiridina en relación a la cisteína.

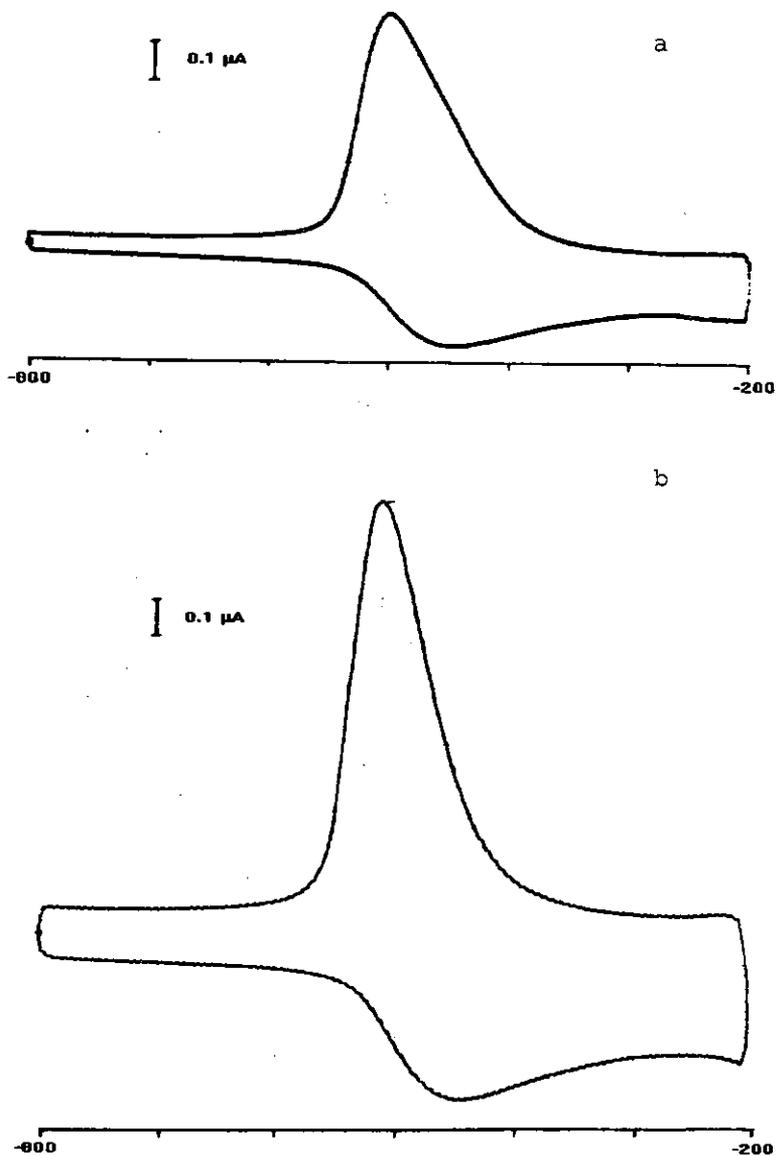
Por otra parte, en el modelo de permeabilidad de membrana de tipo solubilidad-difusión representado por la expresión (4), el coeficiente de permeabilidad contiene además de la contribución del coeficiente de reparto  $f_r$ , indicativo de una mayor o menor permeabilidad agua-membrana, el factor dependiente del volumen  $f_v$ . Por analogía con los estudios sobre permeabilidad de membranas y modelos llevados a cabo en distintos sistemas, se ha calculado el volumen de Van der Waals para la cisteína y la 2-mercaptopiridina a partir de los datos de contribución de grupo tabulados por Bondi (1964)

TABLA IV.2.11. Volúmenes de Van der Waals para diferentes grupos orgánicos

Grupo	cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>
-CH	6.78
-CH <sub>2</sub>	10.23
-SH	14.80
-C=O	11.70
-OH	8.04
-NH <sub>2</sub>	10.54
-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	45.84

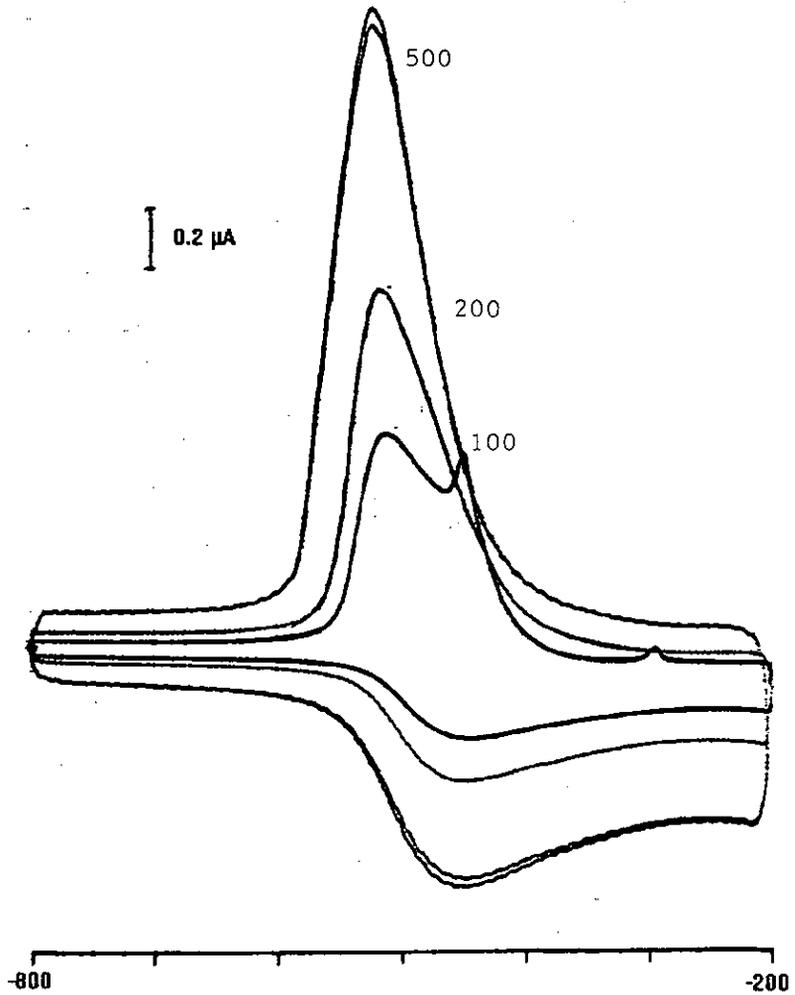
A partir de estos datos se obtiene un valor de 62.09 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup> para la cisteína y de 60.64 cm<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup> para la 2-mercaptopiridina, considerando que la contribución del grupo piridínico es igual a la del fenilo. Puede observarse que los volúmenes molares según este procedimiento son muy semejantes. De acuerdo con estos valores, el término dependiente del volumen  $f_v$  en la ecuación (4), para un mismo medio, va a ser muy parecido y las posibles diferencias en permeabilidad vendrán determinadas por el término  $f_k$ , es decir, el mayor o menor carácter hidrofóbico que, como se ha visto previamente, es superior en la 2-mercaptopiridina. Esto permite racionalizar el hecho de que en las experiencias voltamétricas se produzca la penetración de la 2-mercaptopiridina en la región del mínimo capacitivo, lo cual no sucede en el caso de la cisteína que muestra mayores dificultades para alcanzar la superficie de mercurio, de hecho sólo lo consigue en la zona de potenciales positivos en la que se producen huecos en la monocapa.

Figura IV.2.1



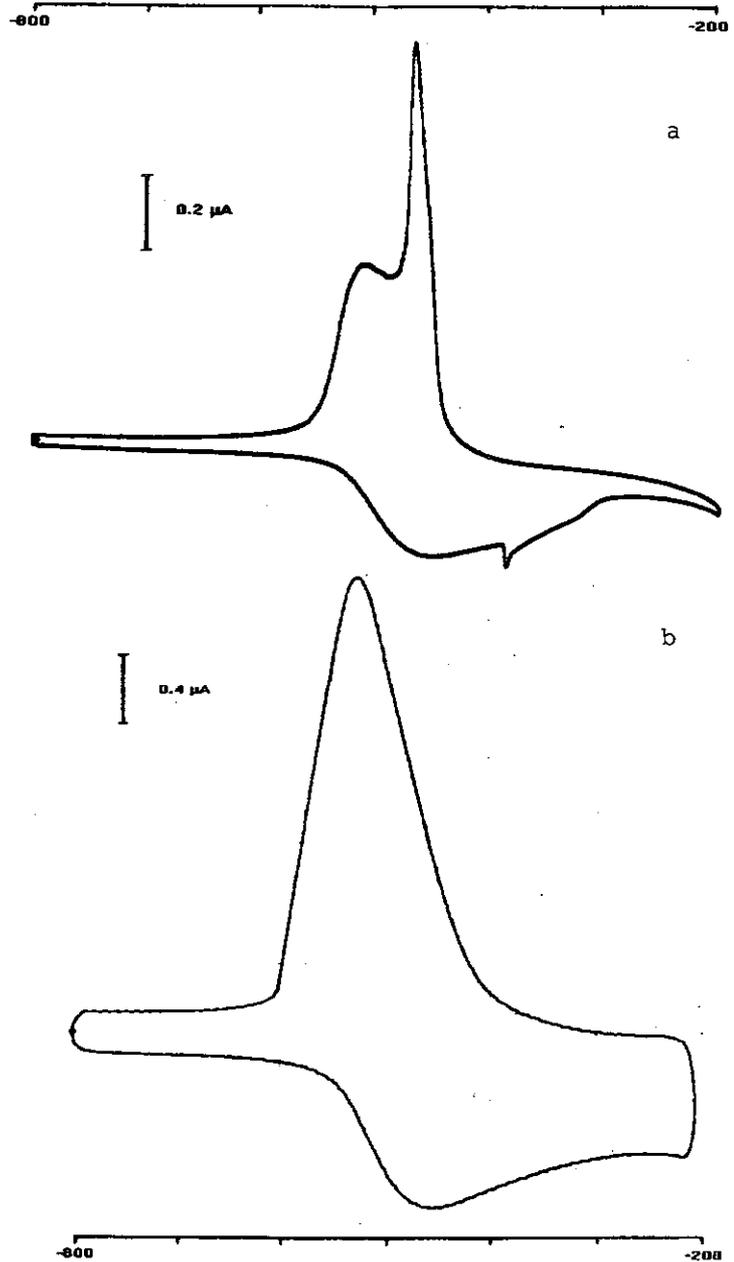
Registro voltamétrico de cisteína  $3.4 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M , pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.8 \text{ V}$ ,  $V_f = -0.2 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 100 y b) 300 mV/s.

Figura IV.2.2



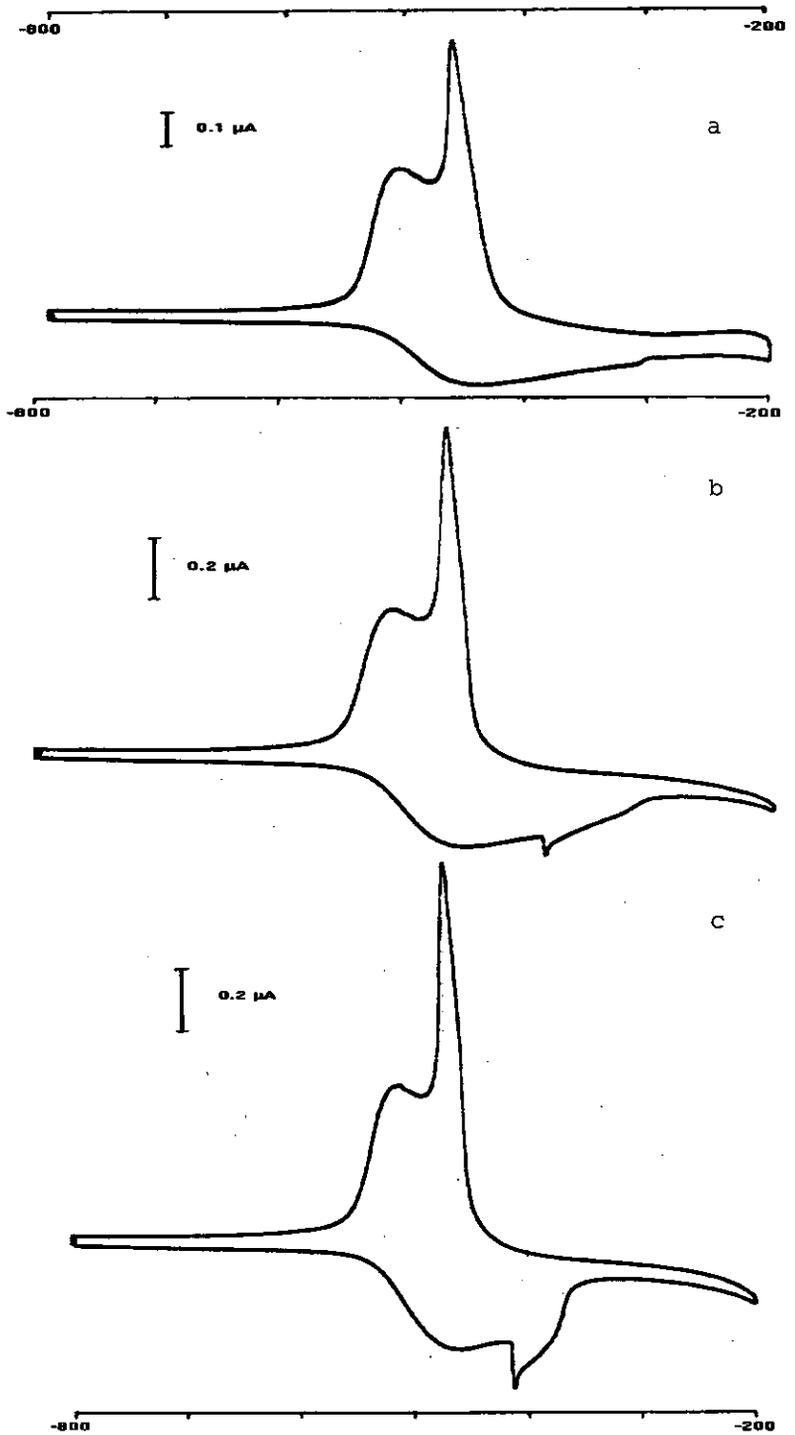
Registro voltamétrico de cisteína  $6.7 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M , pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.8 \text{ V}$ ,  $V_f = -0.2 \text{ V}$  y  $V_s = 100, 200$  y  $500 \text{ mV/s}$  tal y como se indica en la figura.

Figura IV.2.3



Registro voltamétrico de cisteína  $1.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  en medio KCl  $0.1 \text{ M}$ , pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.8 \text{ V}$ ,  $V_f = -0.2 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50 y b) 500 mV/s.

Figura IV.2.4



Registro voltamétrico de cisteína a)  $6.7 \cdot 10^{-5}$  b)  $1.0 \cdot 10^{-4}$  c)  $1.3 \cdot 10^{-4}$  M en medio KCl 0.1 M , pH 7.4.  $A=14.07 \cdot 10^{-3}$  cm<sup>2</sup>. Primer ciclo para  $V_i = -0.8$  V,  $V_f = -0.2$  V y  $V_b = 50$  mV/s.

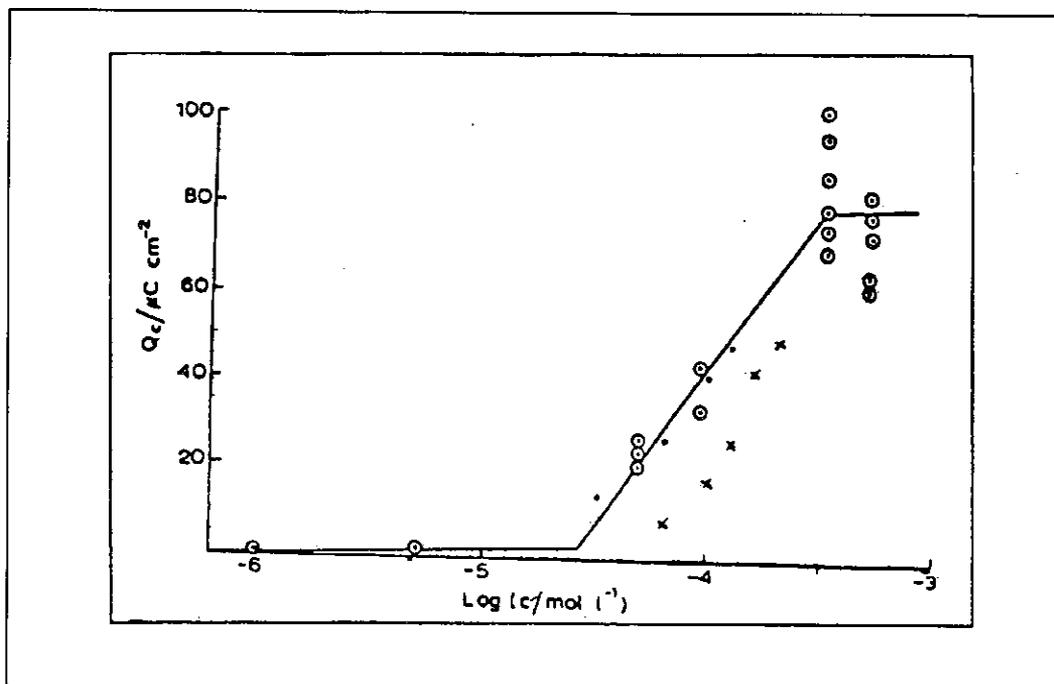
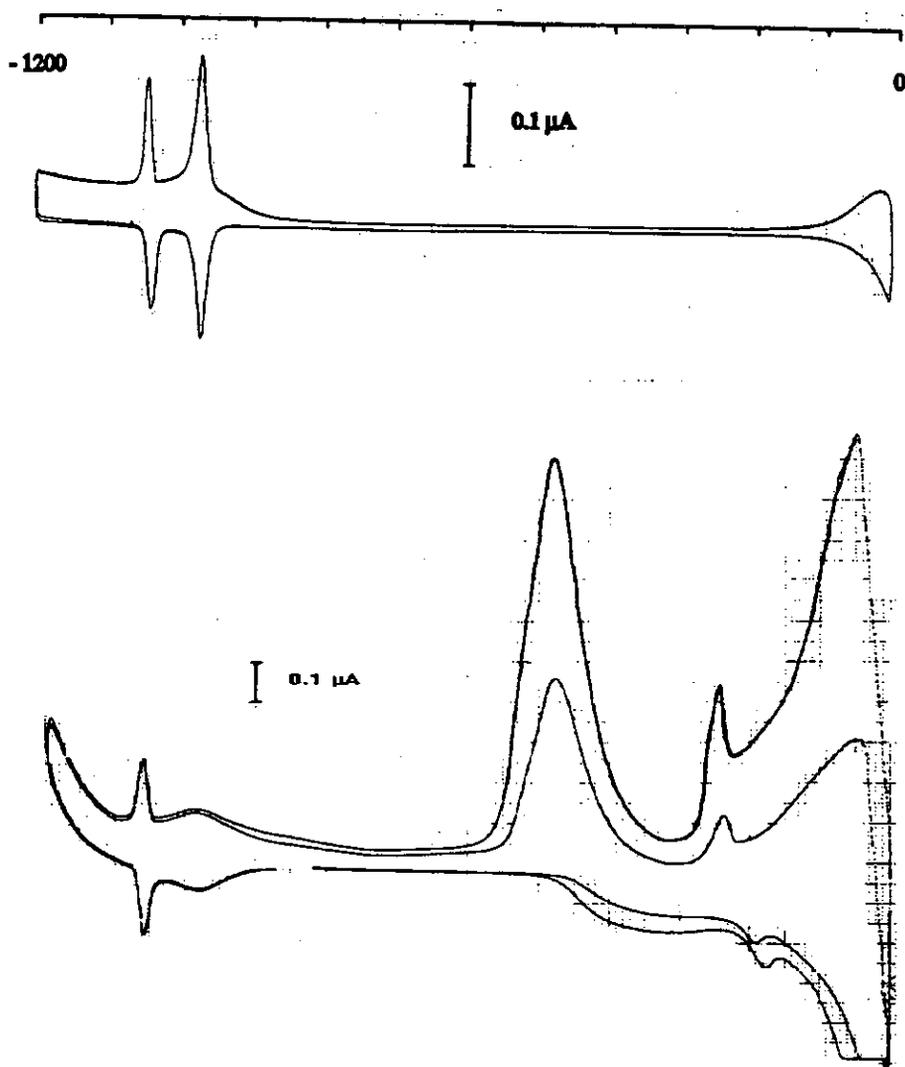


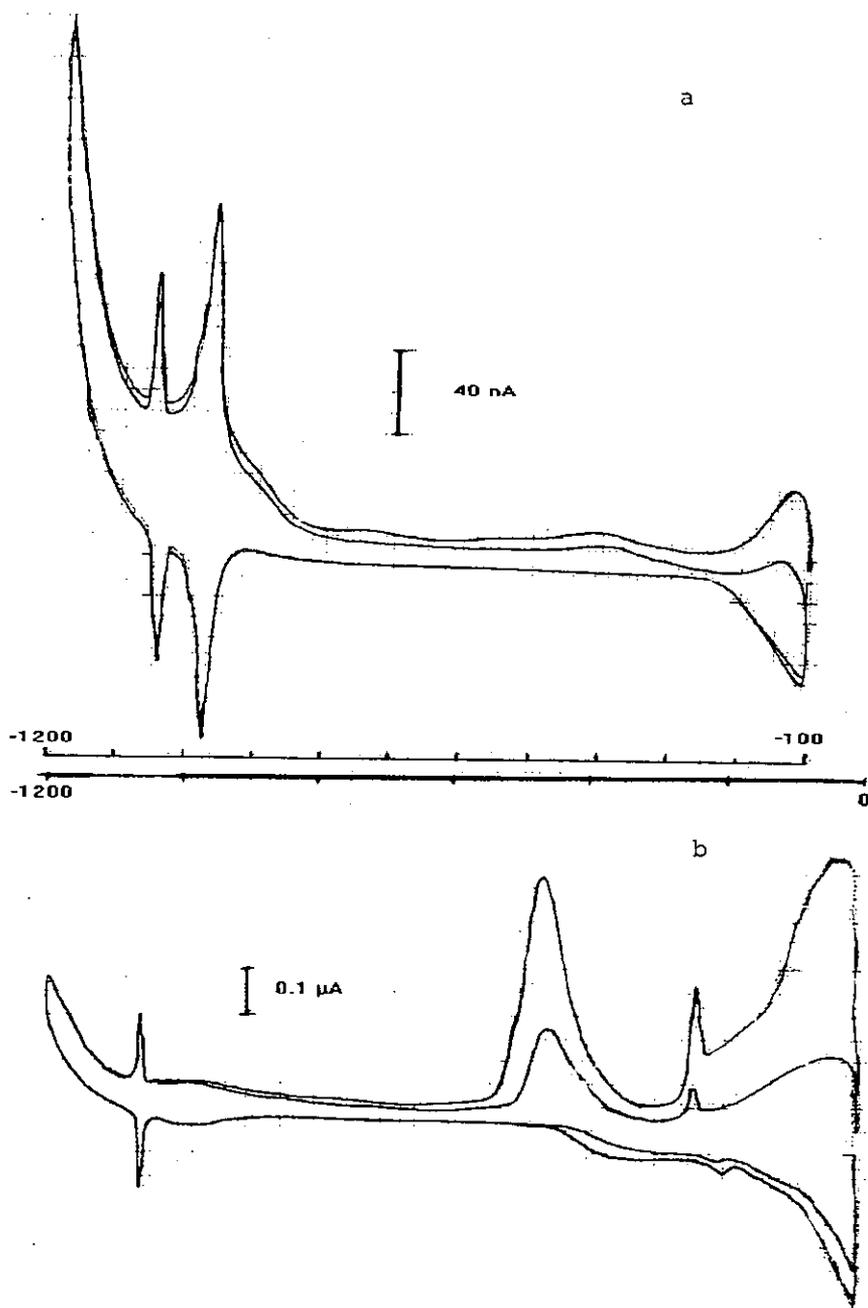
Figura IV.2.5. Representación de la carga adsorbida en función del logaritmo de la concentración de cisteína. (○) sobre un electrodo de mercurio (Stankovich y Bard, 1997), (•) sobre un electrodo de mercurio en ausencia de fosfolípido y (x) sobre un electrodo de mercurio recubierto de una monocapa de DOPC.

Figura IV.2.6



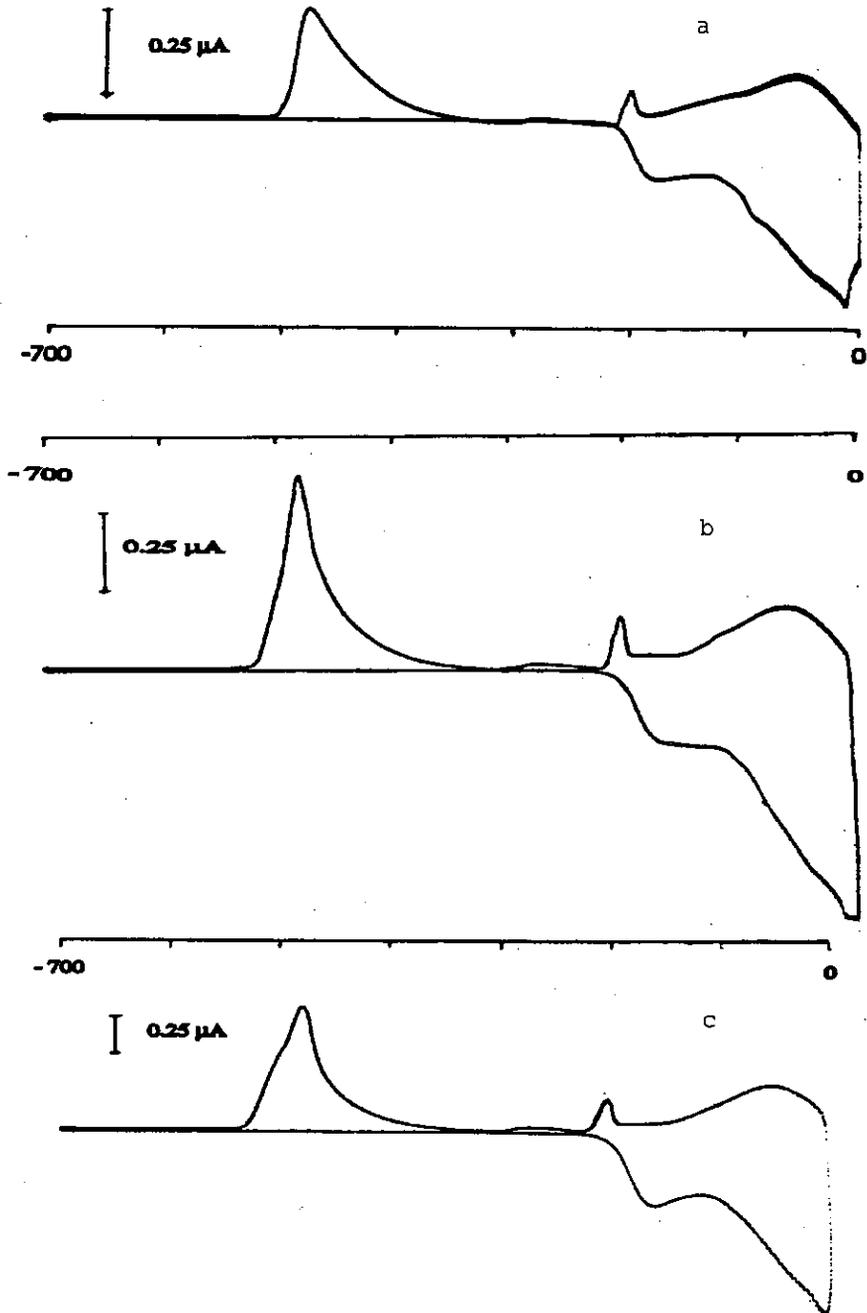
Registros voltamétricos de a) DOPC en medio KCl 0.1M y b) cistina  $4.6 \cdot 10^{-5}\text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC; pH 7.4.  $A=0.0088\text{ cm}^2$ . Condiciones:  $V_i=-1.2\text{ V}$ ,  $V_f=0.0\text{ V}$  y  $V_b=400\text{ mV/s}$ .

Figura IV.2.7



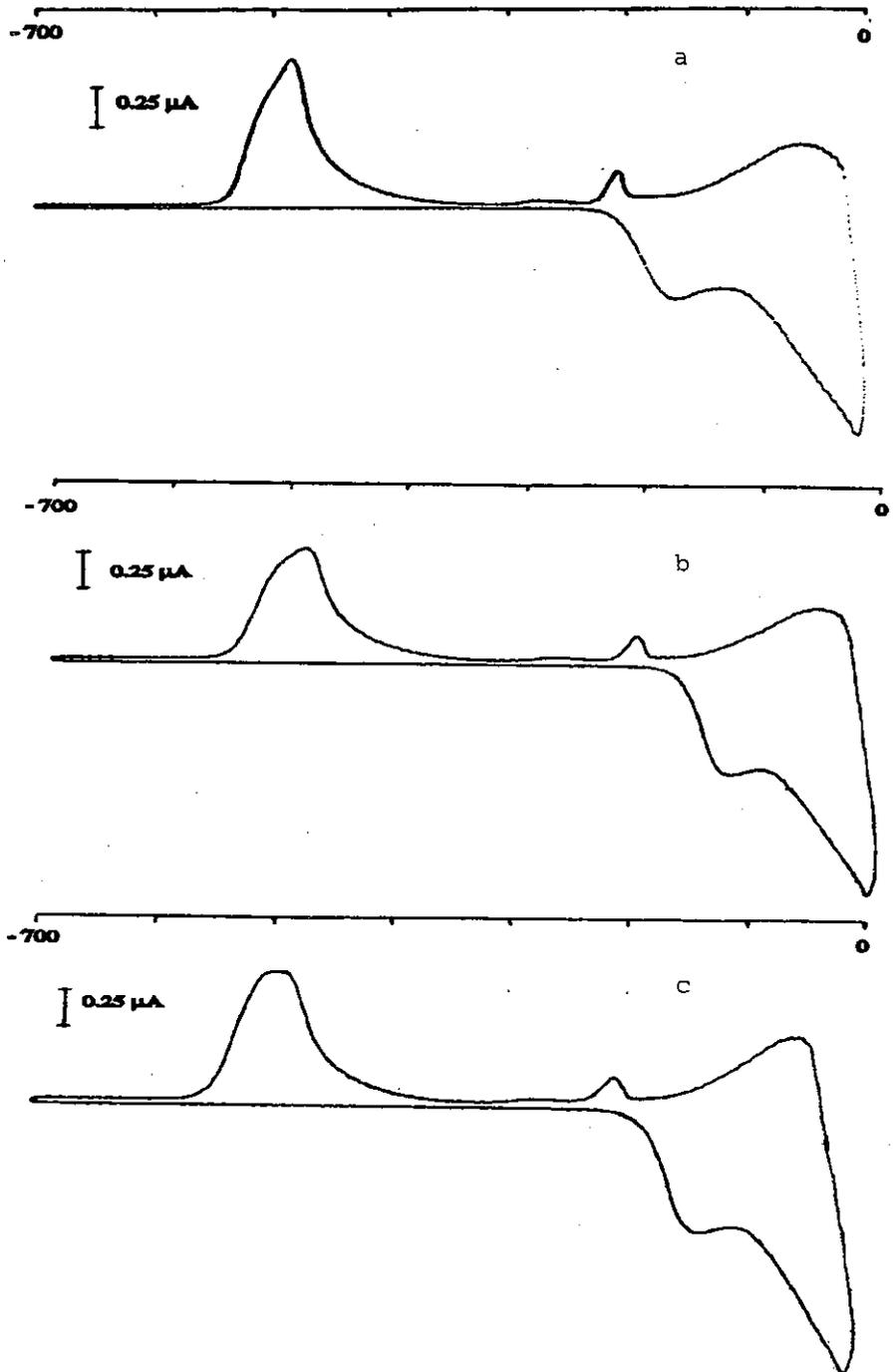
Registro voltamétrico de cistina  $4.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A = 0.0088 \text{ cm}^2$ . Primer y segundo ciclos para  $V_b = 0.2 \text{ V/s}$ ,  $V_f = -1.200 \text{ V}$  y  $V_i =$  a) -0.1 V y b) 0.0 V.

Figura IV.2.8



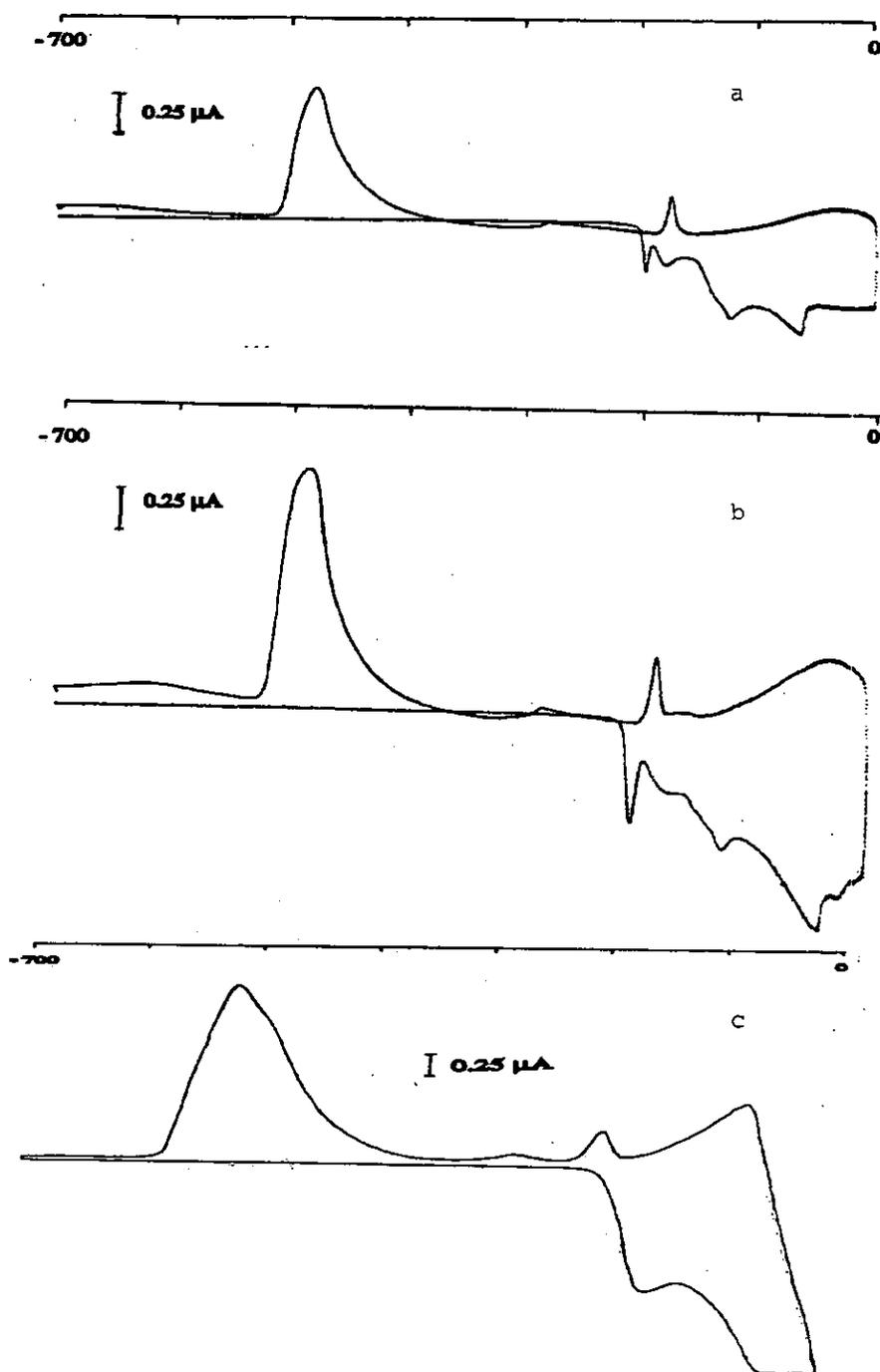
Registro voltamétrico de cisteína  $6.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100 y c) 200 mV/s.

Figura IV.2.9



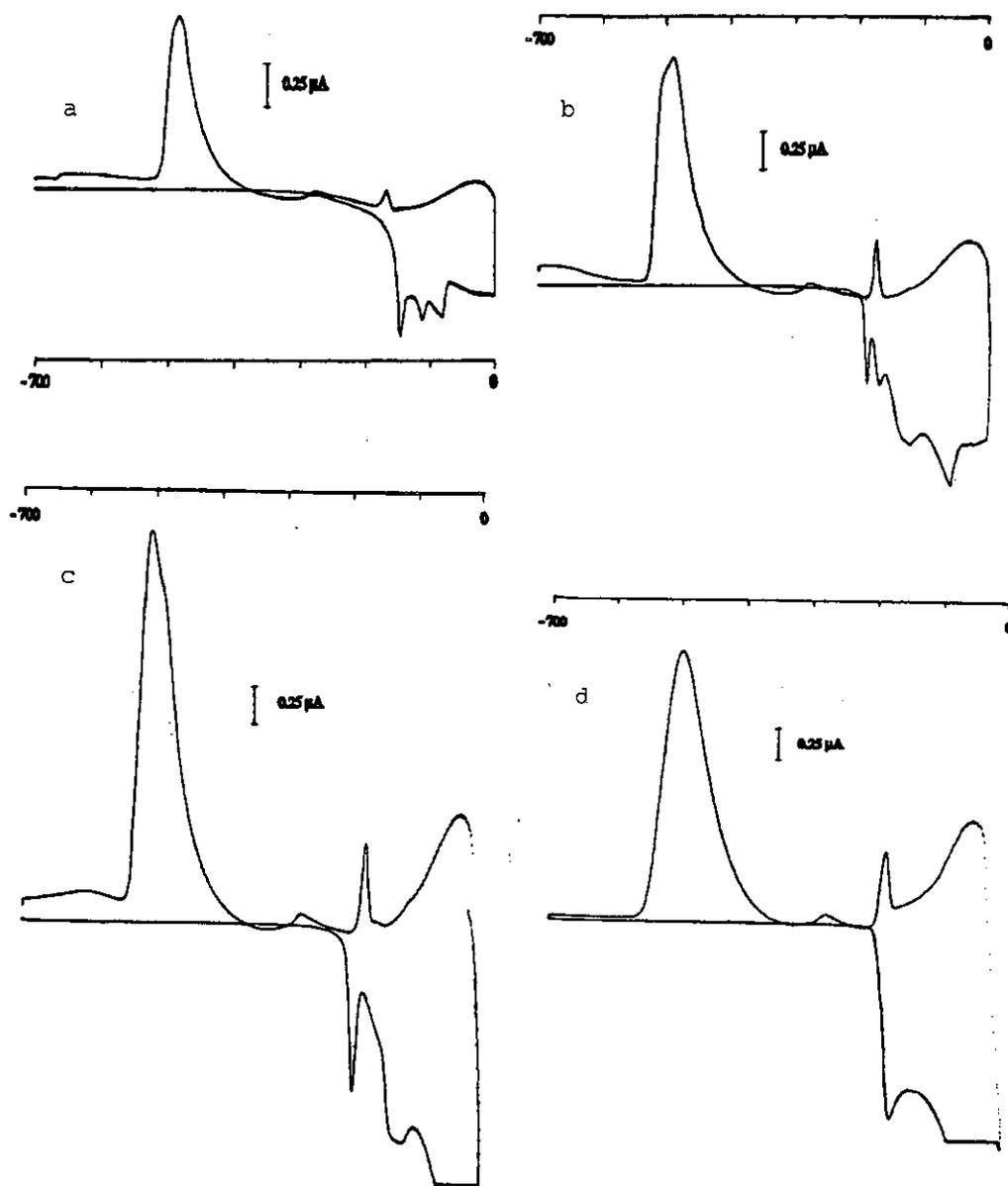
Registro voltamétrico de cisteína  $6.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC , pH 7.4.  $A=14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_s =$  a) 300, b) 400 y c) 500 mV/s.

Figura IV.2.10



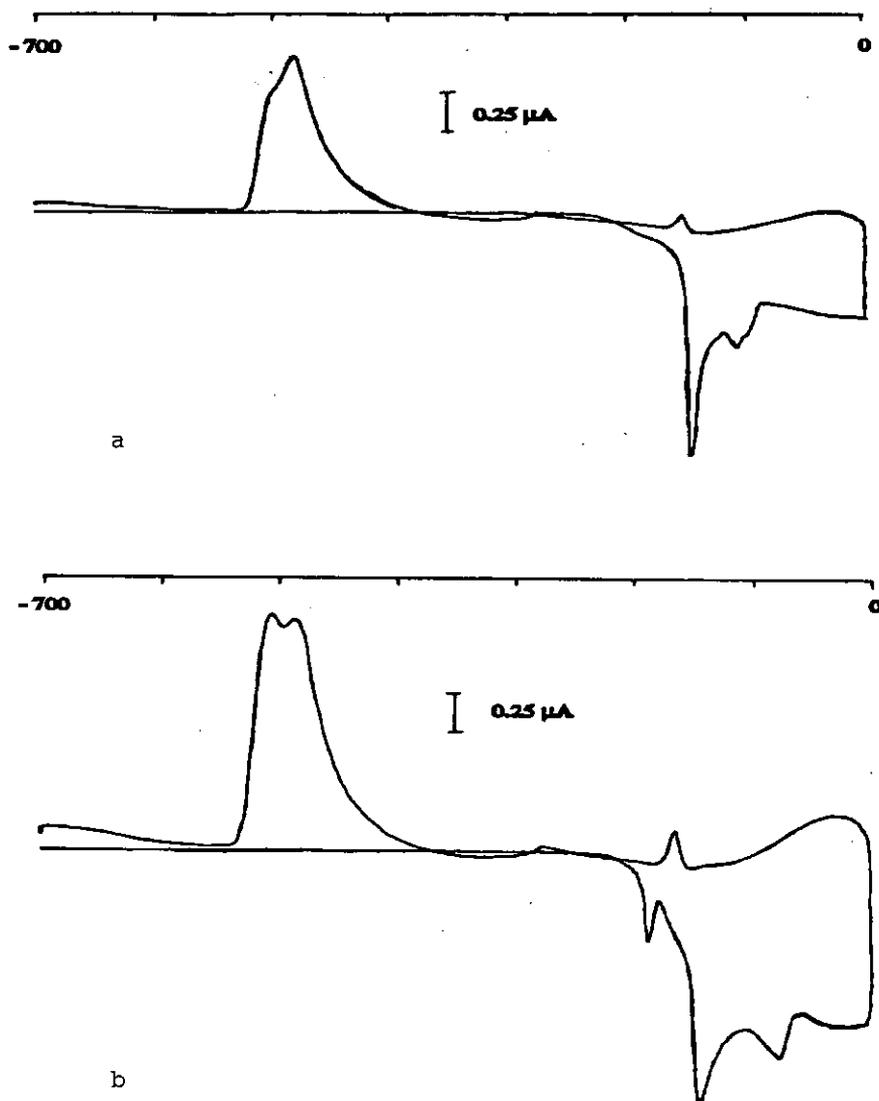
Registro voltamétrico de cisteína  $1.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i \pm 1.0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100 y c) 500 mV/s.

Figura IV.2.11



Registro voltamétrico de cisteína  $1.6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100, c) 200 y d) 300 mV/s.

Figura IV.2.12



Registro voltamétrico de cisteína  $1.9 \cdot 10^{-4} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC , pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50 y b) 100 mV/s.

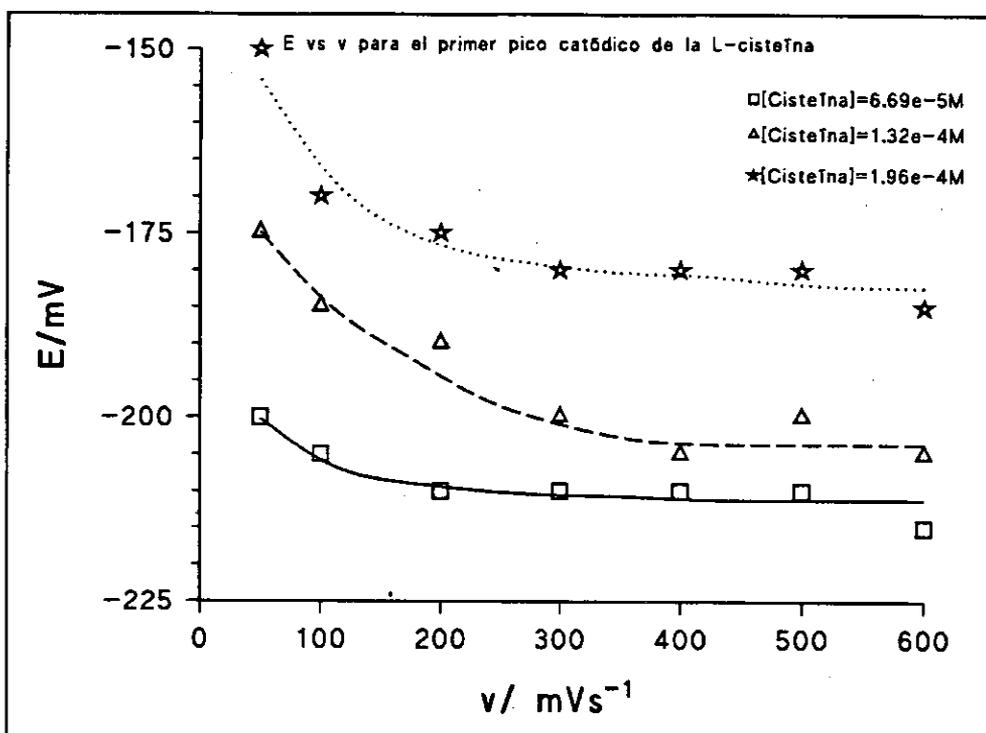


Figura IV.2.13.

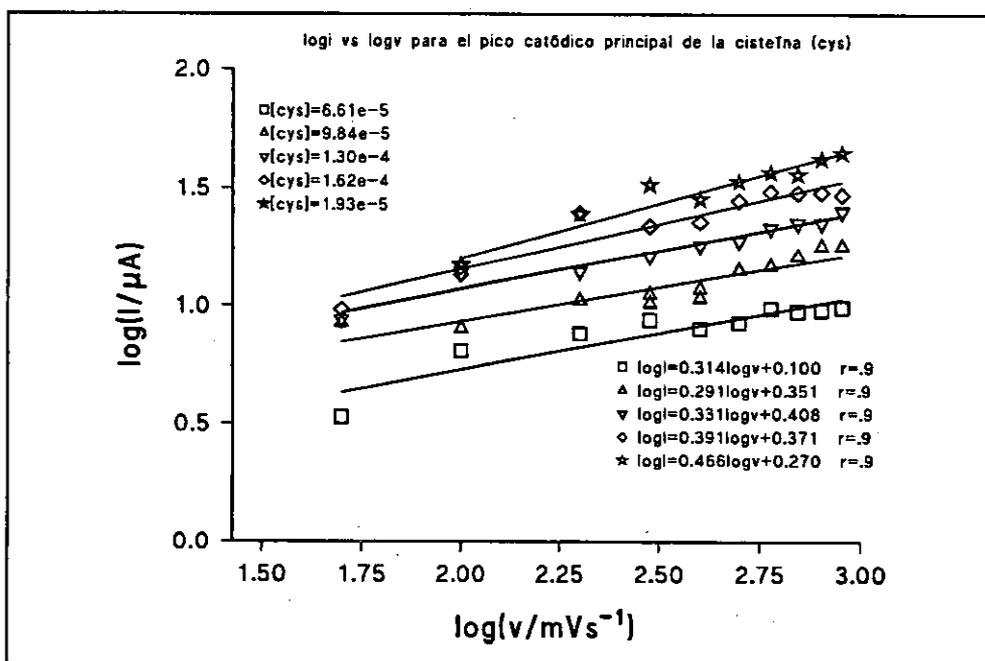


Figura IV.2.14

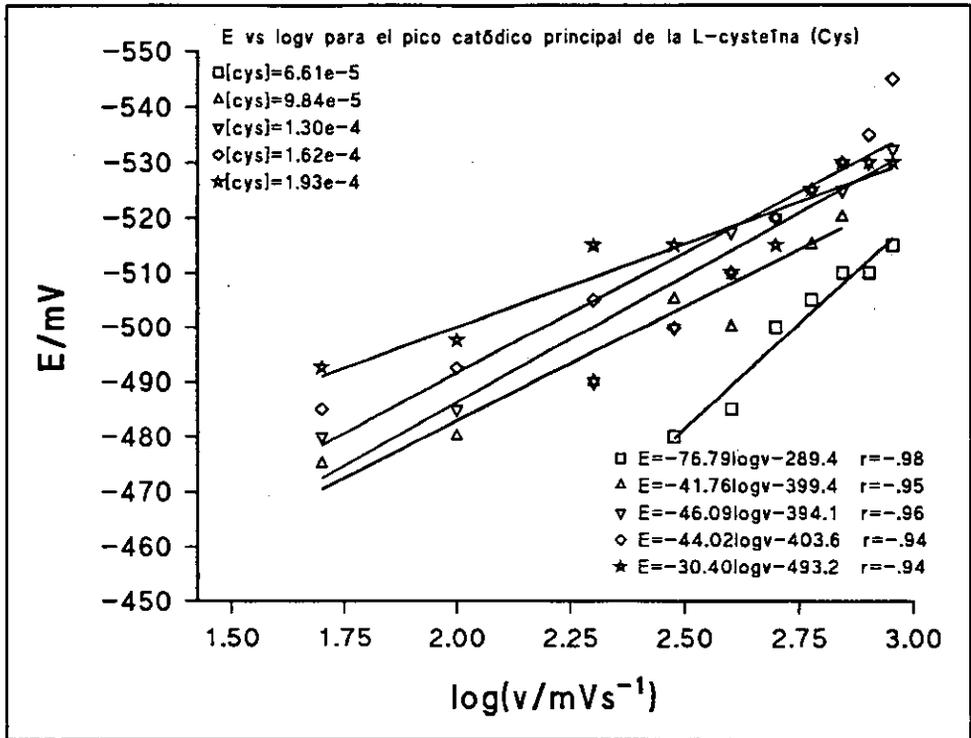


Figura IV.2.15

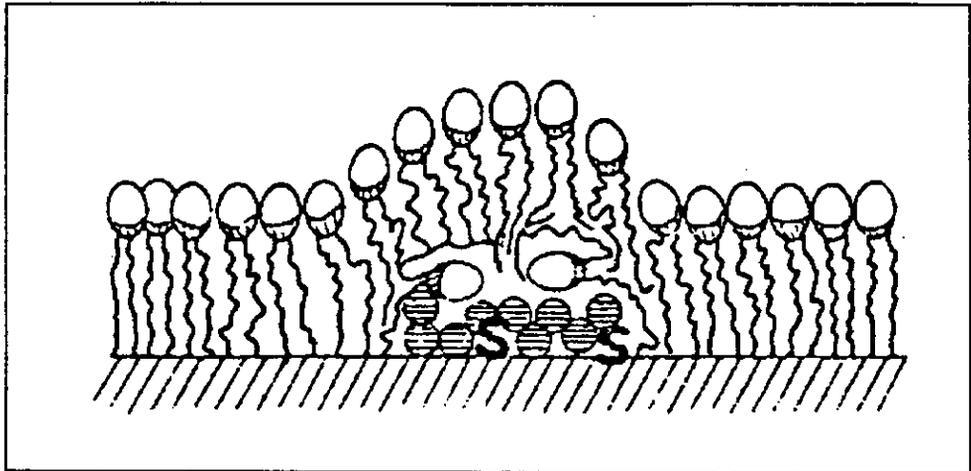
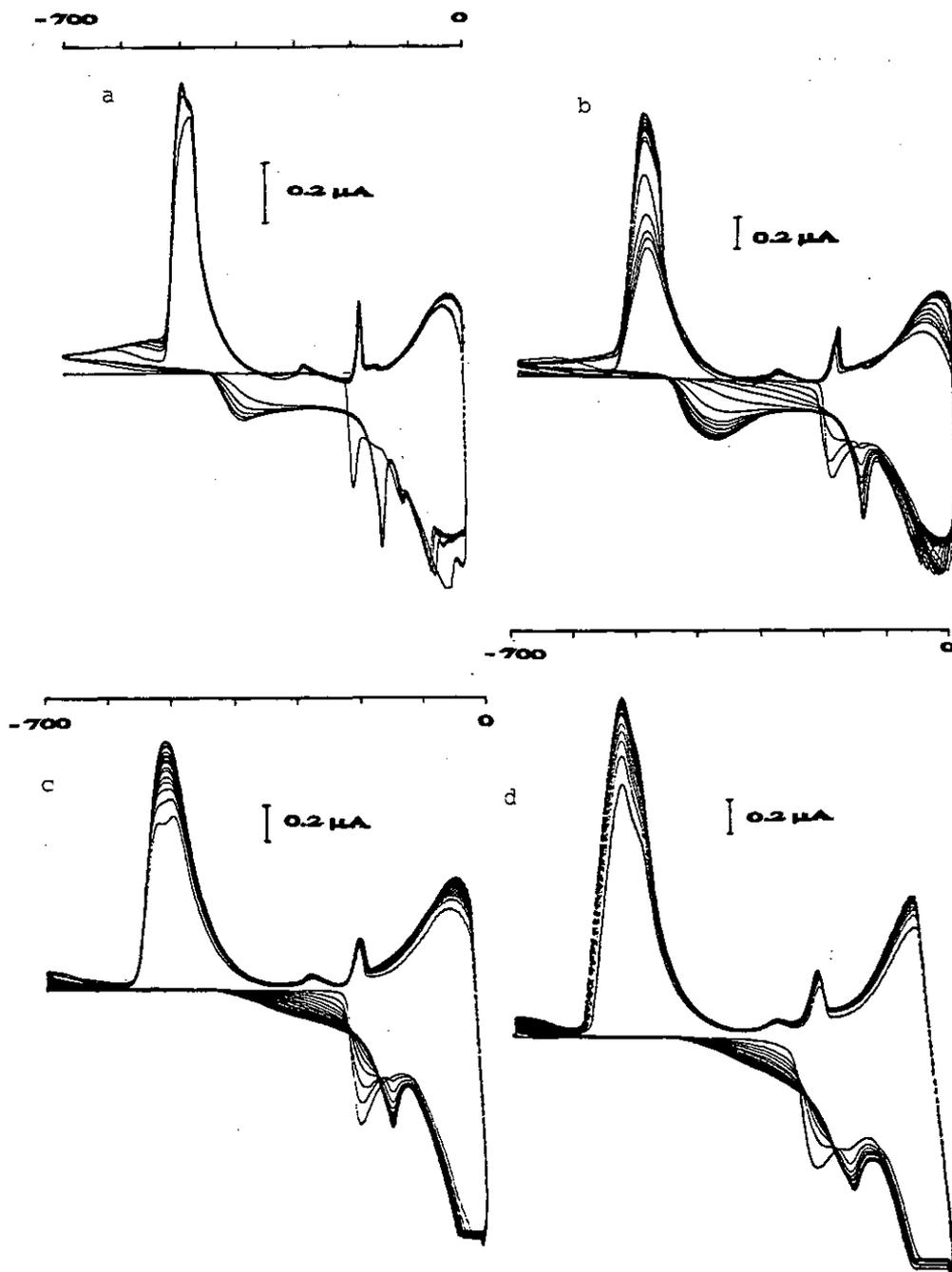


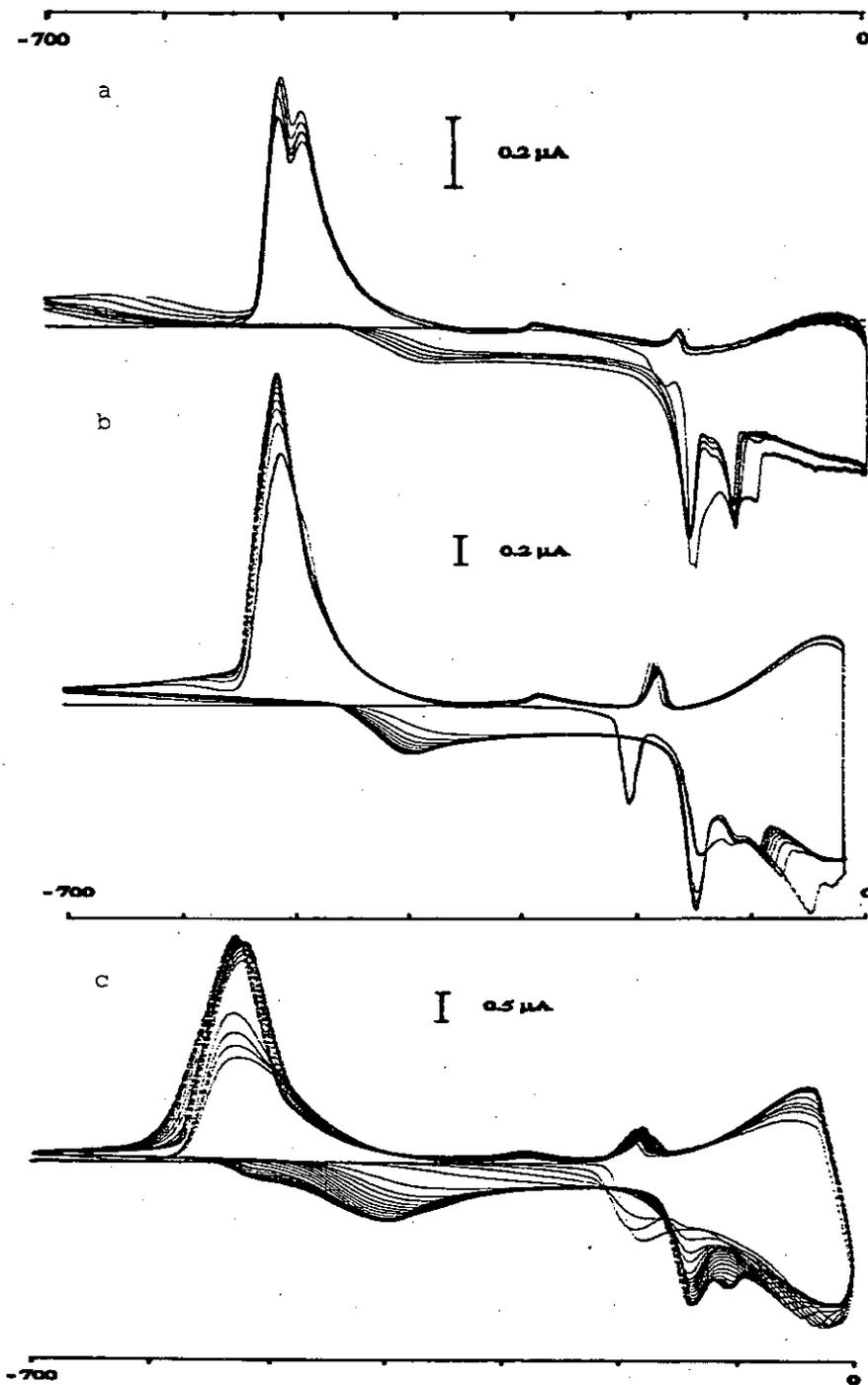
Figura IV.2.16. Modelo combinado de adsorción de fosfolípido y cistina sobre mercurio.

Figura IV.2.17



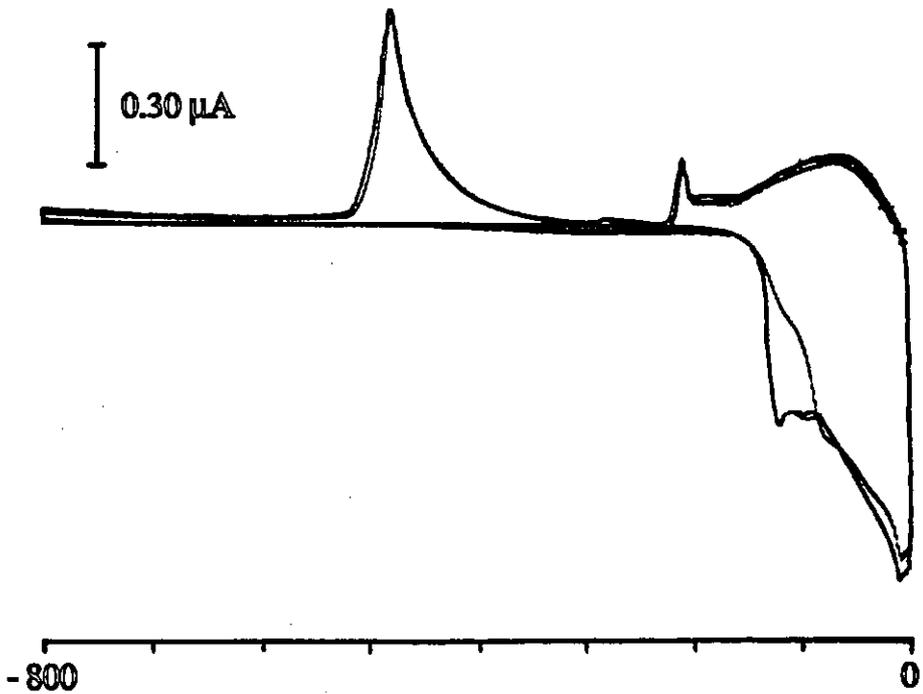
Registro voltamétrico de cisteína  $1.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC , pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Múltiples ciclos para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 100, b) 200, c) 300 y d) 500 mV/s.

Figura IV.2.18



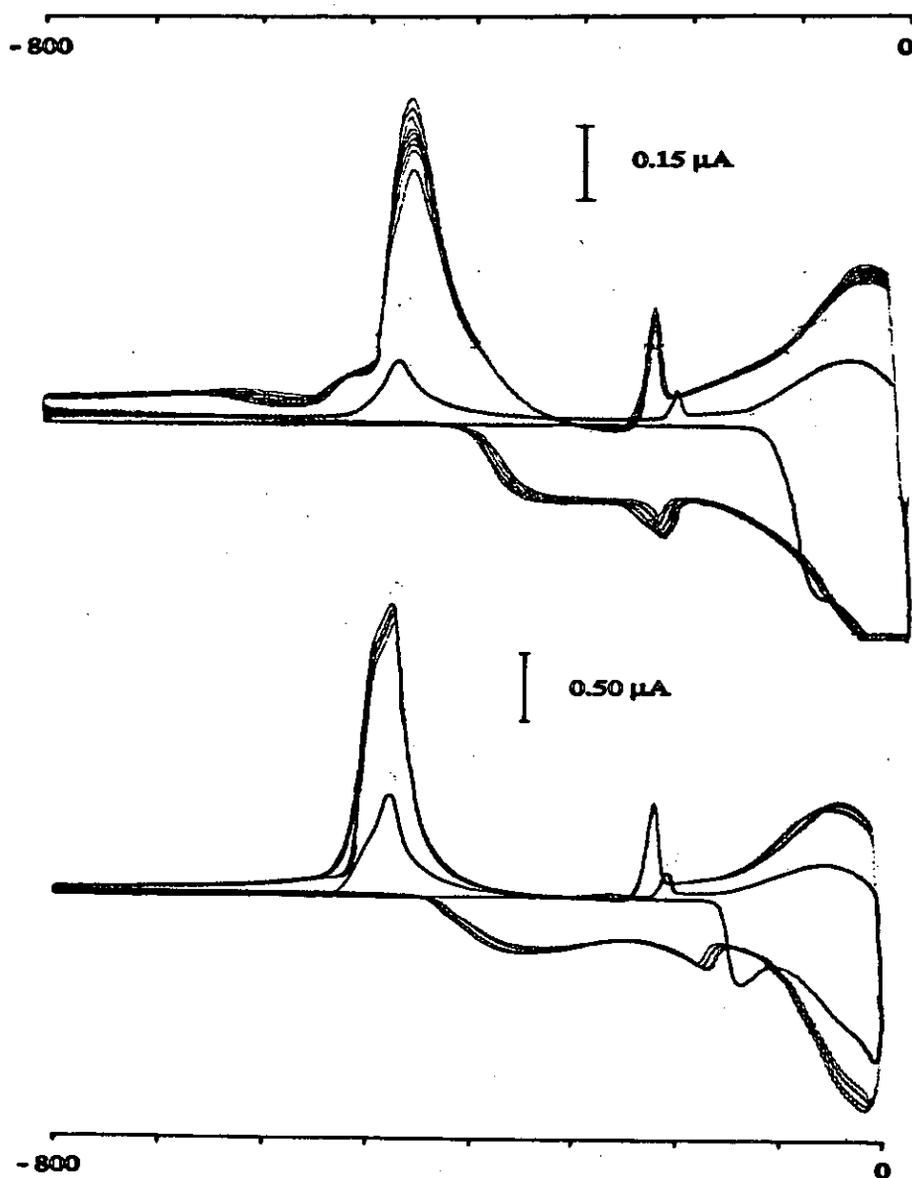
Registro voltamétrico de cisteína  $1.8 \cdot 10^{-4} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC , pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Múltiples ciclos para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 200 y c) 500 mV/s.

Figura IV.2.19



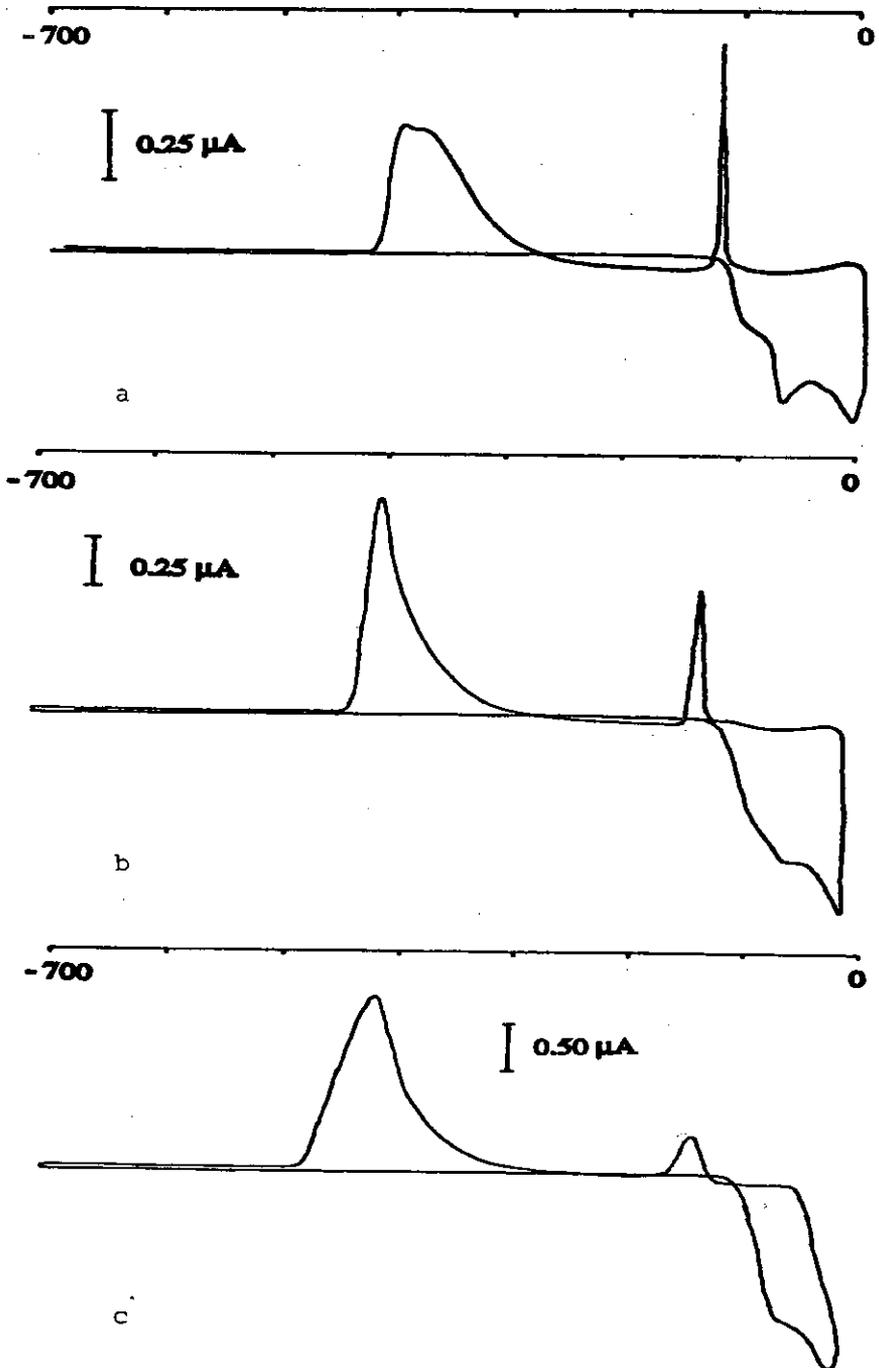
Registro voltamétrico de la cisteína  $6.8 \cdot 10^{-5}$  M en medio KCl 0.1M y DOPC, pH 7.4.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3}$  cm<sup>2</sup>. Varios registros para  $V_i = -0.8$  V,  $V_f = 0.0$  V y  $V_b = 0.2$  V/s aplicando un potencial inicial de -0.8 V durante un tiempo 0, 5, 10 y 15 minutos.

Figura IV.2.20



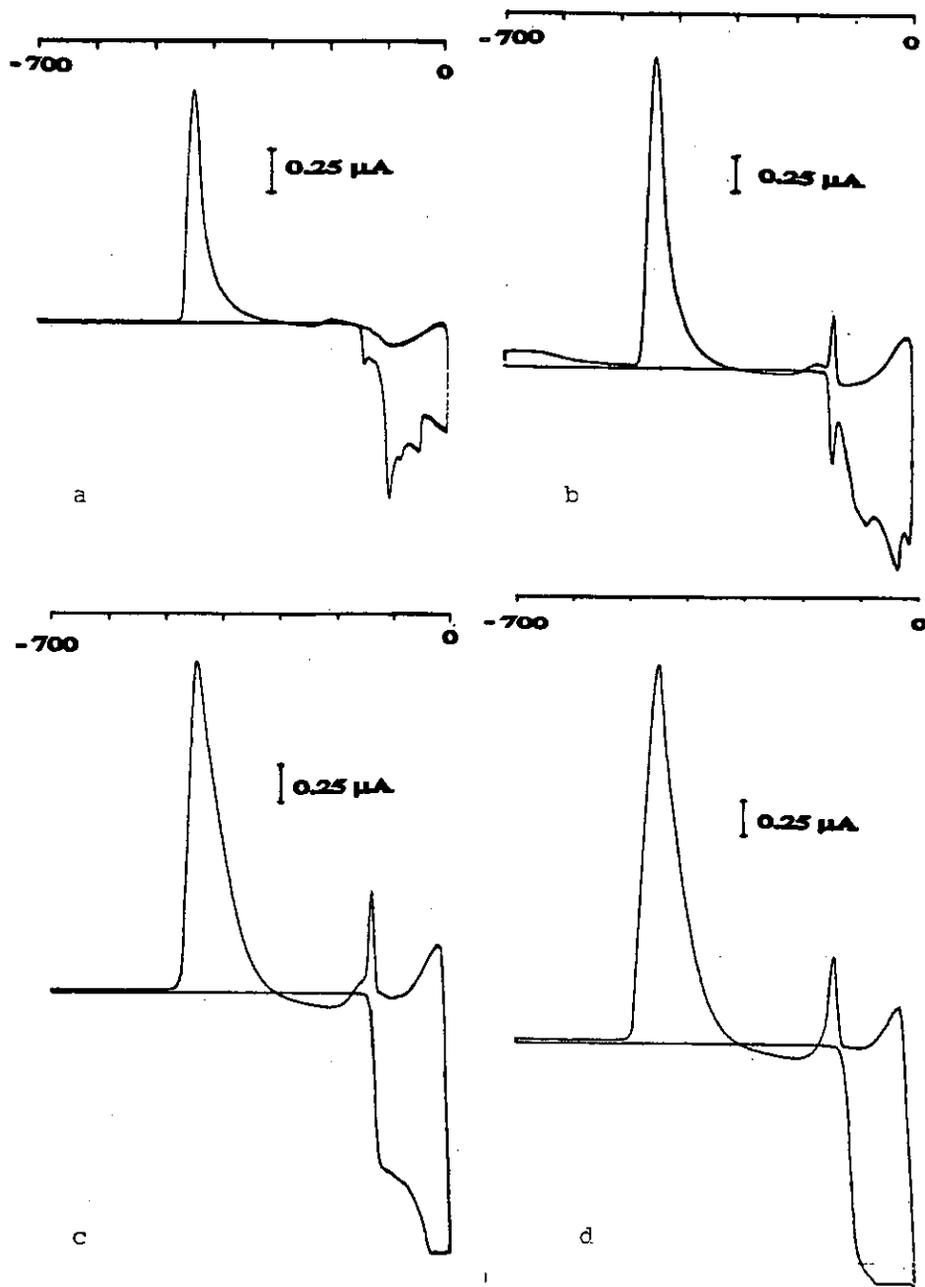
Registro voltamétrico de cisteína en medio KCl 0.1M y DOPC, pH 7.4.  $A=14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Condiciones  $V_i = -0.8 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b = 0.2 \text{ V/s}$ . En ambos casos la curva más pequeña corresponde al registro sin aplicación de potencial de preelectrolisis, los registros de multibarrido aparecen después de mantener un potencial inicial de 0.0 V a) durante 3 minutos con agitación,  $[\text{RSH}] = 3.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  y b) durante 1 minuto sin agitación,  $[\text{RSH}] = 6.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

Figura IV.2.21



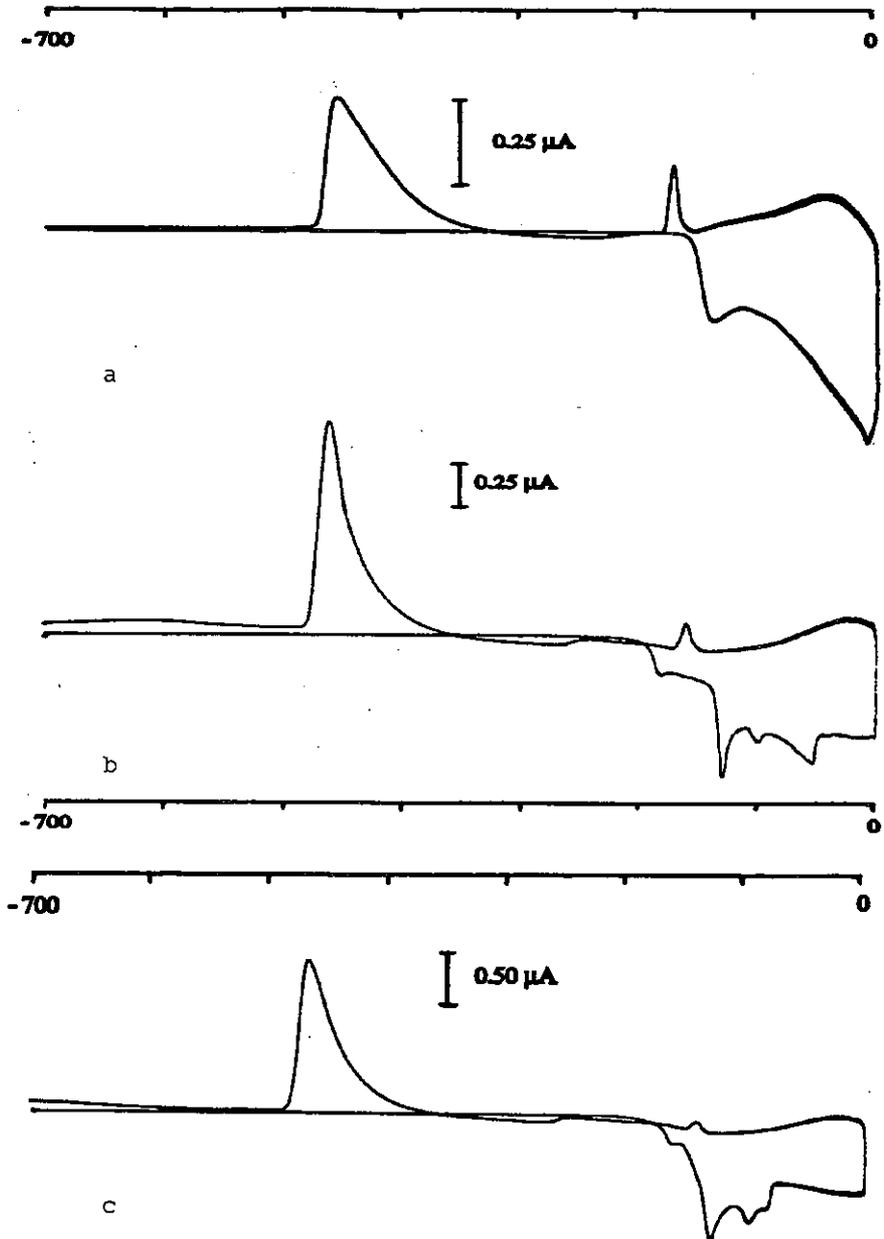
Registro voltamétrico de cisteína  $9.8 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC , pH 5.9.  $A=14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100 y c) 500 mV/s.

Figura IV.2.22



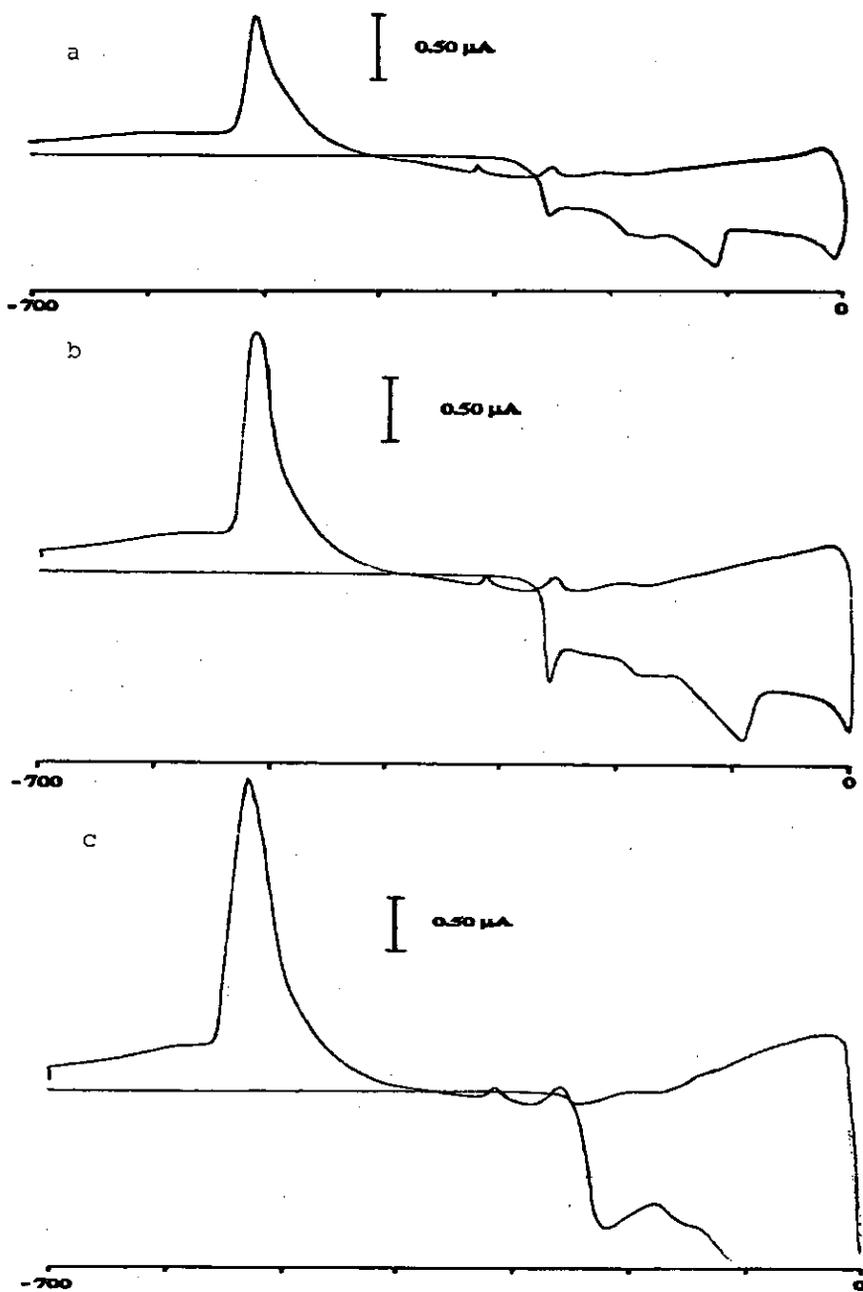
Registro voltamétrico de cisteína  $1.9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC , pH 6.5.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100, c) 200 y d) 300 mV/s.

Figura IV.2.23



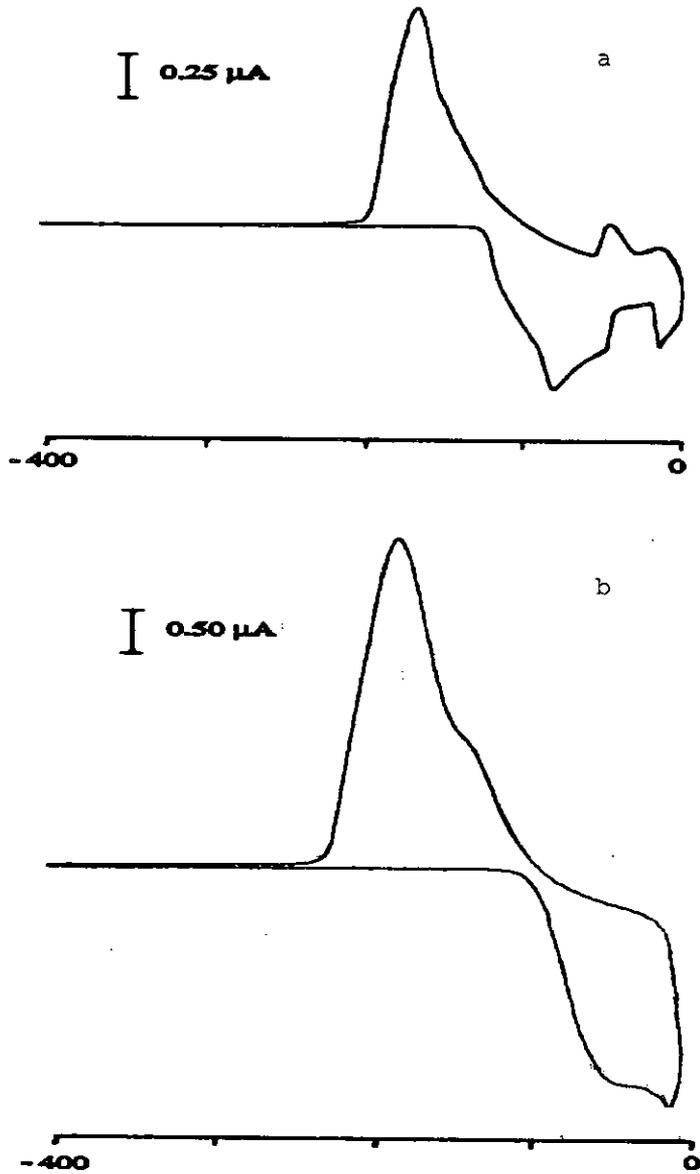
Registro voltamétrico de cisteína a)  $6.6 \cdot 10^{-5}$ , b)  $1.3 \cdot 10^{-5}$ , c)  $1.9 \cdot 10^{-4}$  M en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.1.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3}$  cm<sup>2</sup>. Primer ciclo para  $V_i = -0.7$  V,  $V_f = 0.0$  V y  $V_b = 50$  mV/s.

Figura IV.2.24



Registro voltamétrico de cisteína  $1.9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 8.2.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100 y c) 200 mV/s.

Figura IV.2.25



Registro voltamétrico de cisteína  $1.6 \cdot 10^{-4} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC , pH 2.7.  $A = 14.07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$ . Primer ciclo para  $V_i = -0.4 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50 y b) 400 mV/s.

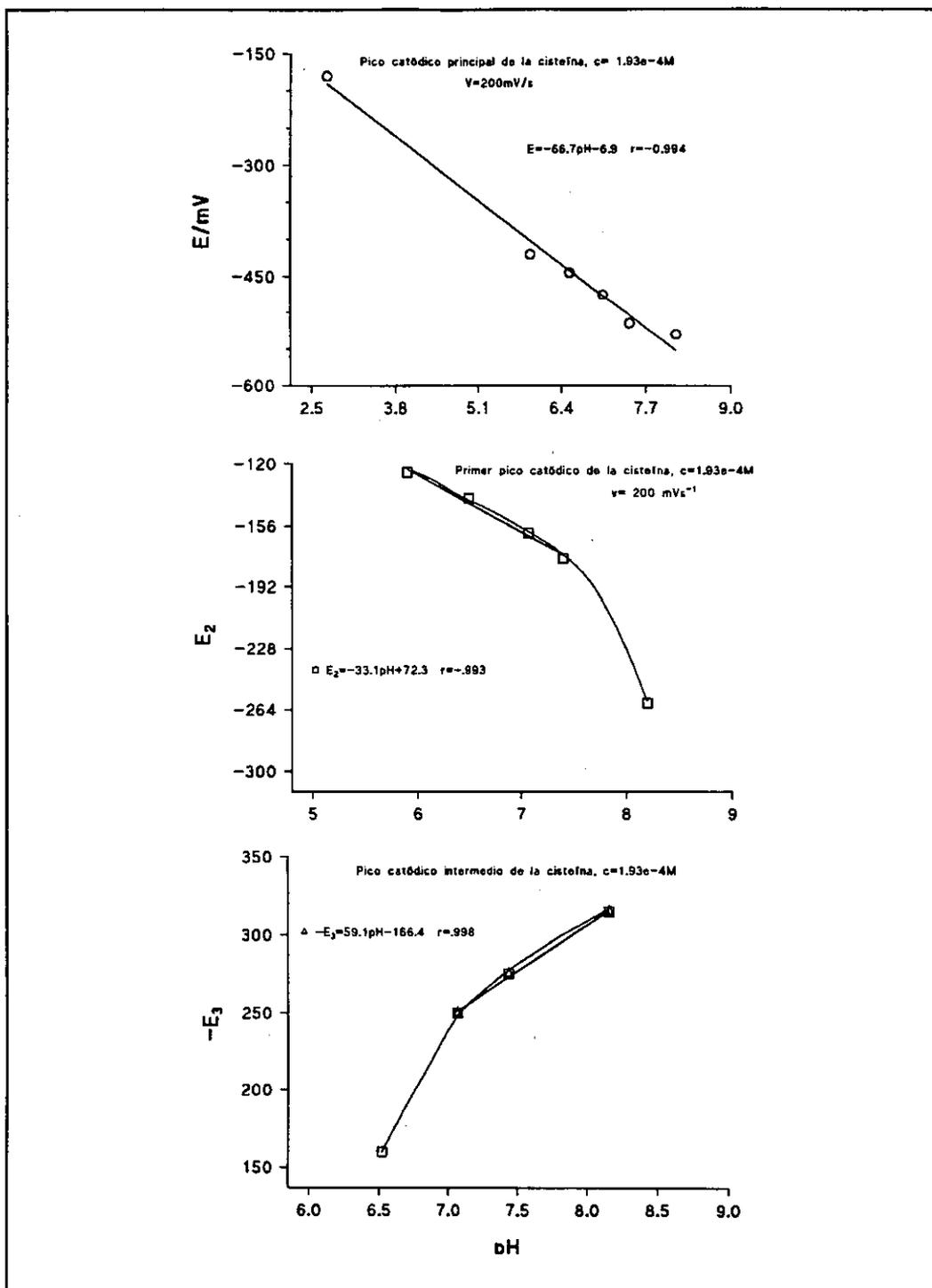
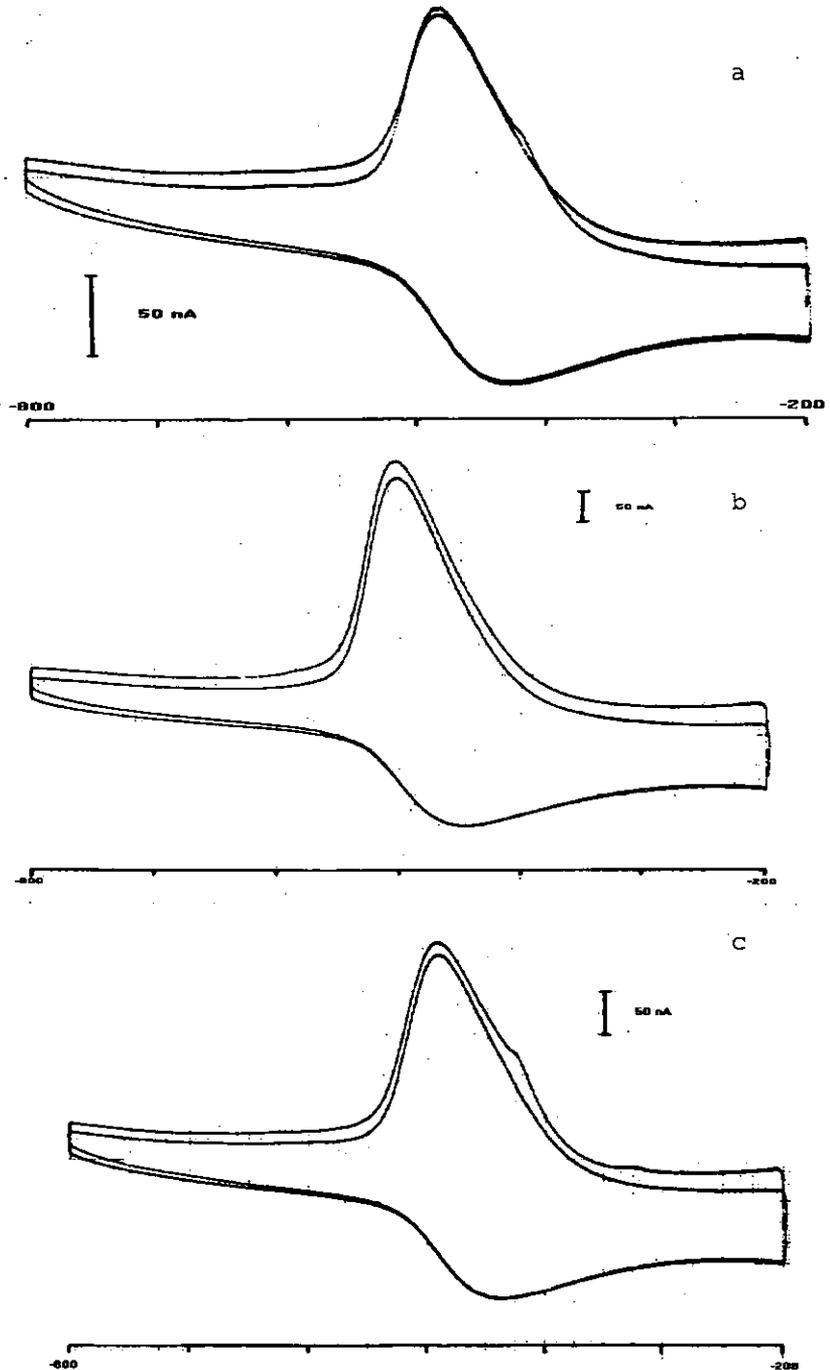


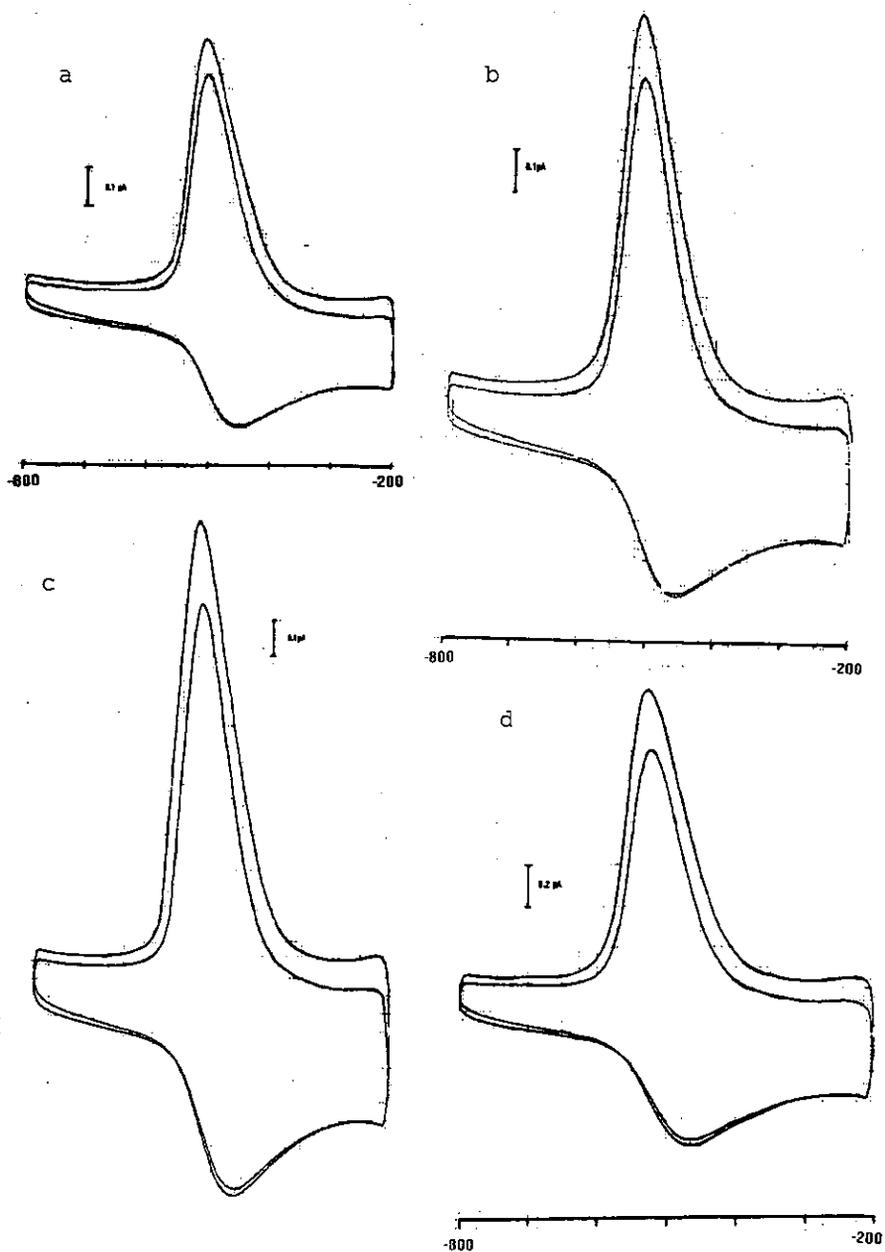
Figura IV.2.26

Figura IV.2.27



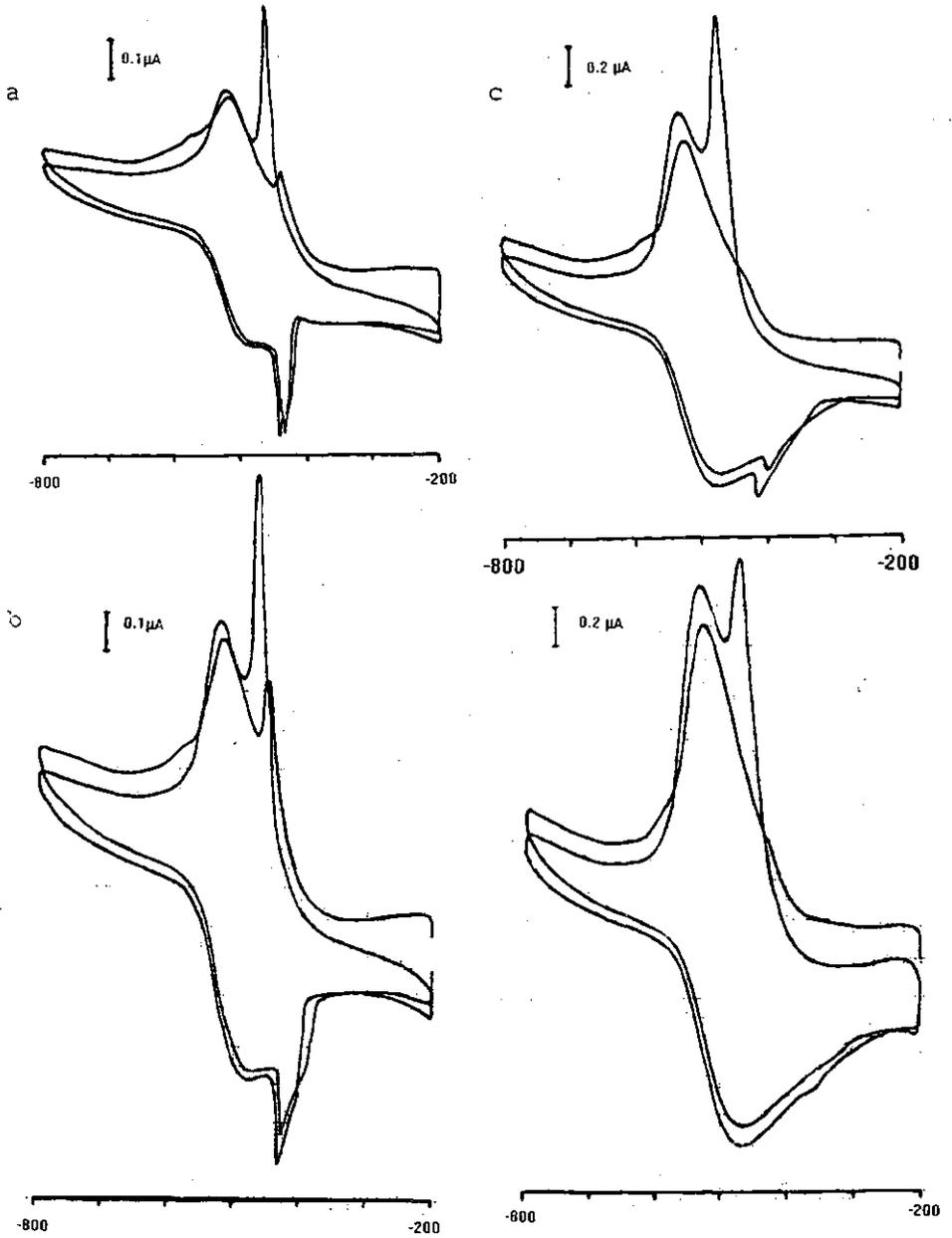
Registro voltamétrico de cistina  $4.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M , pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Primer y segundo ciclos para  $V_i = -0.2 \text{ V}$ ,  $V_f = -0.8 \text{ V}$  y  $V_0 =$  a) 40, b) 50 y c) 80 mV/s.

Figura IV.2.28



Registro voltamétrico de cistina  $4.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M, pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Primer y segundo ciclos para  $V_i = -0.2 \text{ V}$ ,  $V_f = -0.8 \text{ V}$  y  $V_s =$  a) 200, b) 300, c) 800 y d) 500 mV/s.

Figura IV.2.29



Registro voltamétrico de cistina  $2.1 \cdot 10^{-4} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M , pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Primer y segundo ciclos para  $V_i = -0.2 \text{ V}$ ,  $V_f = -0.8 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100, c) 200 y d) 400 mV/s.

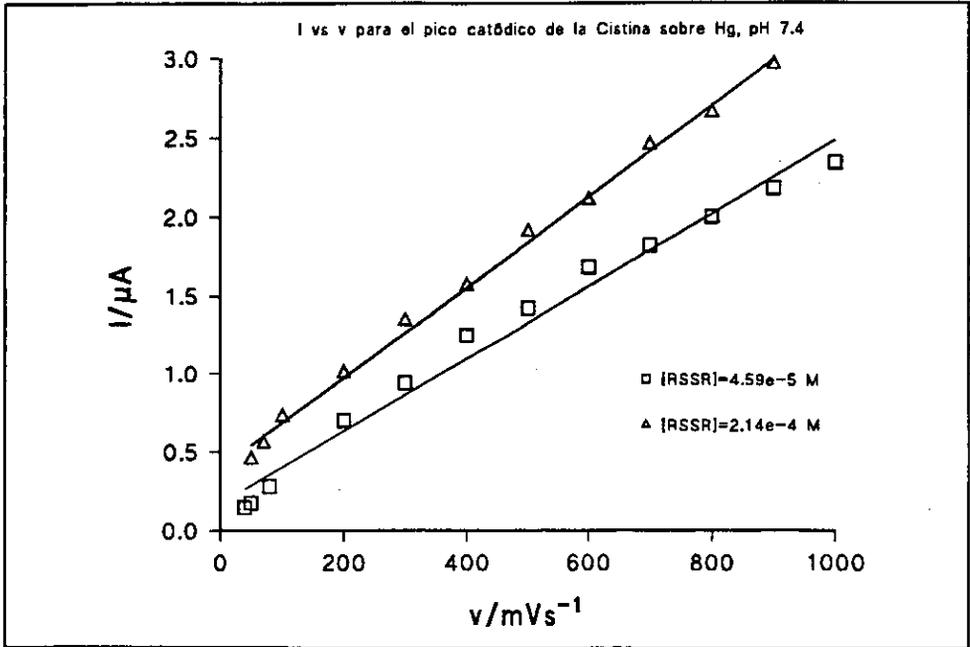
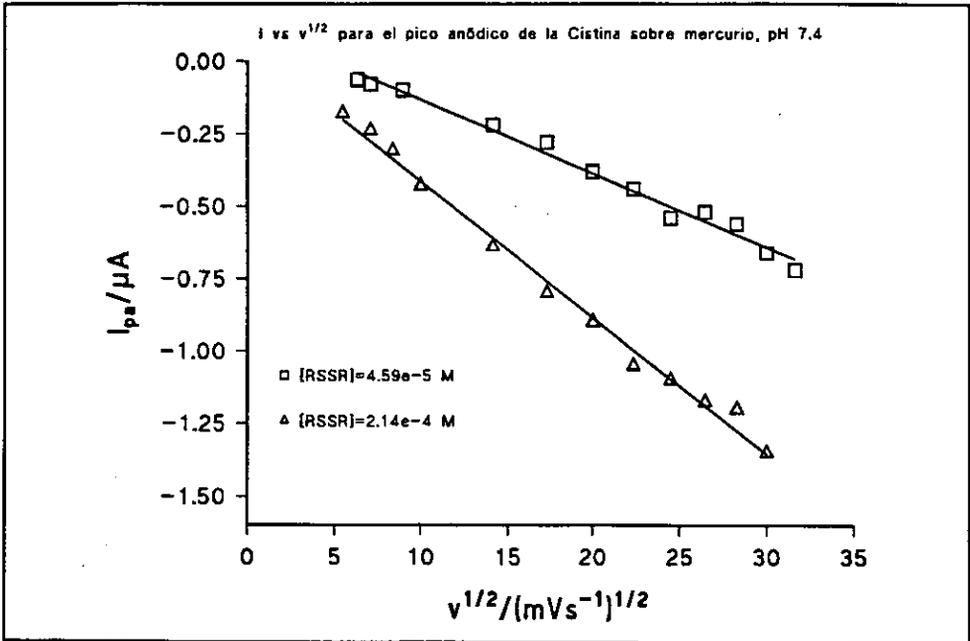


Figura IV.2.30.

Figura IV.2.31.



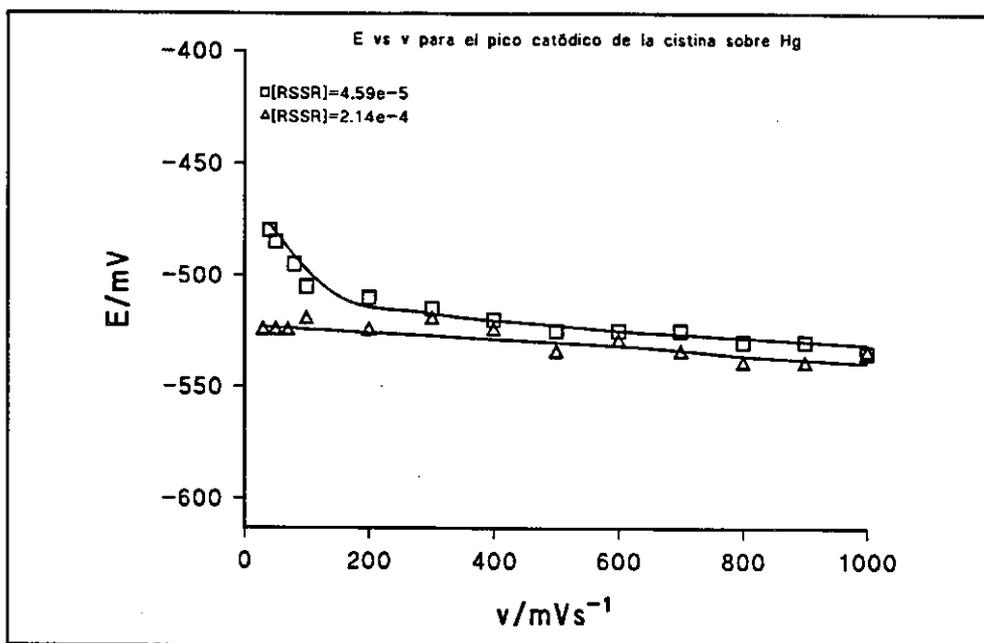


Figura IV.2.32.

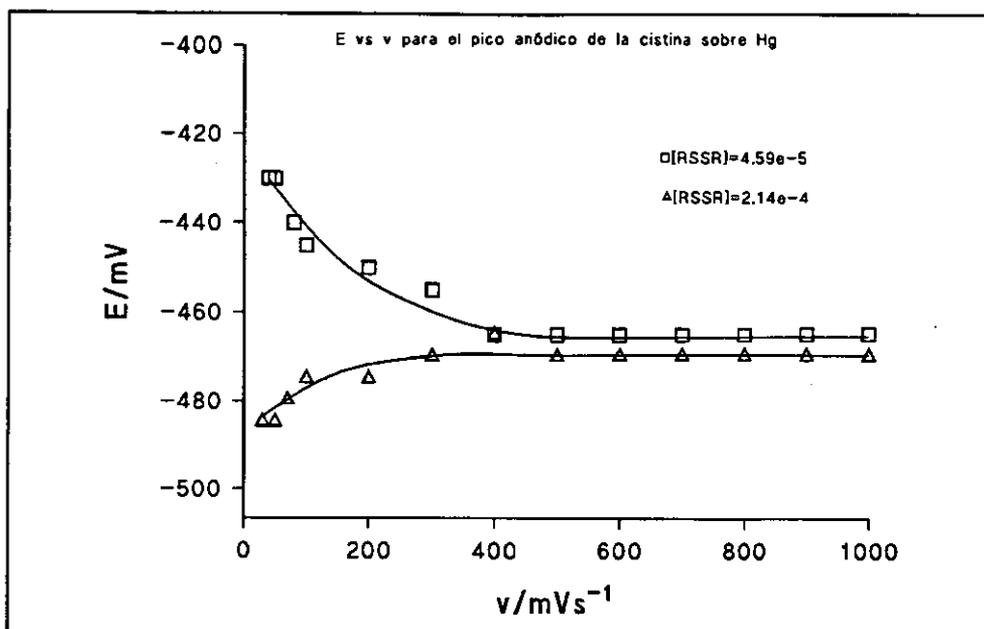


Figura IV.2.33

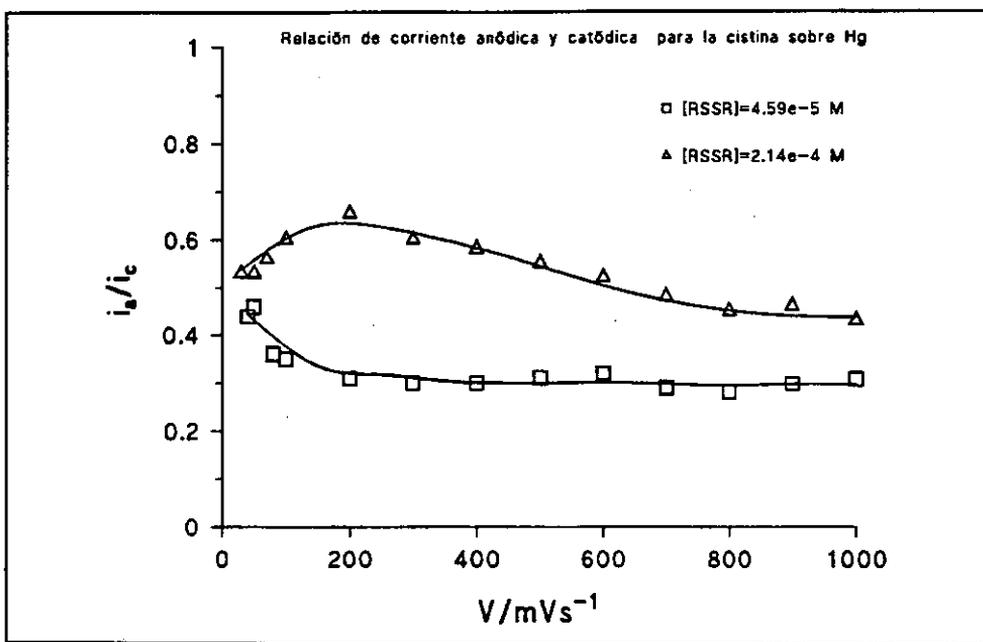


Figura IV.2.34.

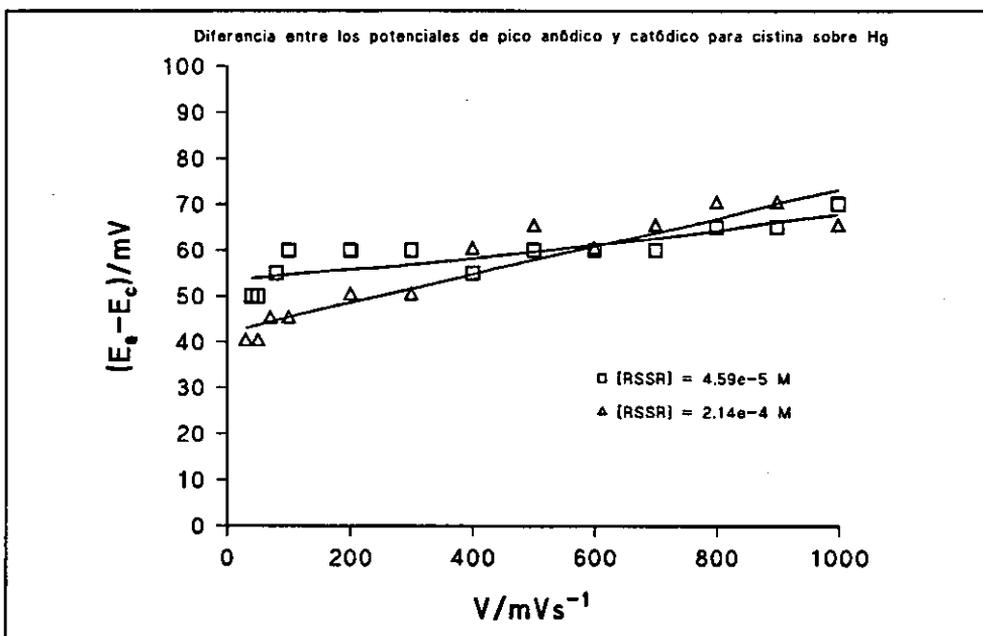
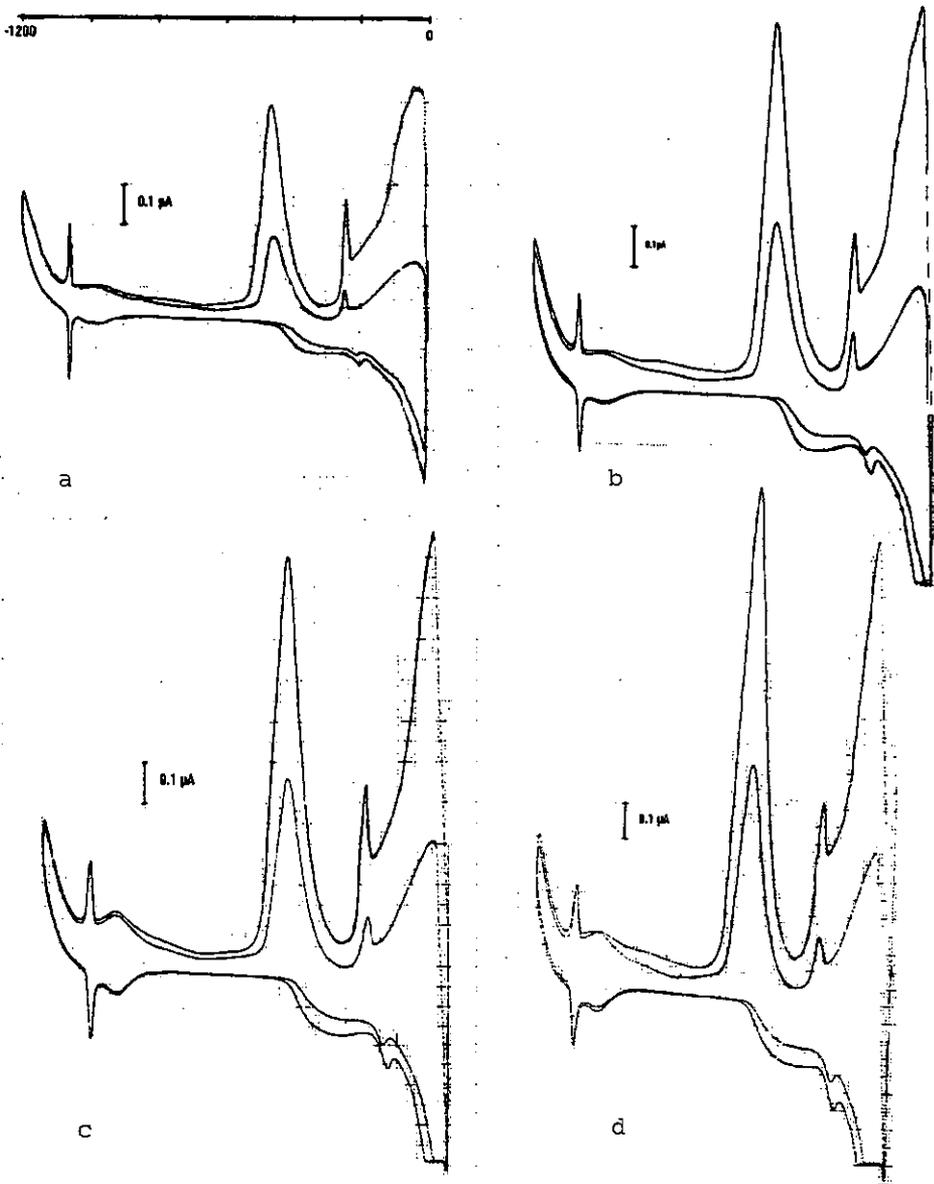


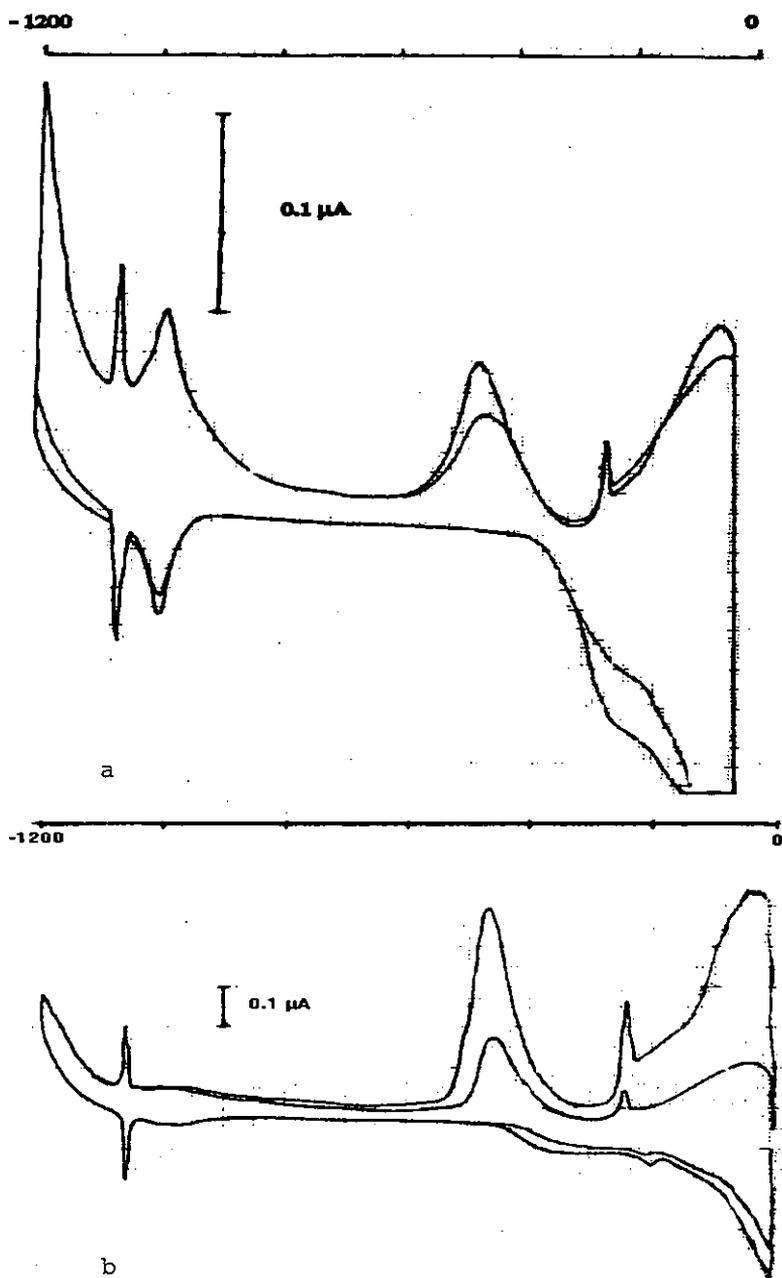
Figura IV.2.35.

Figura IV.2.36



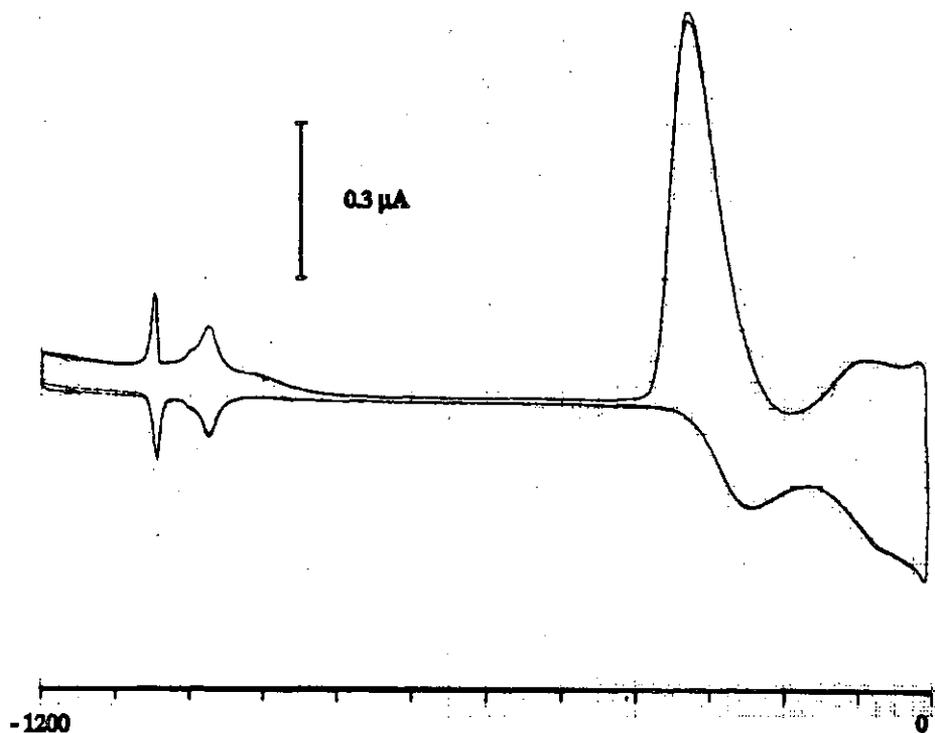
Registro voltamétrico de cistina  $4.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A = 0.0088 \text{ cm}^2$ . Primer y segundo ciclos para  $V_i = 0.0$ ,  $V_f = -1.200 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 200, b) 300, c) 400 y d) 500 mV/s.

Figura IV.2.37



Registro voltamétrico de cistina  $4.6 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Primer y segundo ciclos para  $V_b=0.2 \text{ V/s}$ , a)  $V_i=-1.200 \text{ V}$ ,  $V_f=0.0 \text{ V}$  y b)  $V_i=0.0 \text{ V}$ ,  $V_f=-1.200 \text{ V}$ .

Figura IV.2.38



Registros voltamétricos de 2-mercaptopiridina  $5.0 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Condiciones:  $V_i = -1.2 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b = 200 \text{ mV/s}$ .

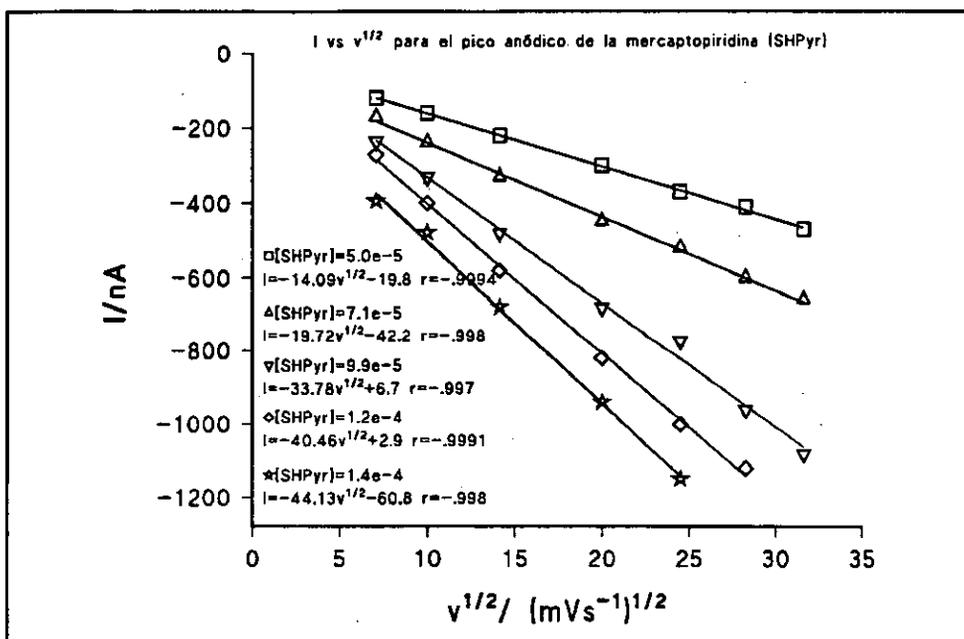


Figura IV.2.39.

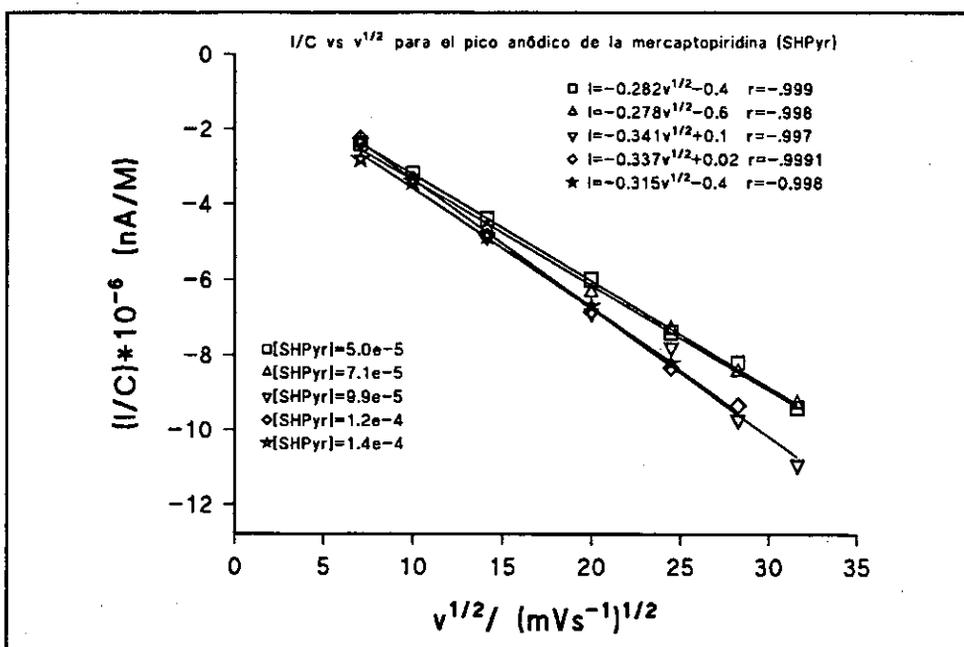


Figura IV.2.40

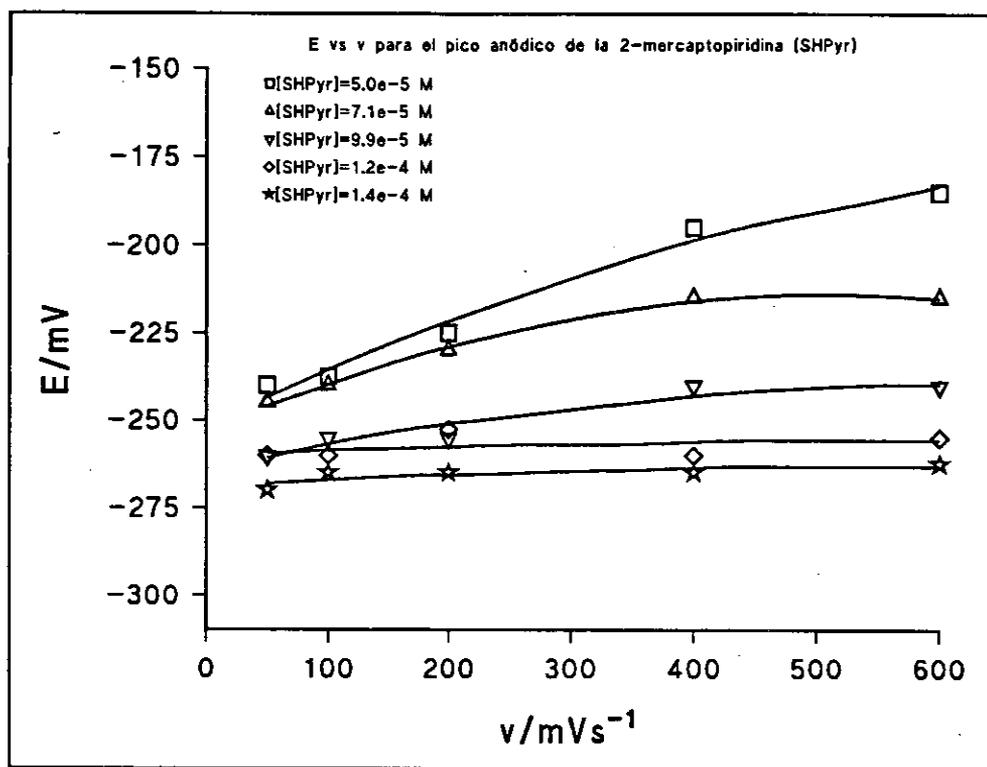
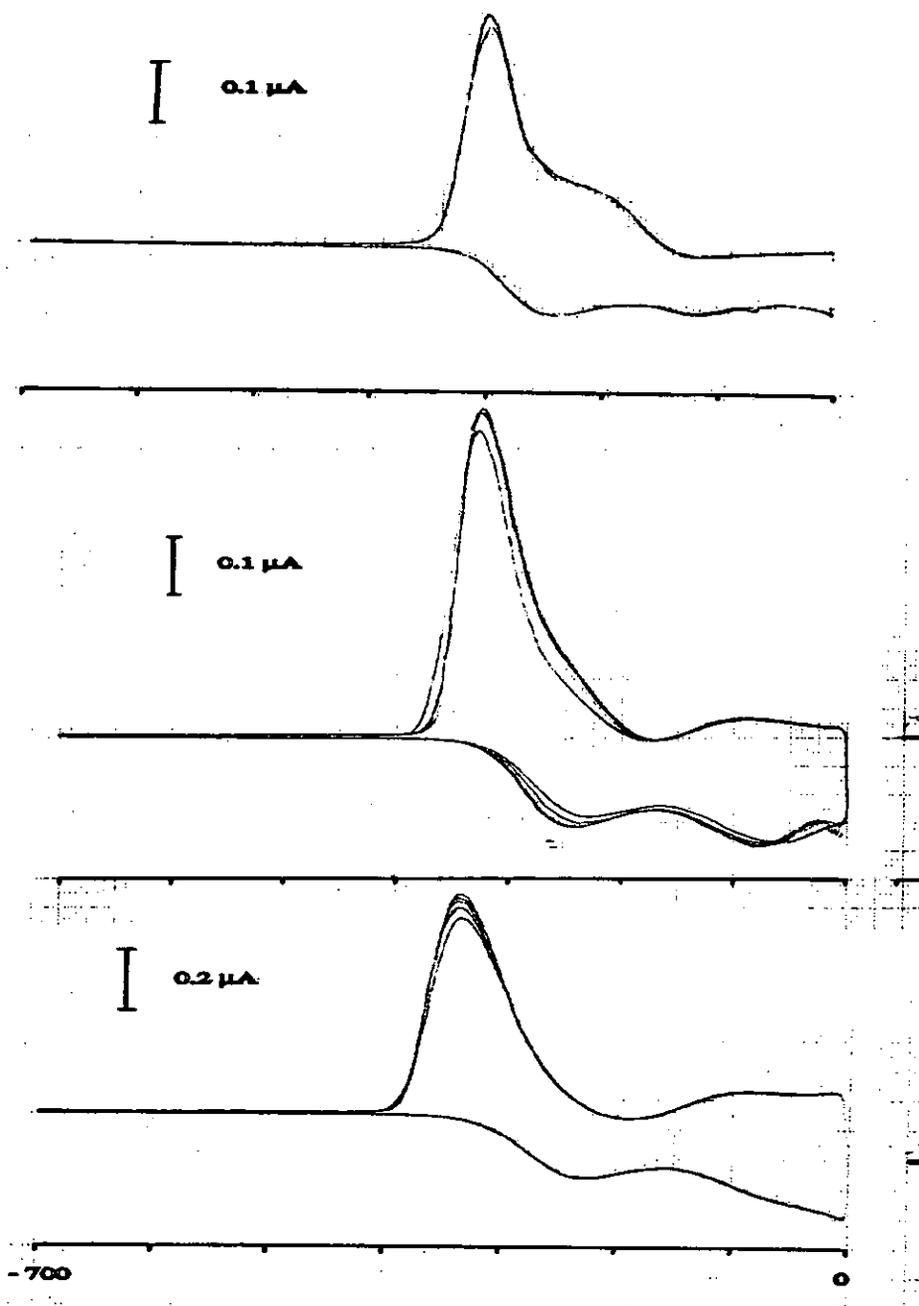


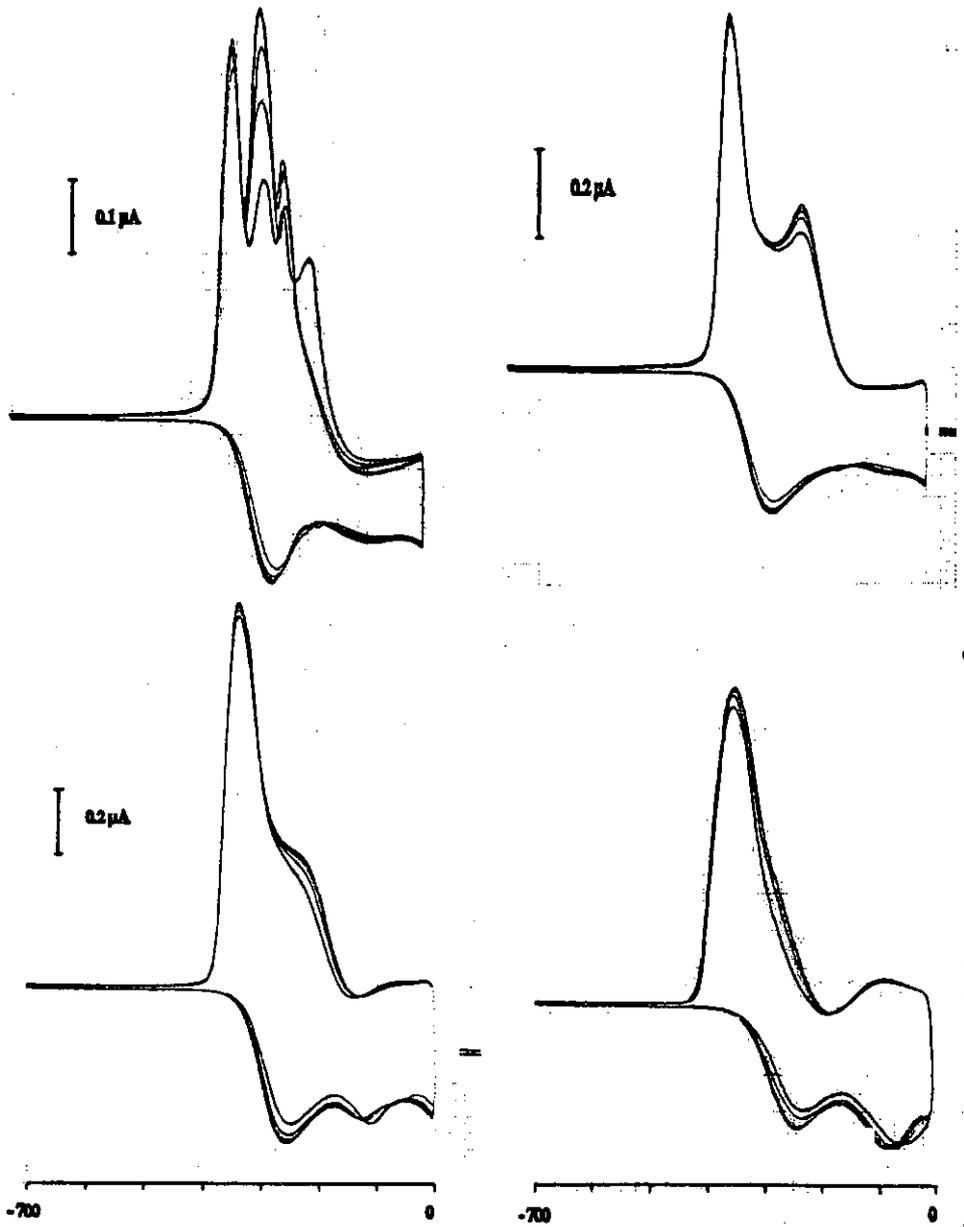
Figura IV.2.41.

Figura IV.2.42



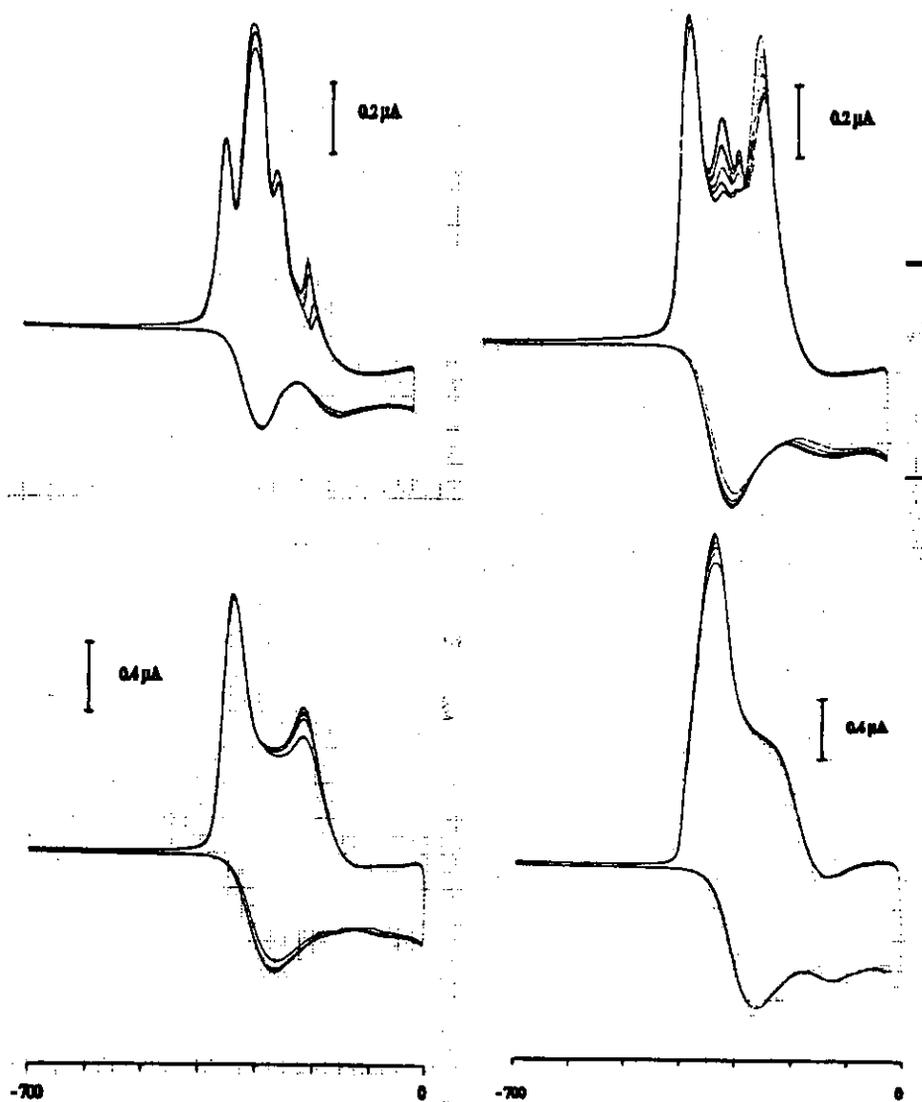
Registros voltamétricos de 2-mercaptopiridina  $5.0 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Condiciones:  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100 y c) 200 mV/s.

Figura IV.2.43



Registros voltamétricos de 2-mercaptopiridina  $9.9 \cdot 10^{-5} \text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A=0.0088 \text{ cm}^2$ . Condiciones:  $V_i = -0.7 \text{ V}$ ,  $V_f = 0.0 \text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100, c) 200 y d) 400 mV/s.

Figura IV.2.44



Registros voltamétricos de 2-mercaptopiridina  $1.4 \cdot 10^{-4}\text{M}$  en medio KCl 0.1 M y DOPC, pH 7.4.  $A=0.0088\text{ cm}^2$ . Condiciones:  $V_i = -0.7\text{ V}$ ,  $V_f = 0.0\text{ V}$  y  $V_b =$  a) 50, b) 100, c) 200 y d) 400 mV/s.

## V. Conclusiones

- 1.- Se ha puesto a punto una técnica de transferencia de monocapas lipídicas autoorganizadas desde la interfase aire/agua a la interfase Hg/agua; ésta última constituye un sistema conveniente de membrana biomimética por el estudio de procesos redox.
- 2.- Se ha estudiado la adsorción de iones  $T\phi B^-$  y  $T\phi P^+$  sobre monocapas de fosfatidilcolina y fosfatidilserina a partir de la dependencia de la carga que fluye como consecuencia de saltos de potencial que originan la translocación de los iones a través de la monocapa.
- 3.- En la escala de tiempos de cien milisegundos la translocación de  $T\phi P^+$  está controlada por la difusión desde la disolución en tanto que la del  $T\phi B^-$  está controlada por la adsorción en la región polar.
- 4.- Se han interpretado las desviaciones de la isoterma de Henry sobre la base de una isoterma de adsorción que tiene en cuenta la existencia de cargas discretas y de dos regiones de diferente constante dieléctrica: la región hidrocarbonada ( $\epsilon_1=2$ ) y la región polar ( $\epsilon_2=8-30$ ).
- 5.- Se ha estudiado mediante voltametría cíclica el comportamiento de la L-cisteína y de la L-cistina en diferentes condiciones experimentales de concentración, pH, tiempo de agitación, potencial inicial, tiempo de electrolisis, etc. El comportamiento observado es, en general, complejo; no obstante puede interpretarse, al menos cualitativamente, a partir de un modelo cuasi-químico bidimensional debido a Matsuda y col. que tiene en cuenta las interacciones intermoleculares.
- 6.- Se ha comprobado que ni la cisteína ni la cistina penetran desde la disolución de forma apreciable a través del fosfolípido en la región del mínimo (-0.2V a -0.8V) capacitivo y que en ambos casos se necesita recurrir a potenciales positivos extremos (próximos a 0V) donde penetra con formación de compuestos mercuriales. El comportamiento es cuasirreversible o irreversible.

7.- El proceso inverso de escape de la cisteína desde la superficie electródica hacia la disolución, a través de la monocapa de fosfolípido, sí se ha observado a tiempos suficientemente largos, en la zona del mínimo de capacidad.

8.- Se ha calculado la constante de velocidad del proceso de reducción del compuesto mercurial para dar lugar a la formación de cisteína, por aplicación de las teorías de Gileadi-Conway-Laviron; en condiciones de bajos recubrimientos superficiales y en ausencia de difusión.

9.- La 2-mercaptopiridina penetra en la monocapa en la zona del mínimo capacitivo en contraste al comportamiento exhibido por la cisteína y la cistina, si bien dicho comportamiento tampoco es reversible.

10.- Se ha propuesto un modelo de solubilidad-difusión para la penetración de la 2-mercaptopiridina, basado en la mayor hidrofobicidad de este compuesto, que permite racionalizar los resultados obtenidos.

## **VI. Bibliografía**

**VI. Bibliografía**

- Andersen, O. S. y M. Fuchs, 1975. *Biophys. J.*, 15, 795-830.
- Andersen, O. S. y S. Feldberg, H. Nakadomari, S. Levy y S. McLaughlin, 1978. *Biophys. J.*, 21, 35-70.
- Angerstein-Kozłowska, H., J. Klinger, B. E. Conway, 1977. *J. Electroanal. Chem.* 75, 61.
- Angerstein-Kozłowska, H., B. E. Conway, 1979. *J. Electroanal. Chem.* 95, 1-28
- Bard, A.J. y L.R. Faulkner, 1980. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications.* Wiley and Sons, Inc.
- Barlow, C.A. y J.R. MacDonald, 1967. *Advan. Electrochem. Eng.* 6, 1-200.
- Benz, R., P. Lauger, K. Janko, 1976. *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 701-720.
- Bockris, J., S. U. M. Khay, 1993. *Surface Electrochemistry: A Molecular Approach*, Plenum Press, N.Y.
- Bondi, A., 1964. *J. Phys. Chem.*, 68, 441-451.
- Brock, W., G. Stark, P.C. Jordan, 1981. *Biophys. Chem.*, 13, 329-348.
- Bruner, L. J., 1975. *J. Membrane Biol.*, 22, 125-141.
- Büldt, G., H.U. Gally, A. Seelig y J. Seelig, 1978. *Nature*, 271, 182-184.
- Cantor, C.R., P.R. Schimmel, 1980. *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman, New York.
- Cecil, R., D. J. Weizmann, 1964. *Biochem J.* 93, 1.
- Conway, B.E., H. Angerstein-Kozłowska, D. Dhar, 1974. *Electrochim. Acta* 195, 455.
- Damaskin, B.B., O. A. Petrii, V.V. Batrakov, 1971. *Adsorption of organic compounds on electrodes*, Cap. 1-4. Plenum Press, N.Y.
- Degrad, C., E. Laviron, 1981, *J. Electroanal. Chem.*, 117, 283-293
- Fendler, J. H., 1982, *Membrane Mimetic Chemistry.* Wiley.
- Flewelling, R.F., W.L. Hubble, 1986. *Biophys. J.* 49, 541-552.
- Grigor'ev, P. A. , L.N. Yermishkin y V. S. Markin, 1972. *Biofizika*, 17, 788-793.
- Guidelli, R., 1981. *J. Electroanal. Chem.* 123, 59
- Guidelli, R., 1986a. *J. Electroanal. Chem.*, 197, 77
- Guidelli, R., 1986b, en *Trend in Interfacial Electrochemistry*, Editor A.F. Silva, D. Reidel Dordrecht, pág. 387-452.
- Guidelli, R., L. Foresti, 1986c. *J. Electroanal. Chem.* 197, 103.
- Guidelli, R., 1992, en *Adsorption of Molecules at Metal Electrodes*, Cap. 1 , editor

## Bibliografía

---

- J.Lipkowski, P.N.Ross VCH, Weinheim.
- Hall, J.E., C. A. Mead y G. Szabo, 1973. *J. Membrane Biol.*, 11, 75-97.
- Hauser, H., y M. C. Phillips, 1979. *Prog. Surface and Membr. Science*, 13, 297-413.
- Heyrovsky, M., P. Mader, V. Vesela, M. Fedurco, 1994. *J. Electroanal Chem.* 369, 53-70.
- Hulbert, H.H., I. Shain, 1970. *Anal. Chem.* 42 (2), 162.
- Ketterer, B., B. Neumcke, y P.Läuger, 1971. *J. Membrane Biol.*, 5, 225-245.
- Lauger, P., R. Benz, G. Stark, E. Bamberg, P.C. Jordan, A. Fahr y W. Brock, 1981. *Quart. Rev. Biophys.*, 14, 513-598.
- Laviron, E., 1974a, *J. Electroanal. Chem.*, 52, 355-393
- Laviron, E., 1974b, *J. Electroanal. Chem.*, 52, 395
- Laviron, E., 1975, *J. Electroanal. Chem.*, 63, 245.
- Laviron, E., 1979a, *J. Electroanal. Chem.*, 100, 263.
- Laviron, E., 1979b, *J. Electroanal. Chem.*, 101, 19-28
- Laviron, E., 1979c, *J. Electroanal. Chem.*, 105, 25
- Laviron, E. y L. Roullier, 1980. *J. Electroanal. Chem.*, 115, 65-74
- Laviron, E., 1982, en *Electroanal. Chem.* , Bard, A. J., editor, Vol. 12, Marcel Dekker, New York.
- Lecompte, M.F., I.R. Miller, J.Elion, R. Berarous, 1980. *Biochem.* 19, 3434.
- Lecompte, M.F., I.R. Miller, 1980. *Biochem.* 19, 3439.
- Lecompte, M.F., J. Clavilier, C. Dode, J. Elion, I.R.Miller, 1984. *J. Electroanal. Chem.* 163, 345.
- Lecompte, M.F., C. Dode, 1991. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 29, 149.
- Leermakers y Nelson, A., 1990. *J. Electroanal. Chem.* 278, 53-72
- Lester, D.S., L. Doll, V. Brumfeld, I.R. Miller, 1990. *Biochim. Biophys. Acta* 1039, 33.
- Levine, S., G.M. Bell, D. Calvert, 1962. *Can. J. Chem.*, 40, 518-537.
- Levine, S., K. Robinson, G.M. Bell, J. Mingins, 1972. *J. Electroanal. Chem.*, 38, 253-269.
- Lieberman E. A., V. P. Topaly, 1968. *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 125-136.
- Matsuda, H., K.Aoki, K.Tokuda, 1987a. *J. Electroanal. Chem.*, 217, 1-13.
- Matsuda, H., K.Aoki, K.Tokuda, 1987b. *J. Electroanal. Chem.*, 217, 15-32.
- Miller, I.R., Y. Risphon, A. Tenenbaum, 1976. *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 3, 528.

### *Bibliografía*

---

- Miller, I.R., D. Bach, M. Teuber, 1978. *J. Membr. Biol.* 39, 49.
- Miller, I.R., 1981, in *Topics in Bioelectrochem. and Bioenerg.* Vol 4 pag. 161.
- Miller, I.R., E. Yavin, 1988. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 19, 557-567
- Miller, I.R., H. Vinkler, E. Yavin, 1989. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 22, 365-377.
- Miller, I.R., L. Doll, 1990. *Bioelectrochem and Bioenerg* 24, 129.
- Miller, I.R., L. Doll, D.S. Lester, 1992. *Bioelectrochem and Bioenerg* 20, 85.
- Moncelli, M.R., R. Guidelli, 1992. *J. Electroanal. Chem.*, 326, 331-338.
- Moncelli, M. R., L. Becucci, R.Guidelli., 1994a. *Biophys. J.*, 66, 1969-1980.
- Moncelli,R.M., Herrero, R., L. Becucci, R. Guidelli, 1994b. *Biophys. J.*, en imprenta.
- Moncelli, M.R., L. Becucci, R.Guidelli, 1994c, *J. Electroanal. Chem.*, en imprenta
- Nelson, A. y A. Benton, 1986. *J. Electroanal. Chem.*, 202, 253-270 .
- Nelson, A. y A. Benton, 1987. *Analitica Chimica Acta* 194, 139-149
- Nelson, A. y N. Auffret, 1988a. *J. Electroanal. Chem.* 248, 167-180
- Nelson, A. y N. Auffret, 1988b. *J. Electroanal. Chem.*, 244, 99-113.
- Nelson, A. y N. Auffret y J. Readman, 1988c. *Anal. Chim. Acta* 207, 47-57
- Nelson, A. y H.P. van Leeuwen, 1989a. *J. Electroanal. Chem.*, 273, 183-199.
- Nelson, A. y H.P. van Leeuwen, 1989b, *J. Electroanal. Chem.*, 273, 201-208
- Nelson, A. y F.A.M. Leermakers, 1990. *J. Electroanal. Chem.*, 278, 73-83
- Nelson, A, N. Auffret y J. Borlakoglu, 1990. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1021, 205-216.
- Nelson, A., 1991a. *J. Electroanal. Chem.*, 303, 221-236
- Nelson, A., 1991b. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 87 (12), 1851-1856
- Nelson , A., 1992. *J. Electroanal. Chem.*, 335 , 327-343
- Nelson, A., 1993a. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 89 (15), 2799-2805.
- Nelson, A., 1993b. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 89 (16), 3081-3090.
- Neumcke, B. y P. Lauger, 1969. *Biophys. J.*, 9, 1160-1170.
- Noel, M., S.Chandrasekaran, C. Ahmed Basha, 1987, *J. Electroanal. Chem.*, 225, 93-109.
- Pavolvic, O., I.R. Miller, 1971. *Experientia Suppl.*, 18, 513.
- Pearson, R. H., y I. Pascher, 1979. *Nature*, 281, 499-501.
- Ralph, T.R., M.L. Hitchman, J.P. Millington y F.C. Walsh, 1994. *J. Electroanal. Chem.* 375, 1-15.

### *Bibliografía*

---

- Risphon, J., I.R. Miller, 1975a. *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 2, 215.
- Risphon, J., I.R. Miller, 1975b. *J. Electroanal. Chem.*, 65, 453.
- Risphon, Y., I.R. Miller, 1977. *J. Colloid Interface Sci.* &0, 406.
- Sánchez Maestre, M., R. Rodríguez Amaro, E. Muñoz, J.J. Ruiz, R. Camacho, 1994. *J. Electroanal. Chem.*, 373, 31-37
- Sastre de Vicente, M.E., 1986. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- Sastre de Vicente, M.E. y J.M. López Fonseca, 1993. *Métodos Voltamétricos: Aplicación al estudio de reacciones electródicas complejas. Monografía 14, Universidade da Coruña.*
- Srinivasan, S., E. Gileadi, 1966. *Electrochimica Acta* ,11, 321-335.
- Stankovich, M. T. y A.J. Bard, 1977, *J. Electroanal. Chem.*, 75, 487-505.
- Stein, W.D., 1986. *Transport and Diffusion across cell membranes. Academic Press.*
- Tsien, R. y S. Hladky, 1982. *Biophys. J.*, 39, 49-56.
- Tsien, R. Y., 1978. *Biophys. J.*, 24, 561-567.
- Wang C.C. y L. J. Bruner , 1978a. *J. Membrane Biol.*, 38, 311-331
- Wang C.C. y L. J. Bruner , 1978b. *Biophys. J.*, 24, 749-764
- Wopschal, R.H., I. Shain, 1967. *Anal. Chem.*, 39 (13), 1514-1527.
- Zaccai, G., G. Büldt, A. Seelig y J. Seelig, 1979. *J. Mol. Biol.*, 134, 693-706.

## **VII. Apéndice**

**APENDICE:**

**VOLTAMETRIA LINEAL Y CICLICA DE MONOCAPAS ADSORBIDAS**

**Introducción**

Las contribuciones iniciales a la voltametría cíclica se deben a Sevcik, Juillard, Randalls, Nicholson y Shain, y Saveant y Viannelo. Estos autores desarrollaron las bases para la comprensión de las curvas I-V entre 1948 y 1965. Sus trabajos se centraron en el tratamiento de la difusión bajo condiciones complejas, restando importancia a la adsorción de radicales y su influencia sobre la velocidad de transferencia electrónica. Este tratamiento es apropiado para reacciones sin especies adsorbidas, dado que sobrevalora la transferencia de masa sobre las reacciones superficiales. El primer tratamiento que considera la cinética de barrido de potencial incluyendo adsorción es el debido a Srinivasan y Gileadi (1966) y posteriormente los desarrollos de Conway y colaboradores, especialmente Angerstein-Kozłowska y Stonehart (Bockris, 1993). Laviron (1982) ha tratado el problema y sus ecuaciones son, esencialmente, coincidentes con las de Conway y col. Por esto se han incluido los modernos desarrollos de Matsuda, Aoki y Tokuda (1987a y b) con una base mecanoeestadística distinta de los tratamientos anteriores. Finalmente se hace mención a situaciones en presencia de transiciones de fase destacando los resultados del trabajo de M. Noel, S. Chandrasekaran y C. Ahmed Basha (1987) y Sánchez Maestre y col. (1994).

Todos los tratamientos se centran a sistemas no difusivos y por tanto se omiten los trabajos clásicos de Wopschal, R.H., I. Shain, (1967). Parte de los resultados obtenidos por los distintos autores se han utilizado en la interpretación de algunos de los datos experimentales obtenidos, la síntesis efectuada puede servir de referencia para posteriores desarrollos y servir de visión conjunta para principiantes en este campo; la nomenclatura de cada artículo se ha mantenido en su formato original.

**A) TRATAMIENTO DE S. SRINAVASAN, E. GILEADI (1966) Y ANGERSTEIN-KOZŁOWSKA, H., B. E. CONWAY (1979).**

Para determinar la forma general de las curvas intensidad-potencial, se considera el proceso de transferencia de carga en el cual las posiciones superficiales libres M con una concentración superficial relativa  $(1-\theta)$  reaccionan con la especie A en la solución para formar una especie MB quimiadsorbida sobre la superficie (recubrimiento  $\theta$ ),



Srinivasan y Gileadi (1966) efectuaron un tratamiento matemático conducente a la relación intensidad-potencial en ausencia de difusión.

Si la isoterma de adsorción electroquímica para B es:

$$\frac{\theta}{(1-\theta)} = K_1 e^{-g\theta} e^{VF/RT} \quad (\text{A.2})$$

donde  $g$  es el parámetro de interacción, la ecuación básica para la densidad de corriente anódica en función del potencial para la reacción descrita por la ec (1) es

$$i = k_1(1-\theta) e^{VF/2RT} e^{-g\theta/2} - k_{-1}\theta e^{-VF/2RT} e^{g\theta/2} \quad (\text{A.3})$$

donde  $k_1$  y  $k_{-1}$  son las velocidades de reacción directa e inversa cuando  $V=0$ , y  $K_1 = k_1/k_{-1}$  y se supone  $\alpha=0,5$ .

A velocidades de barrido suficientemente lentas, para las cuales la densidad de corriente capacitiva es despreciable:

$$i = i_F \quad (\text{A.4})$$

Srinivasan y Gileadi obtuvieron las soluciones de la ec(3), para  $g=0$ , cuando la velocidad de reacción es prácticamente igual a la velocidad directa (situación de irreversibilidad) y cuando la reacción está prácticamente en equilibrio (situación de reversibilidad).

*A.1. Reacción altamente irreversible.* Bajo las condiciones establecidas para esta clase de reacción,

$$i = k_1(1-\theta) e^{VF/2RT} e^{-g\theta/2} \quad (\text{A.5})$$

o, en forma diferencial, dado que  $V = V_i + vt$ , con  $\theta \rightarrow 0$ :

$$\frac{di}{dt} = k_1 e^{VF/2RT} \left[ (1-\theta) \frac{vF}{2RT} - \frac{d\theta}{dt} \right] \quad (\text{A.6})$$

donde  $v$  es la velocidad de barrido en voltios por segundo. La corriente alcanzará un máximo cuando  $di/dt=0$ , esto es

$$\frac{d\theta}{dt} = (1-\theta) \frac{vF}{2RT} \quad (\text{A.7})$$

Si  $Q$  es la cantidad de carga necesaria para formar una monocapa de intermedio adsorbido, la corriente se puede escribir como

$$i = Q \frac{d\theta}{dt} \quad (\text{A.8})$$

Según esto, la corriente máxima será (fig. A.1):

$$i_p = Q(1-\theta) \frac{vF}{2RT} \quad (\text{A.9})$$

El potencial correspondiente a la corriente del pico se puede obtener a partir de las ec. (A.9) y (A.5).

$$V_p = \frac{2RT}{F} \ln \frac{QF}{2k_1RT} + \frac{2RT}{F} \ln v \quad (\text{A.10})$$

Se observa que la posición del pico varía con la velocidad de reacción y que la pendiente de la representación  $V_p$  vs.  $\ln v$  es  $2RT/F$ . En el caso de un comportamiento altamente reversible se comprobará más adelante que el potencial de pico es independiente de la velocidad de barrido. Esto aporta un criterio para analizar la reversibilidad del proceso.

A partir de las ec. (A.5) y (A.8),

$$Q \frac{d\theta}{dt} = k_1(1-\theta) e^{vF/2RT} \quad (\text{A.11})$$

como

$$V = V_i + vt \quad (\text{A.12})$$

$$-d \ln(1-\theta) = \frac{k_1}{Q} e^{FV_i/2RT} e^{vF/2RT} dt \quad (\text{A.13})$$

por consiguiente

$$-\ln(1-\theta) = \frac{k_1}{Q} \frac{2RT}{vF} e^{FV_i/2RT} e^{vF/2RT} + B \quad (\text{A.14})$$

A  $t=0$ ,  $\theta=0$ , de donde

$$-\ln(1-\theta) = \frac{k_1}{Q} \frac{2RT}{vF} e^{FV_i/2RT} (e^{vF/2RT} - 1) \quad (\text{A.15})$$

A partir de las ec.(A.5) y (A.15),

$$\ln i = \ln k_1 - \frac{k_1}{Q} \frac{2RT}{vF} e^{FV/2RT} (e^{(V-v)F/2RT} - 1) + \frac{VF}{2RT} \quad (\text{A.16})$$

Esta ecuación muestra la dependencia i-V independiente de  $\theta$ . Cuando el segundo término del lado derecho es despreciable en comparación con el tercero se obtiene una representación lineal tipo Tafel de pendiente  $b=2RT/F$ . Las desviaciones de esta pendiente dependen de la velocidad de barrido y son mínimas a velocidades de barrido pequeñas.

La ecuación para  $i_p$  se obtiene sustituyendo V por  $V_p$  en la ec. (A.10).

$$\ln i_p = \ln \left( \frac{QF}{2RT} v \right) + \left( \frac{2k_1RT}{QFv} e^{V_p F/2RT} - 1 \right) \quad (\text{A.17})$$

si

$$\frac{2k_1RT}{QFv} e^{V_p F/2RT} < 1 \quad (\text{A.18})$$

entonces

$$\ln i_p = \ln \left( \frac{QF}{2RT} v \right) - 1 \quad (\text{A.19})$$

o bien,

$$i_p = \frac{QF}{e2RT} v \quad (\text{A.20})$$

Se observa que la corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido con una pseudocapacidad de adsorción aparente independiente de la velocidad de barrido.

$$C_p = \frac{dq}{dV} = \frac{d(idt)}{dV} = \frac{di}{dv} = \frac{i_p}{v} = \frac{QF}{e2RT} \quad (\text{A.21})$$

A.2. *Reacción reversible.* Bajo estas condiciones,  $i \approx 0$  (condición de pseudoequilibrio) y, a partir de la ecuación (A.3) con  $g=0$ ,

$$\frac{\theta}{(1-\theta)} = K_1 e^{VF/RT} \quad (\text{A.22})$$

Así,

$$\theta = \frac{K_1 e^{VF/RT}}{1 + K_1 e^{VF/RT}} = \frac{K_1}{e^{-VF/RT} + K_1} \quad (\text{A.23})$$

y

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{K_1}{(e^{-VF/RT} + K_1)^2} \frac{F}{RT} e^{-VF/RT} v \quad (\text{A.24})$$

dado que  $V=V_i+vt$ . Combinando las ec. (A.8) y (A.24) se obtiene,

$$i = \frac{K_1 e^{-VF/RT}}{(e^{-VF/RT} + K_1)^2} \frac{FQ}{RT} v \quad (\text{A.25})$$

donde se observa que la corriente es proporcional a la velocidad de barrido.

La condición de máximo en una curva  $i-V$  o  $i-t$  es que  $di/dt=0$ . Diferenciando la ec. A.25, se obtiene

$$\frac{di}{dt} = - \frac{K_1 - e^{-VF/RT}}{(e^{-VF/RT} + K_1)^3} \left( \frac{Fv}{RT} \right)^2 e^{-VF/RT} K_1 Q \quad (\text{A.26})$$

El potencial correspondiente a la corriente de pico es

$$V_p = - \frac{RT}{F} \ln K_1 \quad (\text{A.27})$$

y la corriente de pico correspondiente es

$$i_p = \frac{QF}{4RT} v \quad (\text{A.28})$$

En este caso, el potencial de pico es independiente de la velocidad de barrido, mientras que la corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido.

**A.3. Caso general para  $g=0$ .** En esta situación no es posible deducir analíticamente una ecuación  $i-V$  similar a la (A.16) o (A.25) partiendo de la ec.(A.3), sino que es necesario resolverla numéricamente para valores dados de los parámetros  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $g$  y  $v$ . Las soluciones se representan en función de la pseudocapacidad de adsorción ( $C=i_p/v$ ) como función de  $V$  para las diferentes velocidades de barrido reducidas  $v/k$ . Los resultados de este problema

fueron obtenidos por Angerstein-Kozłowska, Klinger y Conway (1977) mediante análisis numérico por simulación con ordenador.

En la fig 2 se muestran los perfiles C vs. V para el caso de  $g=0$ . Cuando  $v/k \leq 10^{-2}$ , el pico aparece a su potencial reversible estándar y se desplaza cuando aumenta la velocidad de barrido. En la fig 3 se representan algunas magnitudes que caracterizan el comportamiento irreversible del sistema como función de  $\log(v/k)$ , a saber: (a) el potencial de pico,  $V_p$ ; (b) la pseudocapacidad del pico,  $C_p$ , y (c) el potencial de semipico,  $\Delta V_{1/2}$ . La representación de  $V_p$  vs  $\log(v/k)$ , a altas velocidades de barrido, muestra una pendiente de  $2.303(2RT/F)$  como cabe esperar a partir de la ec. (A.10), mientras que a velocidades inferiores  $V_p$  es constante de acuerdo con la ec. (A.27). La figura 3 proporciona un criterio para caracterizar el grado de irreversibilidad del proceso. Una extrapolación de  $V_p$  frente a  $\log(v/k)$  a el potencial reversible proporciona un valor de la velocidad de barrido extrapolada  $v_0$ . Una representación de  $C_p$  frente a  $\log(v/k)$  muestra una transición del comportamiento reversible a un comportamiento totalmente irreversible cuando  $v/k$  aumenta. Asimismo el valor de la capacidad del pico disminuye hasta alcanzar un valor límite y la forma de la curva C vs V se hace asimétrica. El cambio de la forma del pico también se refleja en los valores del potencial de semipico, el cual tiene valores constantes y diferentes para las dos situaciones límites. Para el caso totalmente irreversible la representación  $V_p$  vs  $\log i$  muestra un comportamiento tipo Tafel.

La figura 4 muestra el efecto de invertir la dirección del barrido de potencial en las curvas C-V. Para el caso de comportamiento totalmente reversible el barrido catódico constituye una imagen especular del barrido anódico. Un aumento de  $v$  provoca un aumento de la irreversibilidad del proceso por lo que el pico se desplaza en la dirección del barrido (hacia potenciales más positivos para el barrido anódico y más negativos para el catódico) y aumenta la separación entre los dos picos (fig. A.4d). El aumento de la irreversibilidad también se puede observar cuando el barrido se invierte previamente a la formación de la monocapa en el barrido directo. En este caso la corriente no toma el valor que tendría para la reducción de la monocapa completa, sino que aparece un recorte en el perfil de la curva C-V inversa, que, en el caso totalmente irreversible, consiste en un desplazamiento del perfil de la corriente reversa. Una característica importante de la familia de curvas en la fig 4d es que los perfiles de las representaciones C-V generados en el barrido inverso tienen formas idénticas y, por tanto, el mismo valor del potencial de semipico y del potencial de pico. Esto es consecuencia de la reducción de diferentes cantidades de B generadas en la etapa directa precedente tomados a diferentes potenciales. Las curvas difieren en un factor de escala determinado por Q veces el valor de  $\theta$  obtenido al potencial al cual comienza el barrido inverso. En la tabla 1 se da un resumen de los parámetros característicos para el caso de una reacción superficial con intervención de un electrón y con  $g=0$ .

**A.4 Efecto de la interacción lateral ( $g \neq 0$ ) en la capa quimiadsorbida.** La existencia de interacciones laterales entre las especies quimiadsorbidas y la superficie, esto es cuando  $g \neq 0$  en la isoterma (3), tiene el efecto de cambiar la forma de las curvas C vs V, haciéndolas más anchas y bajas cuando  $g$  crece positivamente y más altas y apuntadas para valores de  $g$  decrecientes comprendidos en el intervalo  $-4 < g < 0$ . La figura 5 muestra varias curvas C vs. V para la reacción de la ec.(A.1) a distintos valores de  $v/k$  cuando  $g \neq 0$ . El comportamiento representado es el correspondiente a  $g=-2$  y  $+2$  y puede compararse con el de  $g=0$  en la fig. A.2.

La figura 6 muestra el comportamiento de  $\Delta V_{1/2}$  para distintos valores positivos y negativos de  $g$ , y otros parámetros característicos de las curvas C vs V para la reacción (1), tales como el grado de recubrimiento,  $\theta_{p,B}$ , de B en el pico y el potencial de pico,  $V_p$ . En la figura 6 también se representa el grado de recubrimiento del estado estándar,  $\theta^0$ , como una función de  $g$ . De acuerdo con Conway y col.(1974), para  $g \neq 0$ ,  $\theta^0$  no se corresponde con el máximo de las curvas C vs V, sino con el potencial reversible estándar,  $E^0$ , definido, para todos los valores de  $g$ , como el potencial del pico correspondiente a la reacción (1) cuando se comporta reversiblemente sin interacciones laterales ( $g=0$ ).  $\theta^0$  permite encontrar  $E^0$  a partir de las curvas C vs V cuando  $g \neq 0$ .

El parámetro más útil para caracterizar interacciones en la capa superficial es  $\Delta V_{1/2}$ . Se necesita el signo y el valor de  $g$  por dos razones:

- i.- para calcular los parámetros cinéticos de la reacción superficial empleando la ec. (A.3) o mediante una representación de  $V_p$  vs  $\log(v/k)$  de donde se obtiene  $v_0$ ; y
- ii.- como indicación del estado eléctrico de las especies quimiadsorbidas.

El valor del parámetro  $g$  ejerce un efecto importante, no sólo sobre el valor de  $\Delta V_{1/2}$ , sino también sobre el valor relativo de  $C_p$  en la zona de transición desde el comportamiento totalmente reversible al irreversible en la ec (1) cuando aumenta  $v/k$ . Angerstein-Kozlowska y Conway (1979) mostraron esto de dos formas: a) comparando los perfiles de las curvas C vs V de la figura 5 para  $g=-2$  y  $2$  con los de la figura 2 para  $g=0$ , y b) representando  $\Delta V_{1/2}$  vs  $\log(v/k)$  para valores positivos y negativos de  $g$ . Para el caso de  $g$  positivo se observa un incremento de  $\Delta V_{1/2}$  al aumentar  $v/k$ , este efecto disminuye a medida que crece  $g$  y cuando se aproxima a 10 la variación es muy pequeña. Para valores negativos de  $g$ ,  $-4 < g < 0$ , se observa un aumento relativamente alto de  $\Delta V_{1/2}$  y cerca del valor  $-4$  continúa la variación con  $\log(v/k)$  en un rango más amplio que, por ejemplo, para  $g=0$ .

Para el caso de  $V_p$ , se aprecia un estrechamiento de la región de paso del comportamiento reversible al irreversible en la representación  $V_p$  vs  $\log(v/k)$  cuando  $g$  aumenta desde  $-4$  hasta valores positivos altos. Para valores de  $g$  negativos, el comportamiento reversible sólo se alcanza efectuando barridos muy amplios de  $\log(v/k)$ .

**A.5 Barrido inverso durante la formación de la monocapa.** Un procedimiento útil en el estudio de especies quimiadsorbidas sobre electrodos, capaz de indicar si  $g \neq 0$  para la capa adsorbida, consiste en invertir el barrido de potencial, en un experimento de multibarrido, a potenciales progresivamente más positivos o más negativos, es decir, a grados de recubrimientos crecientes. Para condiciones reversibles (fig. A.4) la curva obtenida en el barrido inverso es una imagen especular de la obtenida en el barrido directo independientemente del valor del factor  $g$ . Para condiciones totalmente irreversibles, la curva C vs. V inversa aparece desplazada respecto de la directa, pero si  $g=0$ , la forma de la curva no cambia al variar la cantidad de especie adsorbida; únicamente la altura del pico aumenta cuando es mayor la cantidad de la especie B desorbida en la reacción inversa (fig 4). Cuando  $g > 0$ , la energía libre de la capa adsorbida aumenta con el grado de recubrimiento (aparte de su componente dependiente de  $\theta$ ,  $RT \ln \theta / (1-\theta)$ ) (ec. A.2), de modo que las curvas del barrido inverso corresponden a situaciones de más, o menos, interacción en el film superficial; esto es, el valor de  $g\theta$  correspondiente al  $\theta$  inicial en el barrido inverso es mayor cuando mayor es el grado de recubrimiento. A partir de la ec (A.3) se ve que esto aumentará la corriente de la reacción inversa de modo que, al aumentar  $\theta$ , el pico de la reacción inversa aparecerá a potenciales más positivos.

La figura 7 muestran el efecto del barrido inverso para un ejemplo de reacción irreversible del tipo de la ec. (A.1) cuando  $g=2$  y  $-2$  respectivamente. Lo más interesante que se puede observar en esta figura es que los picos de corriente del barrido inverso, obtenidos para diferentes grados de recubrimiento generados en el barrido directo numerados del 1 al 7 en la fig. A.7, aparecen a potenciales progresivamente más positivos cuando  $g=2$  (o, de forma más general, cuando  $g > 0$ ) que cuando  $g=0$  ( $V_{p,g=0}$ ). Cuando  $g < 0$  (en general cuando  $-4 < g < 0$ ) los potenciales de pico en el barrido inverso se desplazan hacia valores más negativos a medida que aumenta el grado de recubrimiento inicial de la especie B.

*A.6 Nucleación y deposición de una fase.* Angerstein-Kozłowska, H., J. Klinger, B. E. Conway (1977) encontraron que interacciones laterales correspondientes a valores del parámetro  $g < -4$  conducían a una transición de segunda fase con nucleación. En este caso, la especie B se deposita sobre la superficie del electrodo, pero no en forma de monocapa con una energía libre configuracional dependiente de  $\theta$ , sino en forma de núcleos cristalinos. El comienzo de la formación de un núcleo requiere un pequeño sobrevoltaje, pero el crecimiento continuado ocurre de una forma normal controlada por la activación.

#### B) TRATAMIENTOS DE E. LAVIRON (1974a)

Laviron considera el proceso general  $O + ne \rightleftharpoons R$  y suponen que los procesos de adsorción son tan rápidos que no existe un control por parte de la cinética del propio proceso de adsorción; en otras palabras, el proceso de adsorción es el más rápido de todos los factores que limitan la velocidad de adsorción. Esta suposición se justifica, en general, teniendo en cuenta que la velocidad de adsorción sobre mercurio es grande tal y como han demostrado distintos estudios, Damaskin, B.B., O. A. Petrii, V.V. Batrakov, (1971). Otra suposición asume que las concentraciones superficiales máximas ( $\Gamma_m$ ) se suponen constantes en el intervalo de potencial considerado, lo que se justifica cuando se trabaja en intervalos de potencial de decenas de voltios. Además supone que los coeficientes de adsorción tampoco varían con el potencial.

El tratamiento matemático llevado a cabo contempla situaciones de adsorción intensa, lo que supone que por debajo de la saturación de la gota, prácticamente todas las moléculas se adsorben al alcanzar la superficie electródica, lo que presupone que la concentración en las proximidades del electrodo es muy baja; además, Laviron plantea inicialmente procesos de reducción, ec. (A.29), e indica las modificaciones necesarias para obtener las expresiones utilizables en un proceso de oxidación.



Los resultados obtenidos, y que se refieren al comportamiento reversible e irreversible, se describen a continuación:

##### B.1 Comportamiento reversible.

Desde el comienzo de la vida de la gota hasta un tiempo  $t_1$  correspondiente al inicio del barrido de potencial, el potencial del electrodo se mantiene en un valor inicial del potencial  $E_i$ . Si  $E_i$  se ajusta a un valor tal que O se adsorbe, entonces se producirá una difusión de cierta cantidad de O que se habrá adsorbido en el instante  $t=t_1$ . Si se toma  $t_1$

Apéndice

como origen de tiempos para la electrolisis ( $t=0$ ), entonces  $\Gamma(t=0) = \Gamma_0 = \Gamma_0(t_1)$  viene dado por la ecuación de Koryta.

$$\Gamma_0(t_1) = 0.74 D_0^{1/2} c t_1^{1/2} \quad (\text{A.30})$$

y además se cumple que  $\Gamma_R=0$  a  $t=t_1$ .

La película de O alcanza el valor de saturación en  $t=t_1$  para una concentración  $c_m$  definida por:

$$\Gamma_{0,m} = 0.74 D_0^{1/2} c_m t_1^{1/2} \quad (\text{A.31})$$

Si  $c < c_m$  la película no es compacta  $\Gamma_0(t_1) < \Gamma_{0,m}$ .

$c_0(o,t)$  y consecuentemente  $c_R(o,t)$  permanecen prácticamente en un valor cero hasta el tiempo  $t = t_1$ . Si la velocidad de barrido de potencial es alta, es posible diferenciar la cantidad de sustancia que ha llegado o salido de la superficie electródica durante el tiempo de duración del barrido en relación a la cantidad de sustancia adsorbida y, en consecuencia:

$$\Gamma_0 + \Gamma_R = \Gamma_0(t_1) \quad (\text{A.32})$$

En estas circunstancias se observará únicamente un pico, "pico de adsorción", correspondiente a la reducción de moléculas adsorbidas.

Si  $c > c_m$ ,  $\Gamma_0$  alcanza su valor máximo,  $\Gamma_{0,m}$ , en un tiempo  $t_m < t_1$ ,

$$t_m = 1.82 \frac{\Gamma_{0,m}^2}{c^2 D_0} \quad (\text{A.33})$$

Entre los tiempos  $t_m$  y  $t_1$  se produce una homogeneización de la disolución  $c(0,t)$  aumenta y aparece un nuevo pico debido a la reducción de las moléculas no adsorbidas en el instante  $t_1$ , los cuales alcanzan la superficie electródica por difusión durante el barrido de potencial, dicho pico constituye el "pico de difusión". Teóricamente este pico no debería ser igual a un pico de difusión "normal", debido a que la distribución de concentraciones en la disolución a  $t=0$  es distinta, sin embargo, cuando la concentración es suficientemente alta  $t_m$  se hace muy pequeño, la disolución se rehomoceiniza rápidamente y, en consecuencia, para  $t_0$  las condiciones son esencialmente las correspondientes a un pico de difusión normal suponiendo isoterma de Langmuir.

El pico de difusión puede venir precedido ( $b_0 < b_R$ ) seguido ( $b_0 > b_R$ ) o aparecer al mismo potencial ( $b_0 \approx b_R$ ), que el pico de adsorción, tal y como mostraron Wopschal, R.H., I. Shain, (1967) y Hulbert, H.H., I. Shain, (1970).

Si consideramos, en primer lugar,  $c < c_m$ ,

$$i = nFA \frac{d\Gamma_R}{dt} = \left( \frac{nF}{RT} \right) A v \Gamma_0(t_1) \frac{\eta}{(1+\eta)^2} \quad (\text{A.34})$$

o a  $T = 25^\circ\text{C}$ , ec. A.35.

$$i = 3.76 \cdot 10^6 A n^2 v \Gamma_0(t_1) \frac{\eta}{(1+\eta)^2} \quad (\text{A.35})$$

La función  $G = \eta / (1 + \eta)^2$  presenta un máximo para  $\eta$  cuyo valor es 0.25.  
El potencial de pico es:

$$E_p = E^0 - \frac{2.3RT}{nF} \log \left( \frac{b_0 \Gamma_{0,m}}{b_R \Gamma_{R,m}} \right) \quad (\text{A.36})$$

La correspondiente corriente de pico es:

$$i_p = 9.40 \cdot 10^5 A n^2 v \Gamma_0(t_1) \quad (\text{A.37})$$

Si  $c < c_m$ ,  $\Gamma_0(t_1) < \Gamma_{0,m}$ , dado por la ecuación de Koryta, lo que conduce a:

$$i_p = 6.96 \cdot 10^5 A n^2 v c D_0^{1/2} t_1^{1/2} \quad (\text{A.38})$$

Cuando  $c > c_m$  (película compacta para  $t=0$ ), si  $\Gamma_{0,m} = \Gamma_{R,m}$ , se tiene:

$$i_p = 9.40 \cdot 10^5 A n^2 v \Gamma_m \quad (\text{A.39})$$

En caso de que  $\Gamma_{0,m}$  sea diferente de  $\Gamma_{R,m}$ , el problema es más complejo. Si, por ejemplo,  $\Gamma_{0,m} > \Gamma_{R,m}$  una cierta cantidad de moléculas de O pueden ser desorbidas por moléculas de R durante un barrido y originar una corriente menor de la esperada por la ecuación A.35. Además, el pico estaría deformado.

Por otra parte, si  $\Gamma_{0,m} < \Gamma_{R,m}$ , se podría producir una adsorción adicional de moléculas durante el barrido, lo que originaría una corriente mayor y también deformación del pico.

Si se produce una variación repentina de  $\Gamma_{0,m}$  o de  $\Gamma_{R,m}$  a un determinado valor de potencial, puede aparecer un nuevo pico.

Los resultados descritos previamente conducen a las siguientes conclusiones:

Para  $c < c_m$  un cambio en  $b_0$ ,  $b_R$ ,  $\Gamma_{0,m}$  o en  $\Gamma_{R,m}$  origina, solamente, un desplazamiento del pico a lo largo del eje de potenciales. El pico de adsorción posee siempre el mismo aspecto y, en particular, la amplitud de semipico vale 90,6 mV; el pico es simétrico respecto al eje de coordenadas.

Los resultados anteriores se mantienen para  $c > c_m$  si  $\Gamma_{0,m} = \Gamma_{R,m}$ .

En otros casos, la amplitud de semipico es distinta de 90.6 / n, lo que puede deberse

a que no se cumple la isoterma de Langmuir.

Fácilmente se deduce que para el caso de una oxidación basta sustituir en la ecuación A.35  $\Gamma_0(t_1)$  por  $\Gamma_R(t_1)$  y cambiarla de signo. El valor del potencial de pico debe ser el mismo para el pico de oxidación y el de reducción; en contraste con la diferencia 56 / n mV., que es la observada para el caso de picos de difusión.

Como se ha comentado previamente, los desarrollos anteriores suponen que O y R se adsorben intensamente; este hecho, sin embargo, se puede verificar experimentalmente: el valor de  $\Gamma_0(t_1)$  se puede determinar gráficamente mediante integración del área del pico de adsorción; el valor obtenido para distintos valores de  $t_1$  debe obedecer a la ecuación de Koryta, si no existen complicaciones cinéticas la integración del pico de oxidación ha de conducir al mismo resultado.

Si  $b_0 \approx b_R$ , los picos de adsorción se obtienen solamente cuando  $\Gamma_0(t_1) < \Gamma_{0,m}$ , ( $c < c_m$ ), incluso aunque en polarografía clásica no aparezca ni una preonda o postonda, lo que supone una clara ventaja para el estudio de la adsorción.

Cuando  $c > c_m$  la altura del pico de adsorción se hace independiente de  $c$  y el pico de difusión se solapa con el de adsorción y se produce un cambio en la pendiente  $i$  vs  $c$  cuando  $c = c_m$ .

Otra consecuencia de la teoría es que el aspecto del pico de oxidación es el mismo, independientemente del punto al que se produzca una inversión del potencial.

### B.2 Reacción totalmente irreversible

En este caso la adsorción del producto de la reacción electroquímica, si se excluye el fenómeno de la autoinhibición, no puede ejercer ninguna influencia sobre la reacción electroquímica. Solamente la adsorción del reactivo puede modificar la reacción.

Como en el caso reversible, el pico de adsorción aparece solamente si  $c < c_m$  ( $\Gamma_0(t_1) < \Gamma_{0,m}$ ); si  $c > c_m$  se vería también un pico difusivo.

Para obtener una expresión de la corriente se supondrá, nuevamente, que la velocidad de barrido de potencial es tan elevada que la cantidad de moléculas que alcanzan el electrodo por difusión durante el barrido de potencial es despreciable cuando se compara con la cantidad de sustancia adsorbida, y, además, se supone que el área del electrodo,  $A$ , es constante.

Si consideramos un proceso de reducción, la intensidad de corriente viene dada por la expresión:

$$i = nFA k_f \Gamma_0 = nFA \Gamma_0 k_f^0 \exp\left(\frac{-\alpha n_\alpha FE}{RT}\right) \quad (\text{A.40})$$

con  $E = E_i - v t$ .

Por otra parte, si O se adsorbe con intensidad, la cantidad de moléculas que han alcanzado el electrodo en un tiempo  $t$  viene dado por la ecuación de Koryta. La concentración superficial  $\Gamma_0$  a un tiempo  $t$  va a ser igual a dicha cantidad menos la cantidad que ha desaparecido en la reducción por unidad de superficie:

$$\Gamma_0 = 0.74 c D_0^{1/2} t^{1/2} - \frac{1}{nFA} \int_0^t i dt \quad (\text{A.41})$$

en general :

$$\Gamma_0 = \Gamma_0(t_1) - \frac{1}{nFA} \int_0^t i dt \quad (\text{A.42})$$

A partir de 40 y 42, suponiendo  $\Gamma_0 = \Gamma_0(t_1)$  a  $t = 0$ , se obtiene:

$$i = \left( \frac{F^2}{RT} \right) n \alpha n_a \nu \Gamma_0(t_1) \exp[\exp(-aE_i + g)] \exp[-aE + g] \exp[-\exp(-aE + g)] \quad (\text{A.43})$$

con  $a = (\alpha n_a F) / (RT)$  y  $g = \text{Ln} [(k_f^0) / (a \nu)]$ .

El valor del potencial de pico  $E_p$  se obtiene a partir de la derivada  $di / dE$ .

$$E_p = \frac{g}{a} = \left( \frac{2.3 RT}{\alpha n_a F} \right) \log_{10} \left( \frac{RT k_f^0}{\alpha n_a F \nu} \right) = \frac{2.3 RT}{\alpha n_a F} \left( \log \frac{RT k_f^0}{\alpha n_a F} \right) - \left( \frac{2.3 RT}{\alpha n_a F} \right) \log \nu \quad (\text{A.44})$$

La corriente de pico se obtiene sustituyendo  $E$  por  $E_p = g/a$  en la ecuación A.43. Si el potencial inicial es suficientemente positivo en relación al potencial de pico  $\exp[\exp(-aE_i + g)] = \exp[\exp -a(E_i - E_p)] \approx 1$  (1.02 por ejemplo para  $\alpha n_a = 0.5$  y  $E_i - E_p = 0.2$  V.); así, la ecuación A.43 se reduce a :

$$i = \left( \frac{F^2}{RT} \right) n \alpha n_a \nu \Gamma_0(t_1) \exp(-a(E - E_p)) \exp(-\exp[-a(E - E_p)]) \quad (\text{A.45})$$

y para la corriente de pico:

$$i_p = e^{-1} \left( \frac{F^2}{RT} \right) n (\alpha n_a) A \nu \Gamma_0(t_1) \quad (\text{A.46})$$

donde  $F^2 / (RT) = 3.76 \cdot 10^6$  a  $25^\circ$  C.

En el caso de una oxidación,  $\alpha$  se debe sustituir por  $1 - \alpha$ , y el signo menos que precede a la expresión  $\alpha n_a (E - E_p) / RT$  se debe cambiar por un signo +, e "i" es negativa.

La representación de la función  $G=i/(3.76 \cdot 10^6 n \alpha n_a A v \Gamma_0(t_1))$  se muestra en la fig.8. Puede observarse que el pico es asimétrico y posee siempre el mismo aspecto: no es afectado por un cambio en la velocidad de barrido  $v$  o en  $k_f^0$ . Un cambio en los valores de  $v$  o  $k_f^0$  produce sencillamente un desplazamiento del pico a lo largo del eje de potenciales. La amplitud de semipico  $\delta$  depende de  $\alpha n_a$ :  $62.5 \alpha n_a$  para una reducción y  $\delta = 62.5 (1 - \alpha) n_a$  para una oxidación. Como se ve en la ecuación (A.46),  $i_p$  varía linealmente con  $v$ , como en el caso de una reacción reversible.

Además, también como en el caso de una reacción reversible, los cálculos son válidos solamente si la adsorción de O es suficientemente intensa. Esta condición se verifica si los valores de  $\Gamma_0(t_1)$  obtenidos mediante integración gráfica del pico siguen la ecuación de Koryta para diferentes valores de  $t_1$ .

Siempre que la película de reactivos no sea compacta, las ecuaciones obtenidas concuerdan bien con los resultados experimentales.

Cuando la película es compacta antes de comenzar la electrolisis, entonces  $\Gamma_0(t_1) = \Gamma_m$ , el pico adquiere una apariencia anormal que no puede explicar el presente desarrollo: el pico se vuelve muy estrecho (muy pocos mV y muy agudo. Un buen ejemplo lo constituye el trans 4 - 4' - dipiridyl - 1.2 etileno. (Fig. A.10): el pico de adsorción C (reducción de la película) está siempre bien definido, separado del pico de difusión B el cual corresponde a la reducción a través de la película de reactivo. El pico A corresponde una modificación de la estructura de la película.

Mediante integración gráfica del área del pico C se puede calcular el valor  $\Gamma_{0,r}$  de  $\Gamma_0$  al potencial de reducción. Los valores obtenidos de esta manera se representan en la Fig. A.11.

En las condiciones experimentales empleadas,  $t_1 = 10.5s$  y  $D = 8.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , se pueden distinguir tres zonas de concentración:

**ZONA III** ( $c > 10^{-4} \text{ M}$ ). En esta zona,  $\Gamma_{0,r}$  alcanza un valor máximo  $\Gamma_m = 3.16 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  que corresponde a  $52 \text{ \AA}^2$  para el área ocupada por una molécula y que resulta ser el doble del correspondiente a la piridina y a sus metil-derivados que se encuentran adsorbidos perpendicularmente sobre el electrodo. Dado que la molécula puede encontrarse plana sobre el electrodo, este resultado muestra que la orientación también es perpendicular sobre el electrodo para el dipiridiletileno en posición transversal y no "de pie" (vertical); para una posición vertical (de pie) el área sería la misma que para la piridina en lugar del doble; además, uno de los nitrógenos tendría que estar en contacto con el mercurio, lo que es imposible; asimismo, se muestra que la película es compacta como para el caso de la piridina.

**ZONA I** ( $c < 2.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ). En esta zona, el valor de  $\Gamma_{0,r}$  es igual al calculado a partir de la ecuación de Koryta,  $\Gamma_{0,r} = 0.74 D_0^{1/2} c t_1^{1/2}$ , lo que demuestra que todas las moléculas se adsorben tan pronto como alcanzan el electrodo, siendo la difusión el único factor limitante. Tal y como se muestra en el siguiente párrafo, la molécula se encuentra plana sobre el electrodo. La máxima concentración superficial calculada para un área de  $90 \text{ \AA}^2$  correspondiente a una orientación plana es  $\Gamma_{m,f} = 1.8 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . Según la ecuación de Koryta (con  $D_0 = 8.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) este valor se alcanza cuando  $c = 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . En consecuencia, en la Zona I,  $\Gamma_{0,r}$  es siempre más pequeña que  $\Gamma_{m,f}$ ; la película no es compacta.

**ZONA II** ( $2.5 \cdot 10^{-5} < c < 10^{-4} \text{ M}$ ). En esa zona, si la orientación fuese perpendicular, la concentración superficial sería más pequeña que  $\Gamma_m$ . Todas las moléculas que alcanzan la superficie se adsorberían, es decir, el valor  $\Gamma_{0,r}$  vendría, aún, dado por la ecuación de Koryta hasta una concentración  $c_m$ . Fig. A.11

Si el valor  $\Gamma_{0,r}$  es más pequeño que el predicho por la ecuación de Koryta, entonces las moléculas poseen necesariamente una orientación oblicua; así pues, existe una cierta resistencia a la colocación de las moléculas en posición vertical solamente compensado por el aumento de concentración, lo que conduce a la conclusión de que para  $c < 10^{-5} \text{ M}$ , las moléculas se encuentran planas sobre el electrodo, lo que ha sido explicado por distintos autores como consecuencia de la interacción de los electrones  $\pi$  y la superficie de mercurio.

También, en la Zona I, el pico C posee el aspecto normal predicho por la teoría.

En la Zona II, el potencial de pico no cambia pero el pico está deformado, lo que puede deberse bien a una mera orientación de las moléculas o por agrupamiento de la superficie, o por la existencia de interacciones entre las moléculas.

En la Zona III, el pico posee un aspecto muy particular: se transforma en muy agudo y estrecho, y el potencial se vuelve repentinamente 130 mV más negativo cuando  $c > 10^{-4} \text{ M}$ . Este desplazamiento pone de manifiesto que la reducción es más difícil cuando la película es compacta. Dicho resultado no se puede explicar mediante un efecto de orientación: para  $c = 8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  se aproximan, ya, a la orientación vertical, pero el valor de  $E_p$  aún es normal. El fenómeno se debe a la compacidad de la película y puede explicarse de la siguiente manera: como consecuencia de las fuerzas de atracción existentes entre las moléculas, la barrera energética que ha de vencerse en la reducción es superior; el hecho de que  $E_p$  se haga, de repente, más negativo solamente cuando las moléculas se aproximan a la posición vertical confirma la existencia de fuerzas de atracción en esta posición y no en las posiciones plana y transversal. El peculiar aspecto de los picos se debe a un efecto de desbloqueo: tan pronto como una fracción de moléculas del film compacto son reducidas, el film deja de serlo y el resto de las moléculas se reducen en condiciones análogas a la situación existente cuando  $\Gamma_{0,r} < \Gamma_m$ . Al potencial del pico, la velocidad de reacción es muy grande y prácticamente todas las moléculas se reducen juntas y forman una película mezclada con la película del reactivo pero en el que no existe fuerza de atracción.

Posteriormente E. Laviron (1979b) deduce la ecuación correspondiente al voltamograma con barrido lineal para una reacción electroquímica con cualquier grado de irreversibilidad tanto cuando la sustancia oxidada como reducida se encuentran fuertemente adsorbidas sobre el electrodo y siguen la isoterma de Langmuir. La constante de velocidad de la reacción electroquímica, así como el coeficiente de transferencia, se pueden deducir a partir de las variaciones del potencial de pico con la velocidad de barrido. Aunque las condiciones físicas del modelo son ligeramente distintas a las consideradas por Srinivasan y Gileadi (1966), la formulación matemática es, sin embargo, la misma y dichos autores deducen, como ya se ha dicho en otra parte, una expresión del voltagrama para las situaciones reversibles y totalmente irreversible y obtienen una ecuación diferencial para la corriente que resuelven en algunos casos con el fin de obtener curvas de intensidad - potencial.

Para el caso de una reacción totalmente irreversible ( $m \rightarrow 0$ ), el potencial de pico viene dado por la expresión (fig. A.12, 13):  
siendo  $m = (RT/F)(k_s/nv)$ , y  $E^j = E^0$ . Para la curva catódica y

$$E_p = E^j - \left( \frac{RT}{\alpha nF} \right) \ln \left( \frac{\alpha}{|m|} \right) \quad (\text{A.47})$$

$$E_p = E^j + \left( \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \right) \ln \left( \frac{1-\alpha}{|m|} \right) \quad (\text{A.48})$$

para la anódica.

En relación con el aspecto externo de los picos se constata que cuando  $m \rightarrow \infty$  ( $v \rightarrow 0$ ) tanto el pico anódico como el catódico tienden hacia la forma de pico reversible, que son simétricos con respecto al eje de potenciales y poseen una forma simétrica. La amplitud de semipico tiende al valor  $90.6/n$  mV. Por el contrario, cuando  $m \rightarrow 0$  ( $v \rightarrow \infty$ ) los picos tienden hacia las formas del pico irreversible, en este caso la amplitud de semipico es  $62.5/\alpha n$  mV para el pico catódico, y  $62.5/(1-\alpha)n$  mV para el anódico.

La aplicación de las ecuaciones anteriores al análisis del comportamiento de una serie de moléculas conteniendo el grupo  $N=N$ : benzo (c) cinnolina, fenazina, azobenceno, para las que la forma oxidada y reducida se encuentran fuertemente adsorbidas, y siguen una isoterma de Langmuir a concentraciones relativamente bajas, conducen por ejemplo para el caso de la benzo (c) cinnolina a pH 8.70 a un valor de  $\alpha=0.53$  obtenido a partir de la amplitud de semipico y a un valor de  $k_s = 38.95$  s<sup>-1</sup>.

En la formulación matemática del problema de la no idealidad causada por las interacciones entre moléculas adsorbidas, Laviron (1974b, 1975, 1979c y Laviron, E. y L. Roullier, 1980) supone, como en otros trabajos, que la adsorción o desorción es tan rápida que el equilibrio de adsorción se establece casi instantáneamente y plantea las siguientes ecuaciones: en primer lugar,

$$\theta_0 + \theta_R = \theta_T \quad (\text{A.49})$$

donde supone que la suma de las concentraciones superficiales de O y R,  $\Gamma_0$  y  $\Gamma_R$  es constante e igual a  $\Gamma_T$ . Además supone, también, que el área ocupada por una molécula de O y por una de R es la misma y se designa por  $\Gamma_m$  el máximo valor común de la concentración superficial de O y R.

La segunda ecuación se obtiene escribiendo que la corriente  $i$  es proporcional a las variaciones de  $\Gamma_0$  y  $\Gamma_R$ :

$$i = nFA\Gamma_m \left( \frac{d\theta_R}{dt} \right) = -nFA\Gamma_m \left( \frac{d\theta_O}{dt} \right) \quad (\text{A.50})$$

Si consideramos la reacción:

$$O \rightarrow \text{complejo activado} \rightarrow R \quad (\text{A.51})$$

y se supone, además, que:

- La energía de las moléculas O varía linealmente con el recubrimiento  $\theta_O$  debido a las interacciones entre moléculas de O.
- La energía de las moléculas de O varía, también, linealmente con el recubrimiento  $\theta_O$  debido a interacciones entre las moléculas de O y R. Si  $\Delta G_O$  representa la energía de las moléculas de O, podemos escribir (el factor 2 ha sido introducido para facilitar una comparación con los coeficientes de la isoterma de Frumkin):

$$\frac{\Delta G_O}{RT} = -2p\theta_O - 2r\theta_R \quad (\text{A.52})$$

- Además, podemos escribir que la energía de las moléculas R varía linealmente con  $\theta_R$  y con  $\theta_O$ :

$$\frac{\Delta G_R}{RT} = -2q\theta_R - 2r\theta_O \quad (\text{A.53})$$

- La energía  $\Delta G_{act}$  del complejo activado varía, también, linealmente con  $\theta_O$  y  $\theta_R$  debido a las interacciones de O con R:

$$\frac{\Delta G_{act}}{RT} = -2v\theta_O - 2w\theta_R \quad (\text{A.54})$$

Suponemos, además, que p, q, r, v y w son independientes del potencial, lo que viene justificado por el hecho de que el intervalo de potencial estudiado es estrecho ( $=0,1V$ ); en consecuencia podemos escribir para la energía de activación catódica  $\Delta G_C$ :

$$\frac{\Delta G_C}{RT} = \frac{\Delta G_O + \Delta G_{act}}{RT} = -2(p+v)\theta_O - 2(r+w)\theta_R \quad (\text{A.55})$$

y para la anódica:

$$\frac{\Delta G_a}{RT} = \frac{\Delta G_R + \Delta G_{act}}{RT} = -2(q+w)\theta_R - 2(r+v)\theta_O \quad (\text{A.56})$$

Si llamamos  $\beta = p+v$ ,  $\gamma = r+w$ ,  $\lambda = q+w$  y  $\mu = r+v$  y suponemos, además, que la constante de velocidad  $k_s$  de la reacción electroquímica es independiente del recubrimiento, se obtiene la ecuación:

$$i = nFAk_s \Gamma_m \left[ \theta_R \eta^{1-\alpha} \exp(-2\lambda\theta_R - 2\mu\theta_O) - \theta_O \eta^{-\alpha} \exp(-2\beta\theta_O - 2\gamma\theta_R) \right] \quad (\text{A.57})$$

siendo  $\eta = \exp \left[ (nF / RT) (E - E^0) \right]$ , en donde el potencial estándar en superficie  $E^0$  es:

$$E^{\circ} = E^0 - \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln\left(\frac{b_O}{b_R}\right) \quad (\text{A.58})$$

con  $E^{\circ}$  = potencial estándar en volumen y  $b_O$  y  $b_R$  los coeficientes de adsorción.  
Combinando las ecuaciones anteriores se deduce que:

$$\left(\frac{d \psi_R}{d \eta}\right) = m[(1-\psi_R)\eta^{-(1+\alpha)} \exp(-2\beta\theta_T + 2\psi_R(\beta-\gamma)\theta_T) - \psi_R\eta^{-\alpha} \exp(-2\mu\theta_T + 2\psi_R(\mu-\lambda)\theta_T)] \quad (\text{A.59})$$

siendo:

$$m = \frac{RTk_S}{nFv} \quad \text{y} \quad \psi_R = \frac{\theta_R}{\theta_T} = \frac{\Gamma_R}{\Gamma_T} \quad (\text{A.60})$$

La función adimensional de corriente que se obtiene es:

$$\psi = \frac{i}{\frac{n^2 F^2 v A \Gamma_T}{RT}} = \eta \frac{d\chi_R}{d\eta} \quad (\text{A.61})$$

Con la convención de signo adoptada (corrientes catódicas positivas)  $i$  es  $\infty$ ,  $\psi$  ( $v / |v|$ ).

No es posible obtener, analíticamente, curvas  $i$ - $E$  y el problema ha de resolverse numéricamente. La manera en que repercute la modificación de algunos factores se describe a continuación:

**- Influencia de  $\theta_T$  y de los coeficientes de interacción.**

La influencia de  $\theta_T$  y de los coeficientes de interacción no se puede separar dado que solamente aparecen los productos de  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$  y  $\mu$  por  $\theta_T$ . No se puede establecer un límite para  $\theta_T$ , y la teoría se podrá aplicar en principio por  $\theta_T \gg 1$  (por ejemplo, electrodos poliméricos redox).

**- Influencia de la reversibilidad.**

Cuando  $|m| \rightarrow \infty$  (reacción reversible) los picos anódicos y catódicos son simétricos, independientemente de los valores  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$  y  $\mu$  debido a que en la ecuación del pico sólo aparece el valor  $v G \theta_T$  ( $G = \lambda - \gamma - \mu - \beta$ ); por el contrario, cuando  $|m|$  disminuye (reacción menos reversible),  $\beta$  y  $\gamma$  por una parte, y  $\lambda$  y  $\mu$  por otra, ejercerán su influencia por separado sobre los procesos catódicos y anódicos. Si  $\beta \neq \mu$ , y/o  $\beta - \gamma \neq \mu - \lambda$ , los picos anódico y catódico van a poseer diferente aspecto (figs. 14 y 15).

Así, por ejemplo, uno de ellos puede llegar a ser más agudo y el otro más ancho que los picos tipo Langmuir correspondientes al mismo valor de  $m$  (Fig. A.14).

Para valores de  $|m|$  suficientemente pequeños, el aspecto y altura de los picos no cambia (reacción totalmente irreversible). Un posterior descenso en  $|m|$  causa, únicamente, un desplazamiento del pico a lo largo del eje de potenciales. Figs. 14 y 15.

**- Variaciones de la corriente de pico  $i_p$  y de la amplitud de semipico  $\delta$  ( $\Delta E_{1/2}$ ) con  $v$ .**

Las variaciones de  $i_p$  son proporcionales a la función  $\psi_p/|m|$ , siendo  $\psi_p$  el máximo valor de  $\psi$ .

Ejemplos de variaciones de esta función con  $\log |m|^{-1}$ , es decir, de  $i_p$  con  $\log v$ , vienen dadas en la Fig. A.16. Cuando  $|m| \rightarrow \infty$  (totalmente irreversible)  $\psi_p$  es constante, es decir,  $i_p$  varía con  $v$  linealmente; en el intervalo intermedio la pendiente del gráfico es prácticamente constante, es decir,  $i_p \propto v^x$ , siendo  $x$  cte  $< 1$ . Algunos ejemplos se observan en la Fig. A.17.

**- Variación del potencial del pico con  $v$ .**

Ejemplos de variación de los potenciales de pico anódico y catódico  $E_{pc}$  y  $E_{pa}$  se dan en la Fig. A.18, donde puede observarse que incluso para  $\alpha = 0.5$  las curvas no son simétricas, como en el caso de la isoterma de Langmuir.

Conviene indicar que, contrariamente al caso de no existencia de interacciones, no es posible calcular el valor de  $k_s$  debido a que no se pueden determinar los coeficientes  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$  y  $\mu$ , y, en consecuencia, solamente se puede deducir de los resultados una constante aparente  $k_s$ , que puede ser muy distinta de la real.

**- Aplicación a electrodos modificados.**

Cuando el sistema redox está unido al electrodo por adsorción irreversible, la aplicación de los resultados anteriores es inmediata y, en consecuencia, pueden calcularse valores de  $k_s$  a distintos recubrimientos y, a continuación, extrapolar a recubrimiento cero, donde se asegura la no influencia de interacciones y heterogeneidades.

**C) TRATAMIENTO DE MATSUDA, H., K.AOKI, K.TOKUDA (1987a y b)**

H. Matsuda, K. Aoki y K. Tokuda desarrollan un tratamiento mecanoestadístico de pares redox y un complejo activado confinado en la superficie de una monocapa. Dicha formulación tiene en cuenta no solamente las energías de interacción, sino también reorganizaciones moleculares en la superficie electródica.

Los coeficientes de actividad de las especies involucradas en el proceso redox se expresan a partir de un modelo de red cuasi-cristalino bidimensional, y la aproximación cuasi-química introducida por Guggenheim y obtienen una expresión corriente-potencial para

una reacción monoeléctrica superficial; dicha relación incluye, como caso límite, la obtenida suponiendo una distribución de especies adsorbidas, la cual corresponde a los desarrollos de Laviron, previamente discutidos. Tanto dichos desarrollos como los debidos a Shain, Conway y Gileadi..., tratan de explicar las distintas discrepancias observadas generalmente referentes a la forma, amplitudes de semipico, etc., en relación a las situaciones más simples (no interacciones) modificando la ecuación de Nernst o la de Butler-Volmer, incluyendo las interacciones entre las moléculas, utilizando para ello una formulación basada en la isoterma de Frumkin; dicha aproximación es análoga a la aproximación de orden cero en el tratamiento de las disoluciones regulares o aproximación de Bragg-Williams, en donde se supone una distribución totalmente aleatoria de las especies interaccionantes; dicha suposición no parece muy lógica dado que las interacciones intermoleculares deben de originar un cierto orden a nivel molecular.

La aproximación cuasi-química o la aproximación de orden uno introducida por Guggenheim, constituye una mejora de la aproximación cero. La aproximación cuasi-química ha sido empleada por Guidelli (1981, 1986a, 1986b, 1992) y R. Guidelli y M.L. Foresti (1986c). Con el tratamiento de una monocapa adsorbida consistente de monómeros de disolvente y solutos poliméricos neutros. Matsuda y col. emplean un modelo de red cuasi-cristalina bidimensional que tiene en cuenta el orden a nivel molecular considerando el número de vecinos más próximos (o número de coordinación). Supone que no existe desorción.

Para una reacción:



asume que las especies reducida, oxidada y el complejo activado son muy similares en tamaño y aspecto, de modo que puede existir intercambio de lugares en la red.

Si consideramos una mezcla ternaria constituida por  $N_R$  especies de R,  $N_O$  especies de O y  $N_*$  especies de complejo activado sobre una red bidimensional que contiene N lugares con número de coordinación Z, donde  $N_* / N$  se supone que es una cantidad infinitesimal de primer orden, entonces (véase la Fig. A.19)  $N_R + N_O + N_* = N$ .

Puesto que cada especie posee Z vecinos más próximos, existen  $Z.N/2$  pares de vecinos. Dichos pares son de cinco tipos RR, OO, RO,  $R \neq$  y  $O \neq$ , donde el par  $\neq$  se ignora por ser un infinitesimal de segundo orden, y se verificará:

$$\begin{aligned} 2N_{RR} + N_{RO} + N_{R*} &= ZN_R \\ N_{RO} + 2N_{OO} + N_{O*} &= 2N_O \\ N_{R*} + N_{O*} &= 2N_* \end{aligned} \tag{A.63}$$

donde el factor 2 en el miembro izquierdo de la ecuación denota el factor de simetría y  $N_{ij}$  es el número de pares de cada especie.

Debido a las ecuaciones dadas más arriba, solamente los números de pares de dos especies son independientes. Llamamos X e Y a dichas variables y las definimos a partir de:

$$N_{RO} = ZX \quad \text{y} \quad N_{O\bullet} = Z \left( \frac{1}{2} N_{\bullet} - Y \right) \quad (\text{A.64})$$

Además, suponemos que cada par  $ij$  de vecinos próximos contribuye a la energía configuracional con el término  $-\sigma_{ij} \omega_{ij} / Lz$ , donde  $\sigma_{ij}$  es el factor de simetría ( $\sigma_{ij} = 2$  para  $i=j$ , y 1 para  $i \neq j$ ),  $\omega_{ij}$  es la energía de interacción de 1 mol de pares  $ij$  de vecinos próximos, y  $L$  es el número de Avogadro; además se desprecian todas las anteriores interacciones de vecinos no próximos.

La expresión para la densidad de corriente a la que se llega es:

$$j = nF\Gamma_T k^0 \phi \left[ (2\chi_R) \left( \frac{\beta - \chi_O + \chi_R}{\chi_R(\beta + 1)} \right)^{1/2} \exp(\alpha_a \xi) - (2\chi_O) \left( \frac{\beta + \chi_O - \chi_R}{\chi_O(\beta + 1)} \right)^{1/2} \exp(-\alpha_c \xi) \right] \quad (\text{A.65})$$

donde:

$$\phi = \left( \frac{\text{Cosh} \frac{W}{2zRT}}{\text{Cosh} \frac{\Delta W^*}{2zRT}} \right)^2 \left[ (\epsilon_* \epsilon)^{-1/2} \chi_R \left( \frac{\beta - \chi_O + \chi_R}{\chi_R(\beta + 1)} \right)^{1/2} + (\epsilon_* \epsilon)^{1/2} \chi_O \left( \frac{\beta + \chi_O - \chi_R}{\chi_O(\beta + 1)} \right)^{1/2} \right]^2 \quad (\text{A.66})$$

y

$$\xi = \left( \frac{nF}{RT} \right) (E - E^0)$$

$$\chi_i = \frac{\Gamma_i}{\Gamma_T} \quad (\text{A.68})$$

$$\epsilon = \exp \frac{W}{zRT} \quad ; \quad \epsilon_* = \exp \frac{\Delta W^*}{zRT} \quad (\text{A.69})$$

$$W = (W_{RR} + W_{OO}) - W_{RO} \quad (\text{A.70})$$

$$W^* = \frac{1}{2} [(W_{R^{\neq}} - W_{RR}) + (W_{O^{\neq}} - W_{OO})] \quad (\text{A.71})$$

$$\Delta W^* = (W_{O^{\neq}} - W_{OO}) - (W_{R^{\neq}} - W_{RR}) \quad (\text{A.72})$$

$$\beta = [1 + 4 \chi_R \chi_O (\epsilon^2 - 1)]^{1/2} \quad (\text{A.73})$$

Conviene indicar que valores negativos de  $W$  significan que los pares  $OR$  son más estables que los  $RR$  y  $OO$ , en tanto, que los valores positivos son indicativos de una menor estabilidad de los pares  $OR$ .

Por otra parte se puede demostrar que cuando el número de coordinación  $z$  se hace infinito, se llega a la aproximación de orden cero, lo que, en esencia, supone admitir una distribución aleatoria de las especies  $R$ ,  $O$  y  $\neq$ , a pesar de la existencia de energías de interacción distinta de cero. En esas circunstancias se obtiene:

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \frac{\left[ \text{Cosh} \left( \frac{\Delta W^*}{2zRT} \right) \right]^z}{\left[ \text{Cosh} \left( \frac{W^*}{2zRT} \right) \right]^z} = 1 \quad (\text{A.74})$$

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \phi = \exp \left[ (2 \chi_R \chi_O - 1) \left( \frac{W}{2RT} \right) - (\chi_R \chi_O) \left( \frac{\Delta W^*}{2RT} \right) \right] \quad (\text{A.75})$$

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \left( \frac{\beta - \chi_O + \chi_R}{\chi_R (\beta + 1)} \right)^{\frac{z}{2}} = \exp \left( \frac{\chi_O^2 W}{RT} \right) \quad (\text{A.76})$$

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \left( \frac{\beta + \chi_O - \chi_R}{\chi_O (\beta + 1)} \right)^{\frac{z}{2}} = \exp \left( \frac{\chi_R^2 W}{RT} \right) \quad (\text{A.77})$$

cuya introducción en los desarrollos anteriores conduce a las ecuaciones deducidas por Laviron bajo la suposición de isoterma de Frunkim:

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \left[ \frac{\text{Cosh}\left(\frac{\Delta W^*}{2zRT}\right)}{\text{Cosh}\left(\frac{W}{2zRT}\right)} \right]^z = 1 \quad (\text{A.78})$$

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \phi = \exp \left[ (2 \chi_R \chi_O - 1) \left( \frac{W}{2RT} \right) - (\chi_R \chi_O) \left( \frac{\Delta W^*}{2RT} \right) \right] \quad (\text{A.79})$$

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \left( \frac{\beta - \chi_O + \chi_R}{\chi_R (\beta + 1)} \right)^{\frac{z}{2}} = \exp \left( \frac{\chi_O^2 W}{RT} \right) \quad (\text{A.80})$$

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \left( \frac{\beta + \chi_O - \chi_R}{\chi_O (\beta + 1)} \right)^{\frac{z}{2}} = \exp \left( \frac{\chi_R^2 W}{RT} \right) \quad (\text{A.81})$$

Usando las ecs. A.74, A.77, se obtienen las expresiones:

$$E_{eq} = E^{o'} + \left( \frac{RT}{nF} \right) \text{Ln} \left( \frac{\chi_O}{\chi_R} \right) - \left( \frac{RT}{nF} \right) (\chi_O - \chi_R) \left( \frac{W}{RT} \right) \quad (\text{A.82})$$

$$j = n F \Gamma_T k^{o'} \exp \left[ \frac{1}{2} (\chi_O - \chi_R) \left( \frac{\Delta W^*}{kT} \right) \right] \quad (\text{A.83})$$

$$* \left[ (2 \chi_R) \exp \left( \frac{1}{2} (\chi_O - \chi_R) \frac{W}{RT} \right) \exp(\alpha_a \xi) - (2 \chi_O) \exp \left( -\frac{1}{2} (\chi_O - \chi_R) \frac{W}{RT} \right) \exp(-\alpha_c \xi) \right]$$

$$j = j_0 \frac{\exp\left[(\chi_O - \chi_R) \left(\frac{\Delta W^*}{2RT}\right)\right]}{\exp\left[(\chi_{O_{eq}} - \chi_{R_{eq}}) \left(\frac{\Delta W^*}{2RT}\right)\right]} * \left( \frac{(2\chi_R) \exp\left[(\chi_O - \chi_R) \left(\frac{W}{2RT}\right)\right] \exp\left[\frac{\alpha_a n F \eta}{RT}\right]}{2(\chi_{R_{eq}}) \exp\left[(\chi_{O_{eq}} - \chi_{R_{eq}}) \left(\frac{W}{2RT}\right)\right]} - \frac{(2\chi_O) \exp\left[-(\chi_O - \chi_R) \left(\frac{W}{2RT}\right)\right] \exp\left[\frac{\alpha_c n F \eta}{RT}\right]}{2(\chi_{O_{eq}}) \exp\left[-(\chi_{O_{eq}} - \chi_{R_{eq}}) \left(\frac{W}{2RT}\right)\right]} \right) \quad (\text{A.84})$$

$$k^{o'} = \frac{j_0^o}{n F \Gamma_T} = \frac{1}{2} \left[ k_a^0 \exp\left(\frac{-W_{RR}}{RT}\right) \right]^{\alpha_a} * \exp\left(\frac{W_{R^*} + W_{O^*} - W_{RO}}{RT}\right) \quad (\text{A.85})$$

$$j_0 = j_0^o \left[ (\chi_{R_{eq}})^{\alpha_c} (\chi_{O_{eq}})^{\alpha_a} \exp\left[-(\chi_{R_{eq}})^{\alpha_c} (\chi_{O_{eq}})^{\alpha_a} \left(\frac{\Delta W^*}{2RT}\right)\right] * \exp\left[(\alpha_a - \alpha_c) (\chi_{R_{eq}} - \chi_{O_{eq}}) \frac{W}{2RT}\right] \right] \quad (\text{A.86})$$

Al aplicar las ecuaciones anteriores a la voltametría cíclica se definen los parámetros adimensionales:

$$\zeta = \left(\frac{nF}{RT}\right) (E_i - E^{o'}) \pm \left(\frac{nFv}{RT}\right) t \quad (\text{A.87})$$

La corriente adimensional:

$$\psi = \frac{j}{n F \Gamma_T} \left(\frac{nFv}{RT}\right) \quad (\text{A.88})$$

El parámetro cinético adimensional:

$$\Lambda = \frac{k^{o'}}{\left(\frac{nFv}{RT}\right)} \quad (\text{A.89})$$

y se obtienen las ecuaciones para la corriente:

$$\begin{aligned} \psi_a &= -\left(\frac{d\chi_R}{d\zeta}\right) \\ &= \Lambda \phi_R(2\chi_R) \exp(\alpha_a \zeta) \left[ 1 - \frac{1 - \chi_R}{\chi_R} \left( \frac{\chi_R(\beta + 1 + 2\chi_R)}{(1\chi_R)(\beta - 1 + 2\chi_R)} \right)^{z/2} e^{-\zeta} \right] \end{aligned} \quad (\text{A.90})$$

con:

$$\begin{aligned} \phi_R &= \left( \frac{\text{Cosh}(W/2zRT)}{\text{Cosh}(\Delta W^*/2zRT)} \right)^z \\ &* \left( \frac{4(1 - \chi_R)}{\beta + 1} \sinh\left(\frac{W + \Delta W^*}{2zRT}\right) + \exp\left(\frac{W + \Delta W^*}{2zRT}\right) \right)^z \end{aligned} \quad (\text{A.91})$$

para el barrido de potencial en la dirección positiva (onda anódica) y:

$$\psi_c = -\left(\frac{d\chi_O}{d\zeta}\right) = \Lambda \phi_O(2\chi_O) \exp(\alpha_c \zeta) \left[ 1 - \frac{1 - \chi_O}{\chi_O} \left( \frac{\chi_O(\beta + 1 + 2\chi_O)}{(1\chi_O)(\beta - 1 + 2\chi_O)} \right)^{z/2} e^{-\zeta} \right] \quad (\text{A.92})$$

con:

$$\phi_O = \left( \frac{\text{Cosh}(W/2zRT)}{\text{Cosh}(\Delta W^*/2zRT)} \right)^z * \left( \frac{4(1 - \chi_O)}{\beta + 1} \sinh\left(\frac{W - \Delta W^*}{2zRT}\right) + \exp\left(\frac{W - \Delta W^*}{2zRT}\right) \right)^z \quad (\text{A.93})$$

para el barrido de potencial en dirección negativa (onda catódica).

Si se sustituye  $\psi_a$ ,  $\zeta$ ,  $\alpha_a$ ,  $(\Delta W^*/RT)$  y  $\chi_R$  en las ecs. A.90, A.91 con  $-\psi_c$ ,  $-\zeta$ ,  $\alpha_c$ ,  $-(\Delta W^*/RT)$  y  $\chi_O$  se obtienen las ecs. A.92, A.93, lo que permite apreciar que los resultados obtenidos para las ondas anódicas se aplican a las catódicas con la adecuada sustitución de símbolos.

A continuación se discutirán las características de los voltamogramas cíclicos en tres casos distintos, en función de la reversibilidad de la reacción:

### C.1) ONDAS REVERSIBLES

Cuando el parámetro  $\Lambda$  es suficientemente grande, se obtiene a partir de las ecs. A.90 o A.92:

$$\zeta = \ln\left(\frac{\chi_O}{\chi_R}\right) + \left(\frac{z}{2}\right) \ln\left(\frac{\chi_R(\beta + \chi_O - \chi_R)}{\chi_O(\beta - \chi_O + \chi_R)}\right) \quad (\text{A.94})$$

diferenciando la ec. A.94 con respecto a  $\zeta$  se llega a:

$$\frac{d\chi_R}{d\zeta} = -\frac{d\chi_O}{d\zeta} = -\frac{\chi_R\chi_O}{1 - \left(\frac{z}{2}\right)\left(1 - \frac{1}{\beta}\right)} \quad (\text{A.95})$$

$$\psi_a = -\psi_c = \frac{\chi_R\chi_O}{1 - \left(\frac{z}{2}\right)\left(1 - \frac{1}{\beta}\right)} \quad (\text{A.96})$$

La deducción de una ecuación explícita de la curva  $i - E$  para una onda reversible eliminando  $\chi_R$  y  $\chi_O$  de las ecs. A.94 y A.96 no es fácil excepto para algunos valores particulares de  $z$ . Las variaciones y propiedades de los voltamogramas cíclicos se pueden examinar empleando las ecs. A.94 y A.96 y utilizando  $\chi_R$  y  $\chi_O$  como variables auxiliares.

Las ecs. A.94 y A.96 indican que la curva  $j - E$  ( $\psi - \zeta$ ) es simétrica respecto a los ejes  $\psi$  y  $\zeta$ ; puesto que las ecs. A.94 y A.96 contienen solamente dos parámetros:  $z$  y  $\beta$ , es un hecho claro que la forma de la onda reversible viene determinada por  $z$  y  $W/RT$ ; esta es la razón por la que previamente se estableció que  $W$  es la energía de interacción relacionada con el potencial de equilibrio. Además, y como se ve en la ecuación A.96, cuando  $\beta = z/z-2$ ,  $\psi_a \rightarrow \infty$  y  $\psi_c \rightarrow \infty$ , y si  $\beta > z/z-2$  entonces  $\psi_a$  y  $\psi_c$  no pueden satisfacer las condiciones  $\psi_a \geq 0$  y  $\psi_c \leq 0$ , respectivamente; en consecuencia, se tiene la condición que debería satisfacer  $\beta$ :

$$0 < \beta < \frac{z}{z-2} \quad (\text{A.97})$$

Puesto que  $\beta$  posee su valor máximo cuando  $\chi_R = \chi_O = 1/2$ , se obtiene, teniendo en cuenta la definición de  $\beta$ : ec. A.73,

$$\frac{W}{RT} \leq z \ln\left(\frac{z}{z-2}\right) \quad (\text{A.98})$$

Por ejemplo, la ec. A.98 se reduce a:

- $W / RT \leq 2.77$  para  $z = 4$  (red cuadrada sencilla)
- $W / RT \leq 2.43$  para  $z = 6$  (red de empaquetamiento compacto)
- $W / RT \leq 2$  para  $z \rightarrow \infty$  (distribución aleatoria).

## Apéndice

En la figura 20 se muestran ejemplos típicos de curvas  $j - E$  en forma reducida calculada a partir de las ecs. A.94 y A.96 con  $z = 6$  y varios valores del parámetro de interacción  $W / RT$ . Para comparar, se incluyen las curvas tenidas a partir del tratamiento  $z \rightarrow \infty$  ( de Laviron ). Las características de las curvas, de forma general son:

i).- Cuando el parámetro de interacción  $W / RT$  es mucho mayor de cero (fig. A.20 A) la onda posee un pico simétrico cuando  $E = E_0'$ , el cual se vuelve cada vez más agudo y estrecho a medida que  $W / RT$  crece, y diverge hacia un valor infinito cuando  $W/RT = 2.43$  para  $z=6$  y  $W/RT = 2$  cuando  $z \rightarrow \infty$ .

ii).- Por otra parte, cuando el valor  $W/RT$  desciende de cero, el pico en  $E=E_0'$  se vuelve cada vez más bajo y ancho antes de que el valor de  $W/RT$  alcance el valor - 2.19 ( para  $z=6$ ), como se demostrará más abajo.

Si el valor de  $W/RT$  es menor de -2.19, entonces la onda se divide en dos y la densidad de corriente en  $E=E_0'$  no es un máximo sino un mínimo (fig. A.20 B); debe observarse que tales curvas  $j - E$  con dos picos no aparecen nunca como consecuencia de una distribución aleatoria para cualquier valor negativo de  $W/RT$ .

El potencial de pico y la densidad de corriente de pico se pueden obtener analíticamente como sigue: En el potencial de pico,  $d\psi / d\zeta = 0$ , y a partir de la ec. A.96 se obtiene:

$$\frac{d\psi_a}{d\zeta} = -\frac{d\psi_c}{d\zeta} = -\frac{\chi_R \chi_O (\chi_R - \chi_O) \left( \frac{1}{2} (z-2) \beta^3 - \left( \frac{3z}{4} \right) \beta^2 + \frac{z}{4} \right)}{\left( \beta - \frac{1}{2} z (\beta - 1) \right)^3} \quad (\text{A.99})$$

En consecuencia, el pico puede aparecer cuando se satisfacen las siguientes condiciones:

$$\chi_O = \chi_R = \frac{1}{2} \quad (\text{A.100})$$

o bien:

$$\left( \frac{z-2}{2} \right) \beta^3 - \left( \frac{3z}{4} \right) \beta^2 + \frac{z}{4} = 0 \quad (\text{A.101})$$

La ecuación algebraica ec. A.101 posee únicamente una solución,  $\beta_r$ , que satisface la ec. A.97; por ejemplo, se tiene  $\beta_r = 0.6943$  para  $z = 6$  y  $\beta_r = 0.6527$  para  $z = 4$ . Los valores correspondientes de  $\chi_R$  ó  $\chi_O$ ,  $(\chi_R)_p$  ó  $(\chi_O)_p$  vienen dados por:

$$(\chi_R)_p = (\chi_O)_p = \frac{1 \pm \left( 1 - \frac{(1 - \beta_r^2)}{(1 - \epsilon^2)} \right)^{1/2}}{2} \quad (\text{A.102})$$

Teniendo en cuenta que  $\chi_R$  ó  $\chi_O$  es un número real comprendido entre 0 y 1,

obtenemos la condición para la que se mantiene la ec. A.102:

$$\epsilon \leq \beta_r \quad (\text{A.103})$$

En consecuencia:

$$\frac{W}{RT} \leq z \ln \beta_r \quad (\text{A.104})$$

o lo que es equivalente:

$W/RT \leq -1.71$  para  $z = 4$ , y  $W/RT \leq -2.19$  para  $z = 6$ . Un análisis de los signos de  $d\psi_a/d\xi$  y  $d\psi_c/d\xi$  antes y después de pasar a través de  $(\chi_R)_p$  ó  $(\chi_O)_p$  conduce a la conclusión de que si i):  $W/RT \geq z \ln \beta_r$ , entonces tanto  $\psi_a$  como  $\psi_c$  poseen un solo pico en  $(\chi_R)_p = (\chi_O)_p = 1/2$ ; y ii) si  $W/RT < z \ln \beta_r$ , entonces existen dos picos correspondientes a los dos valores en  $(\chi_R)_p$  y  $(\chi_O)_p$ , respectivamente y muestran un mínimo en  $(\chi_R)_p = (\chi_O)_p = 1/2$ . Por lo tanto, el potencial de pico  $E_p$  se obtiene sustituyendo dichos valores de  $(\chi_R)_p$  y  $(\chi_O)_p$  en la ec. A.94 como sigue:

i).- Para  $z \ln \{z / (z-2)\} \geq W/RT \geq z \ln \beta_r$ ,

$$E_p = E^{0'} \quad (\text{A.105})$$

ii).- Para  $W/RT < z \ln \beta_r$ ,

$$E_{\pm p} = E^{0'} \mp \frac{RT}{nF} \left[ (z-2) \ln \left( \frac{(1-\epsilon^2)^{1/2} + (\beta_r^2 - \epsilon^2)^{1/2}}{(1-\beta_r^2)^{1/2}} \right) + z \ln \left( \frac{\beta_r(1-\epsilon^2)^{1/2} - (\beta_r^2 - \epsilon^2)^{1/2}}{\epsilon(1-\beta_r^2)^{1/2}} \right) \right] \quad (\text{A.106})$$

donde los signos superior e inferior se refieren a potenciales de pico menos y más positivos que  $E^{0'}$  respectivamente. Para  $z = 6$  se tiene, por ejemplo:

$$E_p = E^{0'} \quad \text{para } 2.43 \geq W/RT \geq -2.19 (1.5 \geq \epsilon > 0.694) \text{ y}$$

$$E_{\pm p} = E^{0'} \mp \left( \frac{RT}{nF} \right) \left[ 4 \ln \left( \frac{(1-\epsilon^2)^{1/2} + (0.482 - \epsilon^2)^{1/2}}{0.72} \right) + 6 \ln \left( \frac{0.694(1-\epsilon^2)^{1/2} - (0.482 - \epsilon^2)^{1/2}}{0.72\epsilon} \right) \right] \quad (\text{A.107})$$

$$\text{para } W/RT < -2.19 (\epsilon < 0.694)$$

La densidad de corriente de pico  $j_p$  se puede obtener sustituyendo los valores correspondientes de  $(\chi_R)_p$  y  $(\chi_O)_p$  en la ec. A.94, y tenemos:

(i) para  $z \ln \left\{ \frac{z}{z-2} \right\} \geq W/RT \geq z \ln \beta_r$ ,

$$(j_p)_a = -(j_p)_c = \frac{n F \Gamma_T \left( \frac{n F v}{RT} \right)}{4 \left[ 1 - \left( \frac{z}{2} \right) \left( 1 - \frac{1}{\epsilon} \right) \right]} \quad (\text{A.108})$$

(ii) para  $W/RT < z \ln \beta_r$ ,

$$(j_p)_a = -(j_p)_c = \frac{n F \Gamma_T \left( \frac{n F v}{RT} \right) (1 - \beta_r^2)}{4 \left[ 1 - \left( \frac{z}{2} \right) \left( 1 - \frac{1}{\beta_r} \right) (1 - \epsilon^2) \right]}$$

Por ejemplo, para  $z = 6$ , tenemos:

$$(j_p)_a = -(j_p)_c = \frac{n F \Gamma_T \left( \frac{n F v}{RT} \right) \epsilon}{4 (3 - 2 \epsilon)} \quad \text{para } 2.43 \geq W/RT \geq -2.19 \quad (1.5 \geq \epsilon \geq 0.694) \quad \text{y} \quad (\text{A.109})$$

$$(j_p)_a = -(j_p)_c = \frac{n F \Gamma_T \left( \frac{n F v}{RT} \right) \cdot 0.223}{4 (1 - \epsilon^2)}$$

### C.2).- ONDAS TOTALMENTE IRREVERSIBLES.

Cuando  $\Lambda$  es suficientemente pequeño, la reacción inversa se puede despreciar en la región de potencial donde fluye una corriente apreciable debida a la reacción directa.

En consecuencia obtenemos a partir de la ec. A.87 para el barrido de potencial en la dirección positiva (onda anódica):

$$\Psi_a = -\frac{d \chi_R}{d \zeta} = \Lambda \phi_R (2 \chi_R) \exp(\alpha_a \zeta) \quad (\text{A.110})$$

Para el barrido de potencial en dirección negativa (onda catódica) la ec. A.90 se reduce a:

$$\psi_c = -\frac{d\chi_o}{d\zeta} = -\Lambda \phi_o(2\chi_o) \exp(-\alpha_c \zeta) \quad (\text{A.111})$$

Las ecs. A.110 y A.111 se pueden transformar en una forma en que las variables aparezcan separadas dado que  $\phi_R$  y  $\phi_o$  son funciones, solamente, de  $\chi_R$  y  $\chi_o$  respectivamente. En consecuencia, integrando la ec. A.110 entre  $-\infty$  y  $\zeta$  con respecto a  $\zeta$  se llega a:

$$I\left(\chi_R; \frac{W}{2zRT}, \frac{\Delta W^*}{2zRT}\right) = \phi_o = \left(\frac{\text{Cosh}(W/2zRT)}{\text{Cosh}(\Delta W^*/2zRT)}\right)^z \left(\frac{\Lambda}{\alpha_a}\right) \exp(\alpha_a \zeta) \quad (\text{A.112})$$

donde

$$I(\chi; \xi, \Xi) = \int_{\chi}^1 \frac{1}{2u} \left( \frac{\beta(u) + 1}{4(1-u) \sinh(\xi + \Xi) + \{\beta(u) + 1\} \exp(-\xi - \Xi)} \right)^z du \quad (\text{A.113})$$

con

$$\beta(u) = \left[ 1 + 4u(1-u) \left\{ \exp\left(\frac{2W}{zRT}\right) - 1 \right\} \right]^{1/2} \quad (\text{A.114})$$

Así tenemos para el barrido de potencial en la dirección positiva (onda anódica):

$$\alpha_a \zeta = -\ln\left(\frac{\Lambda}{\alpha_a}\right) - z \ln\left(\frac{\text{Cosh}(W/2zRT)}{\text{Cosh}(\Delta W^*/2zRT)}\right) + \ln I\left(\chi_R; \frac{W}{2zRT}, \frac{\Delta W^*}{2zRT}\right) \quad (\text{A.115})$$

De forma análoga, obtenemos para el barrido en la dirección negativa (onda catódica):

$$\alpha_c \zeta = -\ln\left(\frac{\Lambda}{\alpha_c}\right) + z \ln\left(\frac{\text{Cosh}(W/2zRT)}{\text{Cosh}(\Delta W^*/2zRT)}\right) - \ln I\left(\chi_o; \frac{W}{2zRT}, \frac{-\Delta W^*}{2zRT}\right) \quad (\text{A.116})$$

Las ecs. A.115 y A.116 ponen de manifiesto la relación entre  $\zeta$  y  $\chi_R$  para la onda anódica y entre  $\zeta$  y  $\chi_o$  para la onda catódica. Las densidades de corriente, normalizadas (funciones corriente)  $\psi_a$  y  $\psi_c$  pueden obtenerse reescribiendo las ecuaciones 110 y 111, empleando las ecs. A.115 y A.116 según:

$$\Psi_a = \alpha_a (2\chi_R) \left[ \frac{4(1-\chi_R)}{\beta+1} \sinh\left(\frac{W+\Delta W^*}{2zRT}\right) + \exp\left(-\frac{W+\Delta W^*}{2zRT}\right) \right]^2 \quad (\text{A.117})$$

$$\cdot I\left(\chi_R; \frac{W}{2zRT}, \frac{\Delta W^*}{2zRT}\right)$$

y

$$\Psi_c = \alpha_c (2\chi_O) \left[ \frac{4(1-\chi_O)}{\beta+1} \sinh\left(\frac{W-\Delta W^*}{2zRT}\right) + \exp\left(-\frac{W-\Delta W^*}{2zRT}\right) \right]^2 \quad (\text{A.118})$$

$$\cdot I\left(\chi_O; \frac{W}{2zRT}, \frac{-\Delta W^*}{2zRT}\right)$$

La combinación de las ecs. A.115 con A.117, y A.116 con A.118, nos permite construir las curvas anódica y catódica de corriente-potencial. Puesto que  $\psi$  no contiene  $\Lambda$  se deduce que el aspecto de las curvas normalizadas  $\psi - \zeta$  en el caso de total irreversibilidad, no depende del parámetro  $\Lambda$  ( en consecuencia, de la velocidad de barrido ) y el único efecto al modificar  $v$  es un desplazamiento en el eje de potenciales manteniendo la misma forma de onda.

A continuación se deducen las expresiones de la densidad de corriente y potencial de pico. A partir de las ecs. A.117 y A.115 se obtiene:

$$\frac{d\Psi_a}{d\zeta} = \left(\frac{d\Psi_a}{d\chi_R}\right) \left(\frac{d\chi_R}{d\zeta}\right) = -\alpha_a \Psi_a \left[ 2F\left(\chi_R; \frac{W}{2zRT}, \frac{\Delta W^*}{2zRT}\right) - 1 \right] \quad (\text{A.119})$$

con :

$$F(\chi; \xi, \Xi) = \left[ 1 - \frac{2z(\beta-1+2\chi) \sinh(\xi+\Xi)}{\beta [4(1-\chi) \sinh(\xi+\Xi) + (\beta+1) \exp(-\xi-\Xi)]} \right] \quad (\text{A.120})$$

$$\cdot \left[ \frac{4(1-\chi)}{\beta+1} \sinh(\xi+\Xi) + \exp(-\xi-\Xi) \right]^2 I(\chi; \xi, \Xi)$$

Puesto que  $d\Psi_a / d\zeta = 0$  en el potencial de pico, se obtiene una ecuación algebraica en la que el valor de  $\chi_R$  en el potencial de pico ( $\chi_R$ )<sub>p</sub> debe satisfacer :

$$F\left(\chi_{R_p}; \frac{W}{2zRT}, \frac{\Delta W^*}{2zRT}\right) = \frac{1}{2} \quad (\text{A.121})$$

$$F\left(\chi_{O_p}; \frac{W}{2zRT}, \frac{\Delta W^*}{2zRT}\right) = \frac{1}{2} \quad (\text{A.122})$$

Las soluciones de las ecs. A.121 y A.122 se pueden obtener numéricamente (por ejemplo, con un método Newton-Raphson) o gráficamente.

Insertando los valores de  $(\chi_{R_p})$  en las ecs. A.115 y A.117, y efectuando una pequeña reorganización utilizando la ec. A.121, se obtienen las expresiones para el potencial, y densidad de corriente de pico para la onda anódica:

$$\alpha_a(\zeta_o)_p = -\ln\left(\frac{\Lambda}{\alpha_o}\right) - z \ln\left(\frac{\text{Cosh}(W/2zRT)}{\text{Cosh}(\Delta W^*/2zRT)}\right) + \ln I\left(\chi_{R_p}; \frac{W}{2zRT}, \frac{\Delta W^*}{2zRT}\right) \quad (\text{A.123})$$

$$(\Psi_o)_p = \frac{\alpha_a(\chi_{R_p})}{1 - \frac{2z[\beta((\chi_{R_p}) - 1 + 2(\chi_{R_p})) \sinh\left(\frac{W + \Delta W^*}{2zRT}\right)]}{\beta((\chi_{R_p})) \left[ 4[1 - (\chi_{R_p})] \sinh\left(\frac{W + \Delta W^*}{2zRT}\right) + [\beta((\chi_{R_p})) + 1] \exp\left(-\frac{W + \Delta W^*}{2zRT}\right) \right]}} \quad (\text{A.124})$$

y catódica, de forma análoga:

$$\alpha_c(\zeta_o)_p = \ln\left(\frac{\Lambda}{\alpha_c}\right) + z \ln\left(\frac{\text{Cosh}(W/2zRT)}{\text{Cosh}(\Delta W^*/2zRT)}\right) - \ln I\left(\chi_{O_p}; \frac{W}{2zRT}, \frac{-\Delta W^*}{2zRT}\right) \quad (\text{A.125})$$

$$(\Psi)_p = \frac{-\alpha_c (\chi_o)_p}{1 - \frac{2z [\beta((\chi_o)_p) - 1 + 2(\chi_o)_p] \sinh\left(\frac{W - \Delta W^*}{2zRT}\right)}{\beta((\chi_o)_p) \left[ 4 [1 - (\chi_o)_p] \sinh\left(\frac{W - \Delta W^*}{2zRT}\right) + [\beta((\chi_o)_p) + 1] \exp\left(-\frac{W - \Delta W^*}{2zRT}\right) \right]}}$$

(A.126)

Las ecs. A.123 y A.125 indican que la representación de  $(E_o)_p$  en  $(E_c)_p$  frente al  $\ln(|v|)$  dan lugar a líneas rectas con pendientes  $RT/\alpha_a nF$  y  $-RT/\alpha_c nF$  respectivamente.

La figura 21 muestra la dependencia de la corriente de pico anódico para las ondas irreversibles  $\psi_a/\alpha_a$  en función de los parámetros de interacción  $W/RT$  y  $\Delta W^*/RT$  para  $z=6$ , calculados a partir de la solución de la ec. A.121. Obsérvese en la figura 21 que las representaciones de  $(\psi_a)_p/\alpha_a$  se ven ampliadas cinco veces para  $\Delta W^*/RT \geq 0$  en comparación a los que cumplen  $\Delta W^*/RT \leq 0$ . Cuando el valor de  $\Delta W^*/RT$  disminuye, manteniendo constante  $W/RT$  o cuando  $W/RT$  disminuye siendo constante  $\Delta W^*/RT$ , el valor de la corriente de pico disminuye. Como se ha mencionado antes, aparecen dos picos para las ondas reversibles si  $W/RT < -2.19$  para  $z=6$ . En el caso totalmente irreversible, sin embargo, se ha encontrado que la ec. A.121 tiene solamente una solución para  $z=6$  y para  $-5 \leq \Delta W^*/RT \leq 5$  si  $W/RT \geq -3.1$  y que solamente se ve un pico y un hombro en los voltamogramas (por ejemplo, en la figura 23 para  $W/RT = -3$ ). Cuando  $W/RT \leq -3.1$  pueden llegar a observarse dos picos en los voltamogramas, dependiendo del valor  $\Delta W^*/RT$ . La figura 21 se aplica a las ondas catódicas si se supone que la abcisa es para  $-\Delta W^*/RT$  y la ordenada  $(\psi_c)_p/\alpha_c$ .

La dependencia del potencial de pico anódico,  $\alpha_a(\zeta_a)_p + \ln(\Lambda/\alpha_a)$ , con  $W/RT$  y  $\Delta W^*/RT$  se ve en la figura 22 para  $z=6$ . Cuando aparece solamente un pico, el potencial de pico  $(\zeta_a)_p$  se desplaza hacia valores menos negativos al disminuir  $W/RT$  o  $\Delta W^*/RT$ ; dicha figura es la misma para las ondas catódicas si la abcisa es  $-\Delta W^*/RT$  y la ordenada  $-\alpha_c(\zeta_c)_p + \ln(\Lambda/\alpha_c)$ .

### C.3).- CASO GENERAL (ONDAS CUASIREVERSIBLES):

Cuando el valor de  $\Lambda$  es intermedio, no podemos simplificar las ec. A.90 y A.92 y deben ser resueltas numéricamente. En las figuras 23, 24 y 25 se muestran algunas curvas  $\psi-\zeta$  calculadas numéricamente empleando un método Runge-Kutta-Gill para varios parámetros  $\Lambda$ ,  $\alpha_a$ ,  $W/RT$  y  $\Delta W^*/RT$ . Para evitar divergencias de la solución ha de dirigirse con cuidado  $\zeta$ ,  $\chi_R$ ,  $\chi_O$  y el incremento  $\Delta\zeta$ .

La figura 23, muestra que para un conjunto particular de parámetros  $z=6$ ,  $W/RT=-3$  y  $\Delta W^*/RT=-3$  y  $\alpha_a = \alpha_c = 0.5$  y varios valores de  $\Lambda$  se ve que el aspecto de las ondas cambia mucho al modificar la velocidad, especialmente en la zona de transición de cuasireversible a irreversible. Un cambio muy importante se aprecia entre las curvas b y c, lo que corresponde a un cambio de una década en el valor de  $v$ . Se ha confirmado que las ondas e, f y g son irreversibles e idénticas a las obtenidas a partir de las ecs. A.115-A.118, válidas para ondas irreversibles. Se han incluido las curvas para  $z \rightarrow \infty$ ; tal y como se ha

observado para las ondas reversibles, dos picos o un pico y una cola no aparecen en los voltamogramas para la aproximación con distribución aleatoria.

El efecto de los valores  $\Delta W^{\#}/RT$  y  $\Lambda$  sobre el aspecto de las ondas a valores constantes de  $W/RT$  se muestra en las figuras 24, para  $W/RT = 2$  y  $0$ , respectivamente, para las ondas anódicas. De igual forma que para las ondas reversibles de la figura 20, las ondas se vuelven más anchas cuando  $W/RT$  disminuye para el caso cuasirreversible e irreversible. Además, cuando  $\Delta W^{\#}/RT$  pasa de positivo a negativo, la onda se vuelve más ancha. Una dependencia no común de la corriente de pico  $\Lambda$  se puede apreciar en las figuras: las curvas catódicas 2, 3 y 4 en la figura 23, y las curvas 1a, 2a, 1b, 2b, 1c y 2c, en fig. A.24, indican que la corriente de pico normalizada  $j_p/v$  aumenta al disminuir  $\Lambda$  (aumentar  $v$ ). Tal comportamiento no se ha observado para una distribución aleatoria.

La figura A.25 muestra el efecto del coeficiente  $\alpha$  sobre la forma de la onda para  $W/RT = -2$ ,  $3 \leq \Delta W^{\#}/RT \leq 3$  y  $\Lambda = 0.1$ . Cuando  $\alpha$  aumenta, la onda anódica se vuelve más estrecha siguiendo la tendencia habitual.

#### D) TRANSICIONES DE FASE Y VOLTAMETRIA CICLICA

Además de las consideraciones termodinámicas brevemente mencionadas en el apartado A.6 está ación con el factor  $s$  de Frumkin, la aproximación cinética a la formación de monocapas está constituida por los modelos de transición de fase. Dicha aproximación supone que los núcleos bidimensionales de las especies que constituyen la monocapa se forman en lugares específicos de la superficie y posteriormente crecen y colisionan para formar la monocapa. Dicho proceso constituye la esencia conceptual de la teoría NGC (nucleación - crecimiento - colisión), quizás la mayor herramienta hasta la actualidad que permite caracterizar los procesos de electrocristalización. En Noel, Chandrasekaran, Basha (1987), pueden encontrarse diferentes criterios, así como una revisión del fenómeno, que permite caracterizar este tipo de procesos, basta decir que desde el punto de vista de la voltametría cíclica, la presencia de picos agudos y estrechos en el voltamograma puede ser un síntoma claro de la presencia de cambios de fase. Recientemente, Sánchez Maestre, M., R. Rodríguez Amado, E. Muñoz, J. Ruiz, R. Camacho, (1994), han establecido criterios complementarios a los de Matsuda, Aoki, Tokuda, (1987a y b), con el fin de caracterizar voltaméricamente dicho tipo de procesos.

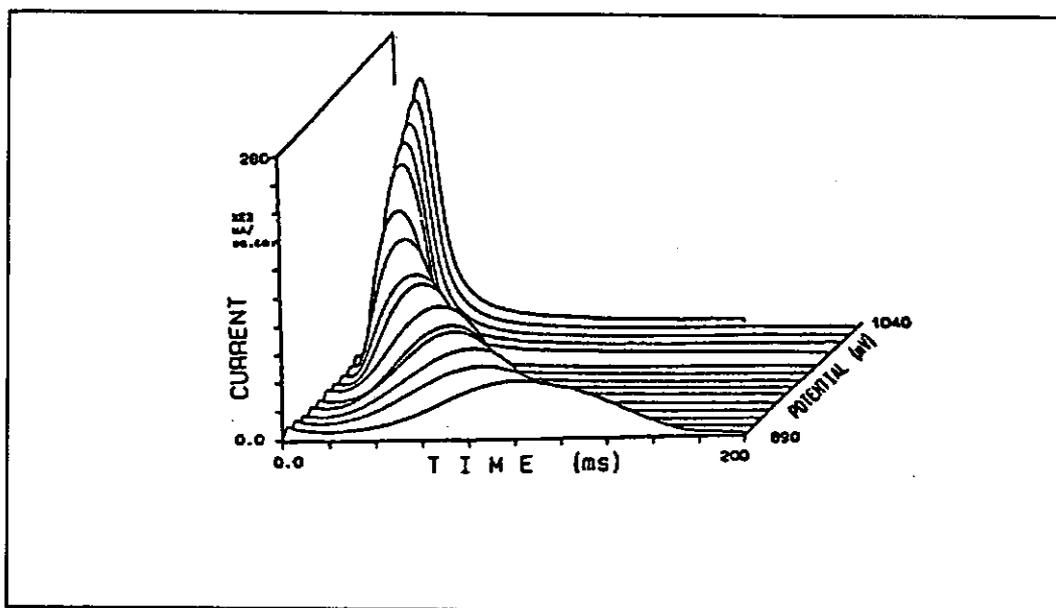


Figura A.1.- Representación tridimensional del intermedio en la oxidación del CO determinada en experimentos de etapa de potencial sobre un electrodo de Pt(100) en disolución 0.1M de  $\text{HClO}_4$ . El salto de potencial fue aplicado desde  $E_i = +0.40\text{V}$  hasta  $E_f$  (representado en el tercer eje de la figura).

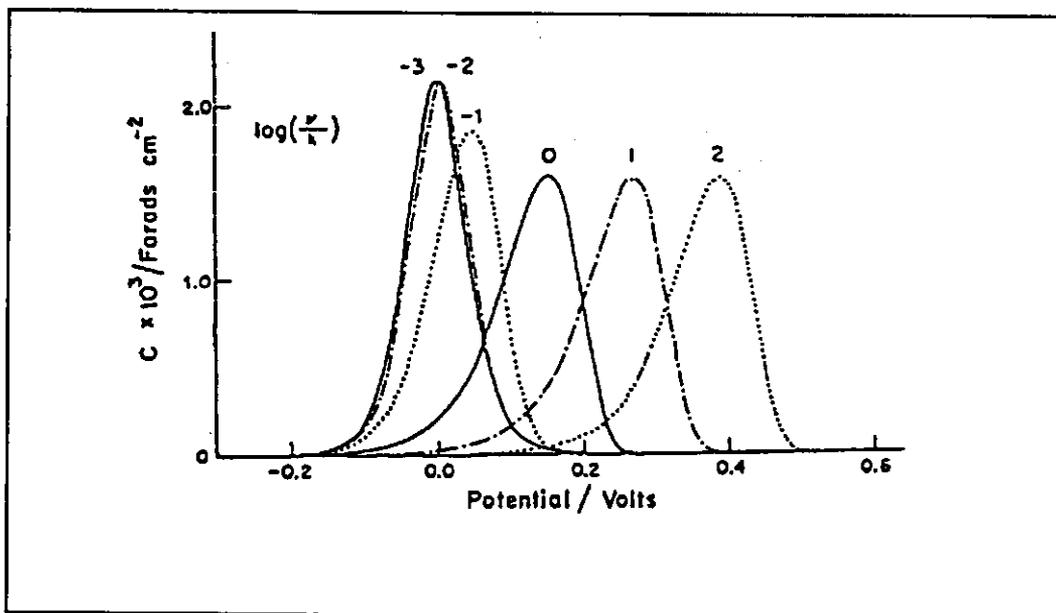


Figura A.2.- Representaciones de  $C$  vs.  $V$  para la reacción de la ec. (1) para varios valores de  $v/k$ , nótese la evolución del comportamiento reversible al irreversible.

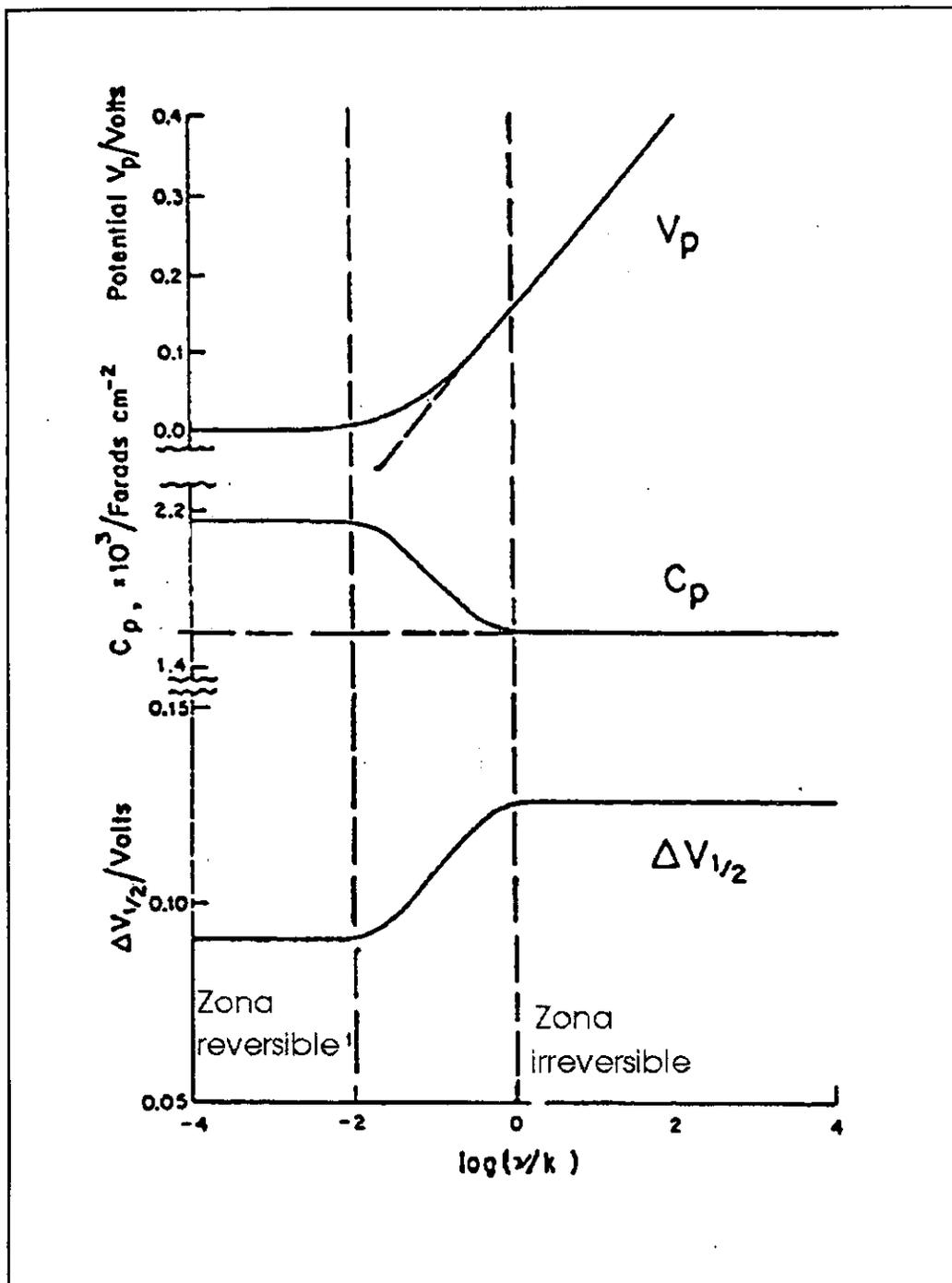


Figura A.3.- Representación de  $V_p$ ,  $C_p$  y  $\Delta V_{1/2}$  vs.  $\log v/k$ , obtenida a partir de la figura anterior, destaca, nuevamente, la transición del comportamiento reversible al irreversible.

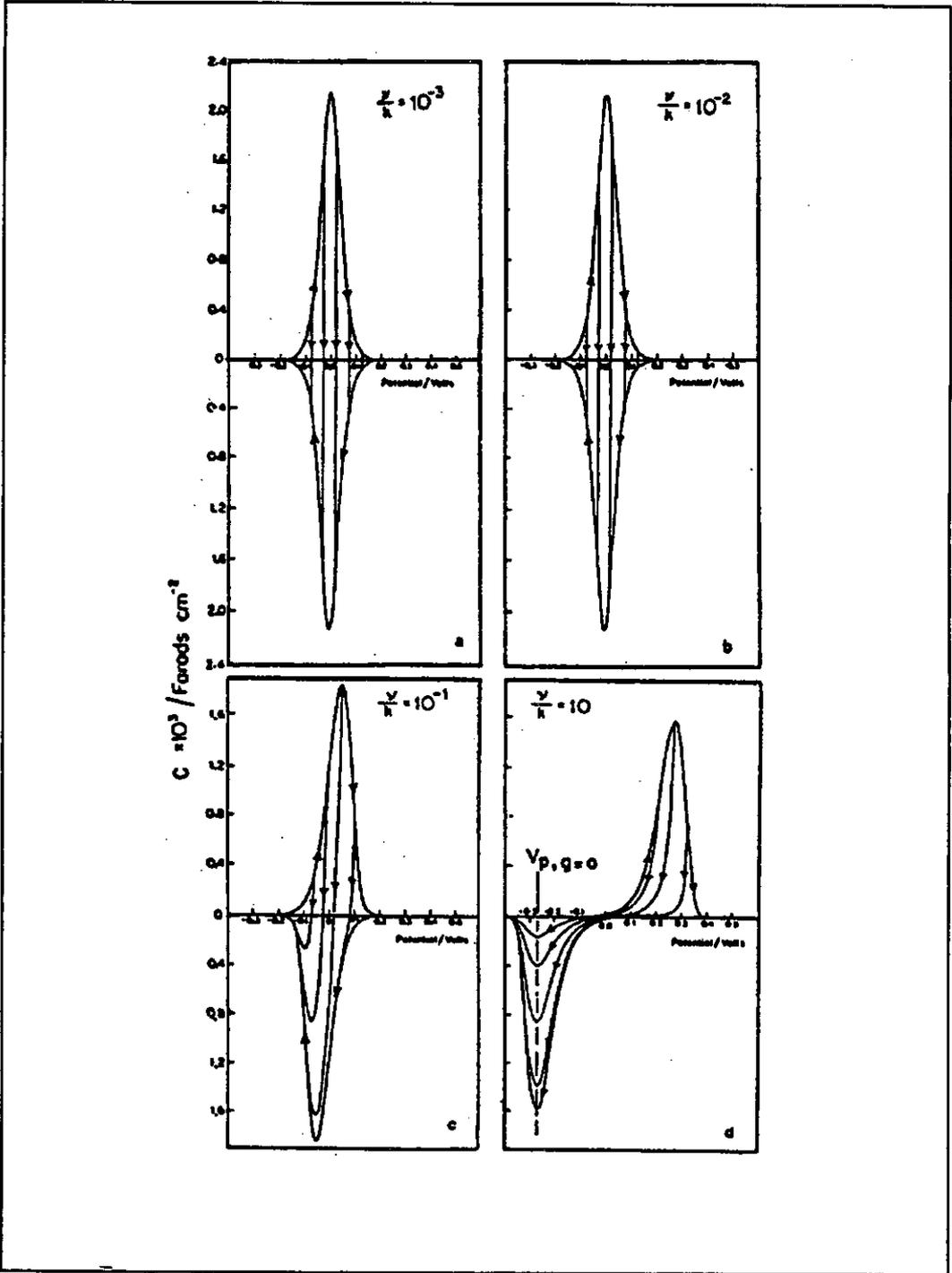


Figura A.4.- Representación anódica y catódica de  $C$  vs.  $V$  para varios valores de  $\theta_B$  y diversos grados de reversibilidad de la reacción.

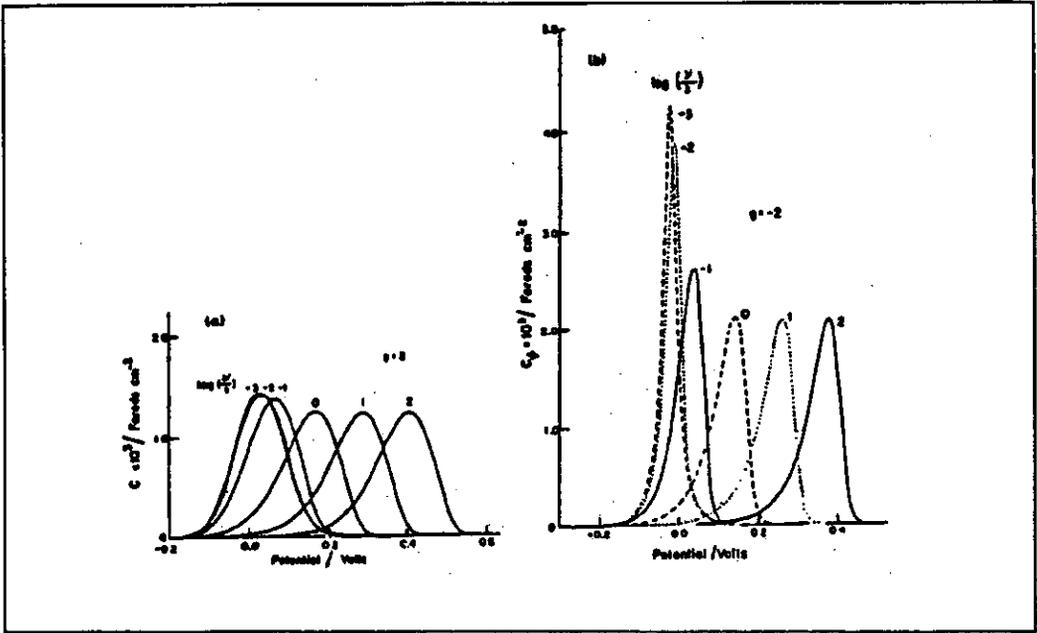


Figura A.5.- (a) Representación de  $C$  vs.  $V$  para la reacción de la ec. (1), cuando  $g=2$ , para varios valores de  $v/k$ , nótese la progresión del comportamiento reversible al irreversible. (b) id. con  $g=-2$ .

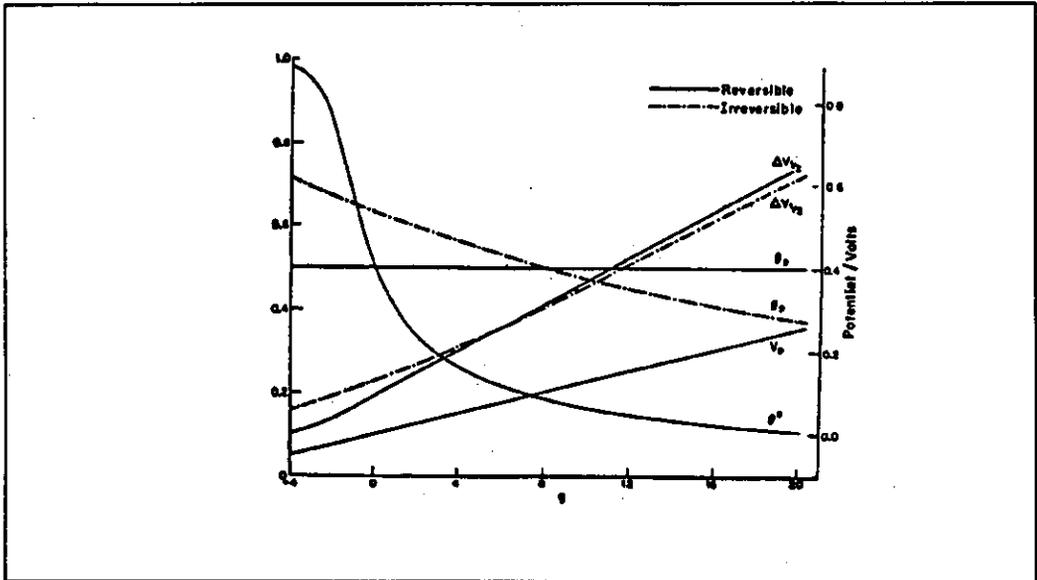


Figura A.6.-Dependencia de  $V_p$ ,  $\theta_p$ ,  $\Delta V_{1/2}$  y  $\theta^0$ , característicos de la representación  $C$  vs.  $V$  para condiciones de reversibilidad e irreversibilidad de la reacción (1), frente a  $g$ .

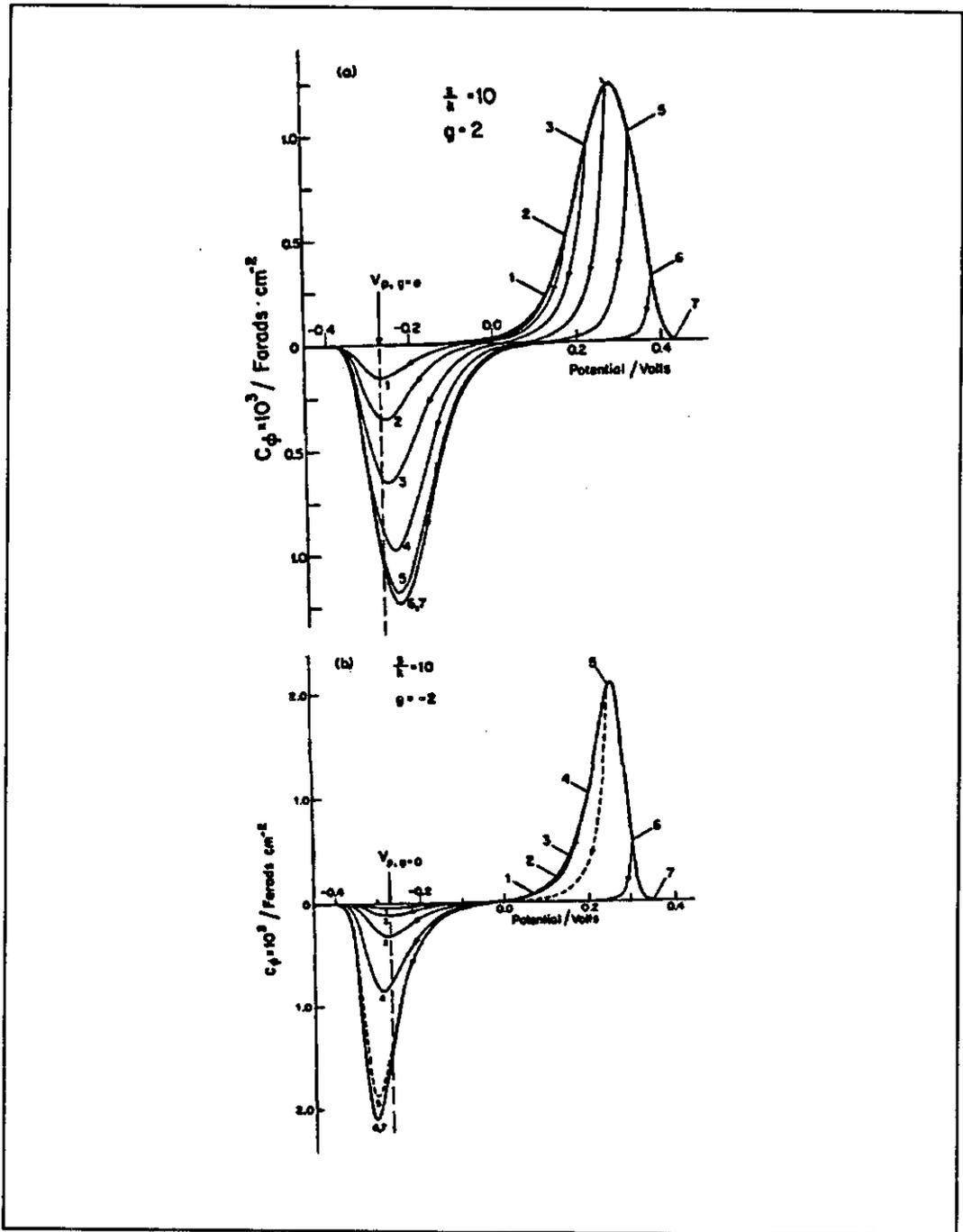


Figura A.7.- Representaciones  $C$  vs  $V$  para el barrido directo e inverso ( $v/k = 10$ ) para a)  $g=2$  y b)  $g=-2$  para varios valores iniciales de  $\theta_B$ .

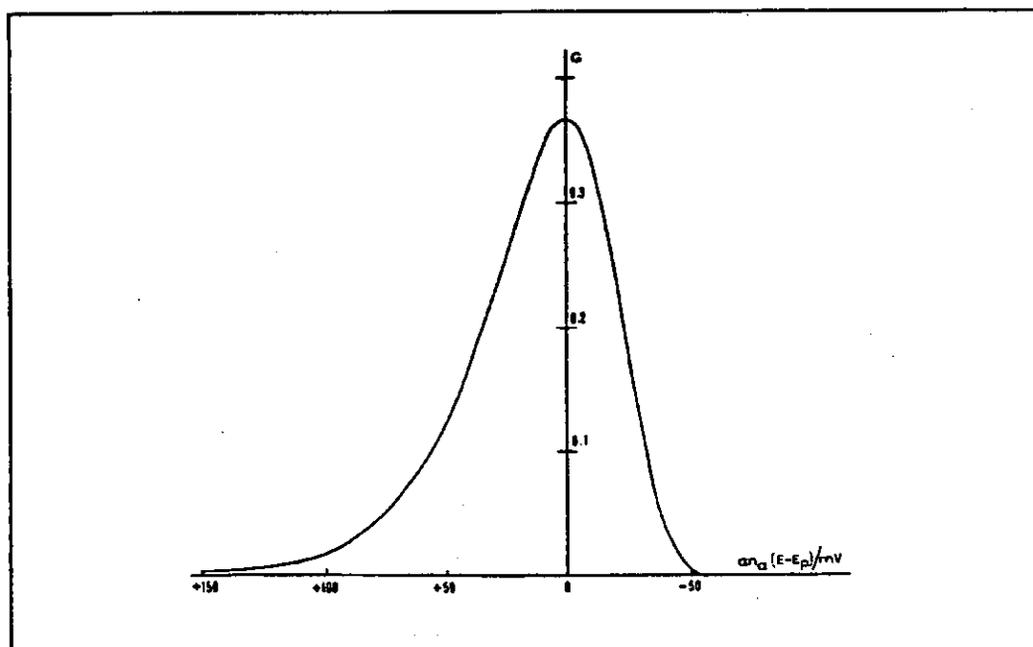


Figura A.8- Simulación de la función G para el pico irreversible en función de  $\alpha n_{\alpha}(E-E_p)$ .

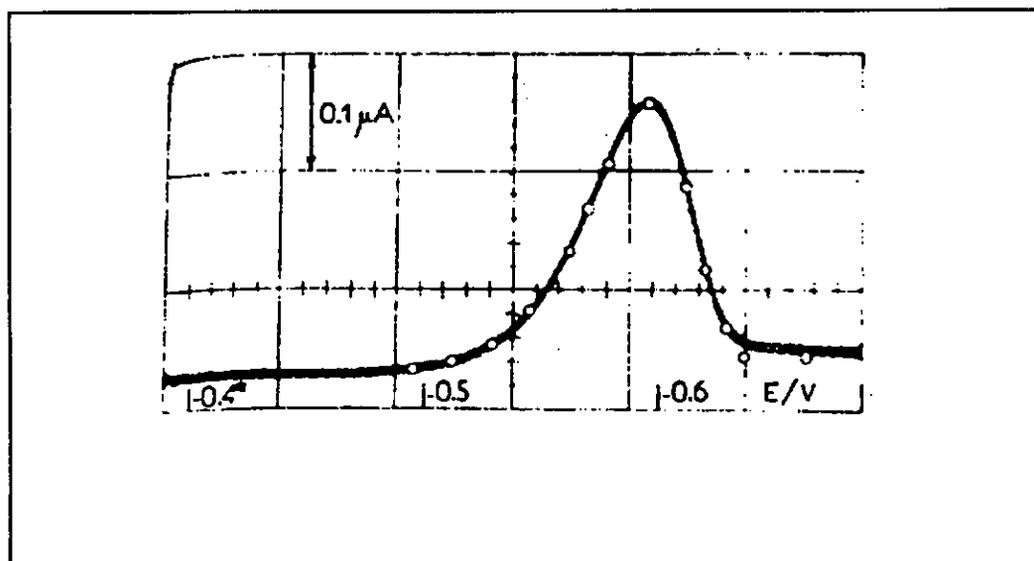


Figura A.9.- Picos de adsorción para el tran-4',4''-dipiridil-1,2,etileno.  $H_2SO_4$  0.05M; agua;  $c=0.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ;  $v=0.1 \text{ Vs}^{-1}$ ;  $E_i=-0.3 \text{ V}$ ;  $t_1=8 \text{ s}$ . Los valores teóricos (representados por puntos) han sido calculados con  $\Gamma_0(t_1)=0.39 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  (valor obtenido por integración gráfica del pico);  $A=1.7 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$ ;  $\alpha n_{\alpha}=1.2$ ;  $n=2$ .

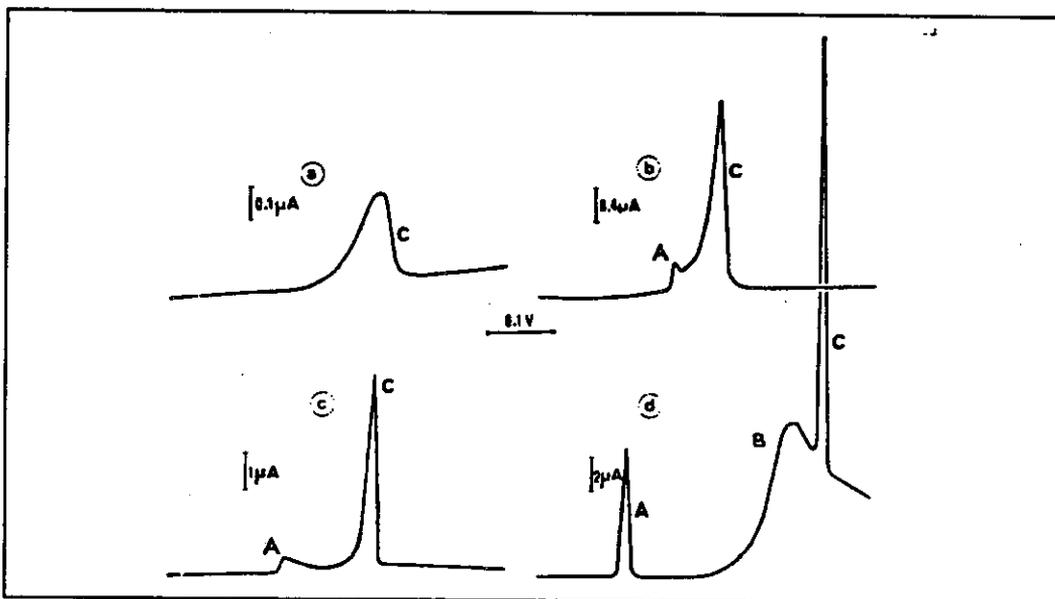


Figura A10.- Picos del tran-4',4''-dipiridil-1,2,etileno. pH=6.6 (Britton-Robinson); agua;  $E_i = -0.55V$ ;  $t_i = 8s.$ ;  $v = 0.1Vs^{-1}$ ;  $m = 0.257 mg s^{-1}$ ;  $c = (a) 0.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $(b) 3 \cdot 10^{-5}$ ,  $(c) 8 \cdot 10^{-5}$ ,  $(d) 4 \cdot 10^{-4} mol l^{-1}$ .

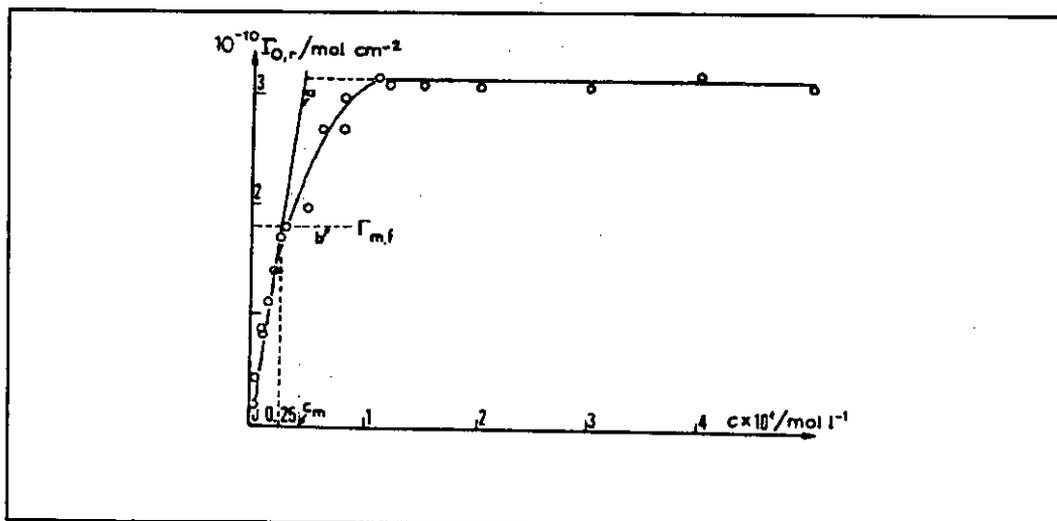


Figura A.11.- Variaciones de  $\Gamma_{0,r}$  vs.  $c$ , con las mismas condiciones que en la figura anterior. (a) Variación teórica calculada a partir de la ecuación de Koryta con  $D = 8.1 \cdot 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ ; (b) Concentración superficial máxima calculada para una orientación plana.

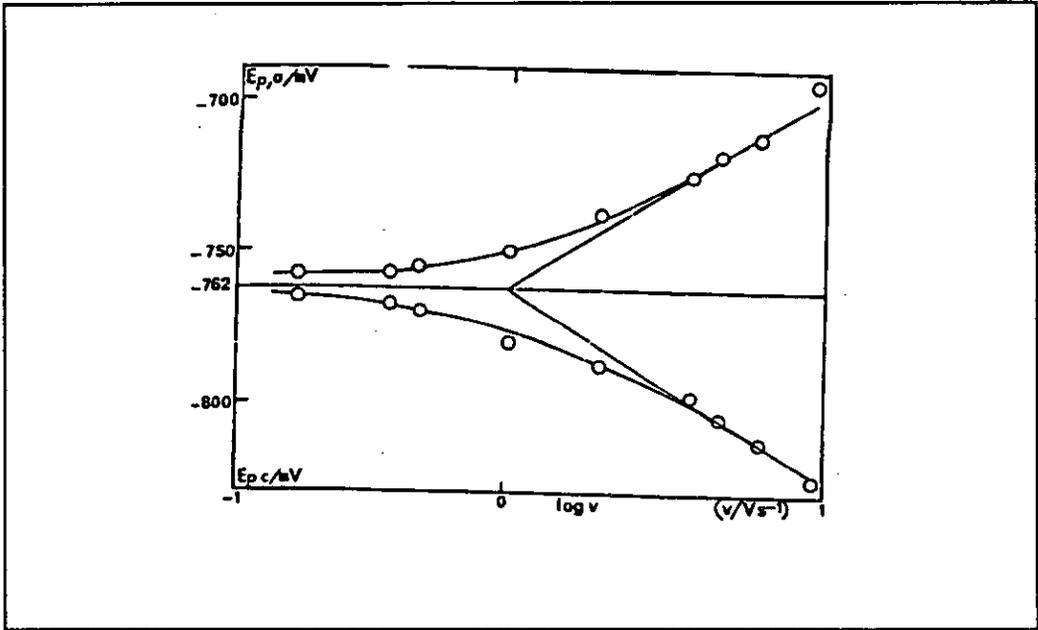


Figura A12.-  $(E_p - E^0) = f(\log v)$  en función de  $v$  para benzo(c)cinolina.

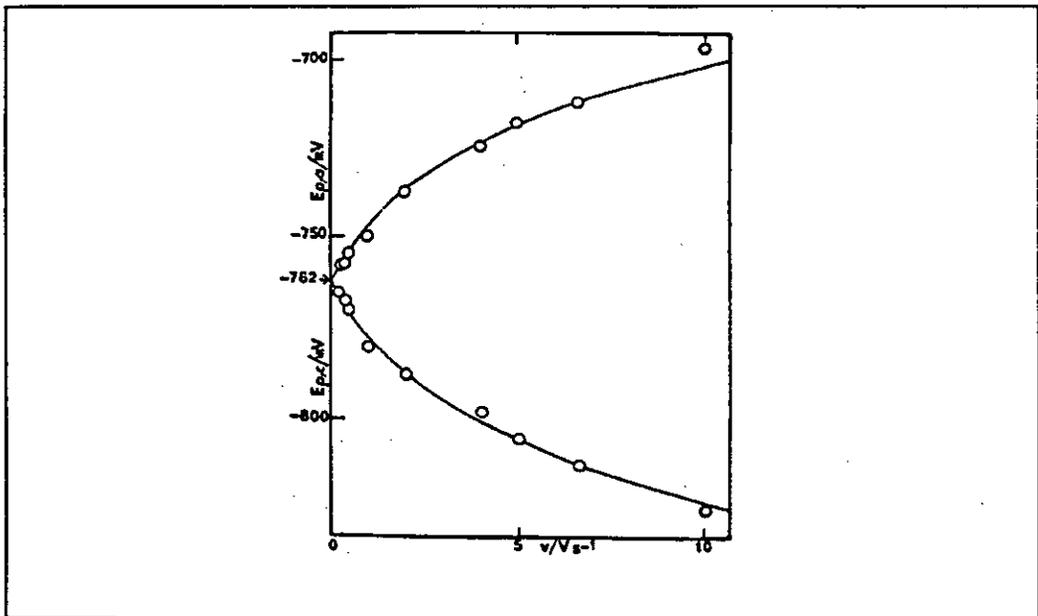


Figura A13.- Variación experimental de  $E_p$  en función de  $v$  para benzo(c)cinolina. Se ha calculado la curva teórica para  $\alpha = 0.5$  y  $k_p = 38.9 \text{ s}^{-1}$

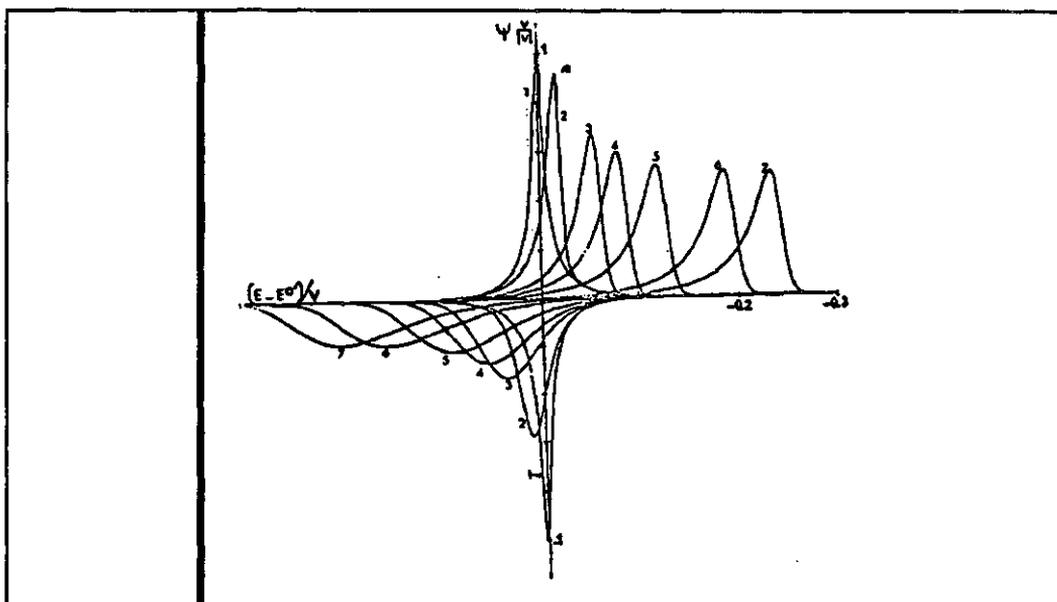


Figura A.14.- Picos voltamétricos a 25°C.  $\beta\theta_T=0.75$ ;  $\gamma\theta_T=-0.75$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  $\nu G\theta_T=1.5$ ,  $s=0$ ,  $\alpha=0.5$ .  $|m|$ : (1)  $\infty$ , (2) 3, (3) 0.5, (4) 0.25, (5) 0.1, (6) 0.025, (7) 0.01.

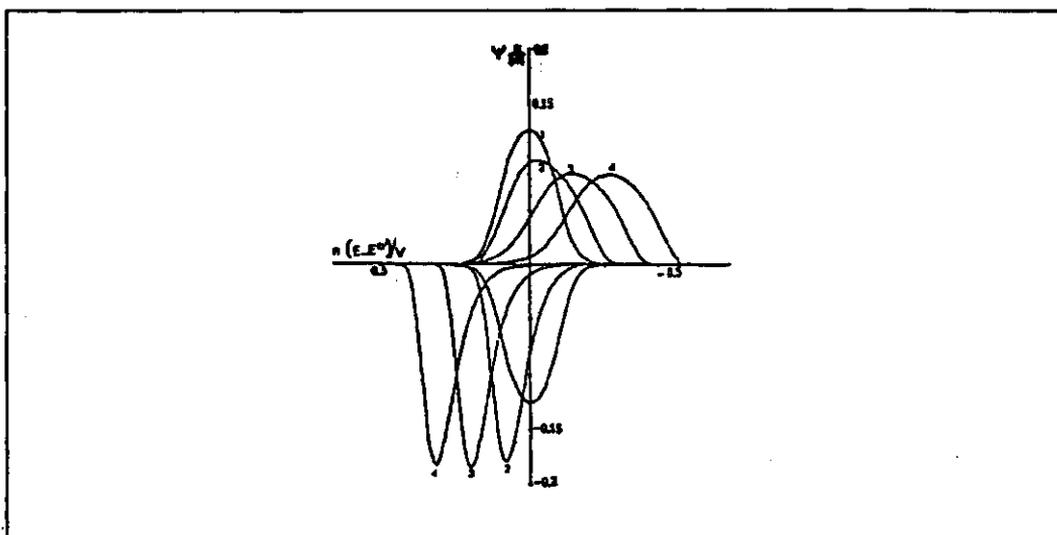


Figura A15- Picos voltamétricos a 25°C.  $\beta\theta_T=-1$ ;  $\gamma\theta_T=1$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  $\nu G\theta_T=-2$ ,  $s=0$ ,  $\alpha=0.5$ .  $|m|$ : (1)  $\infty$ , (2) 0.1, (3) 0.01, (4) 0.001.

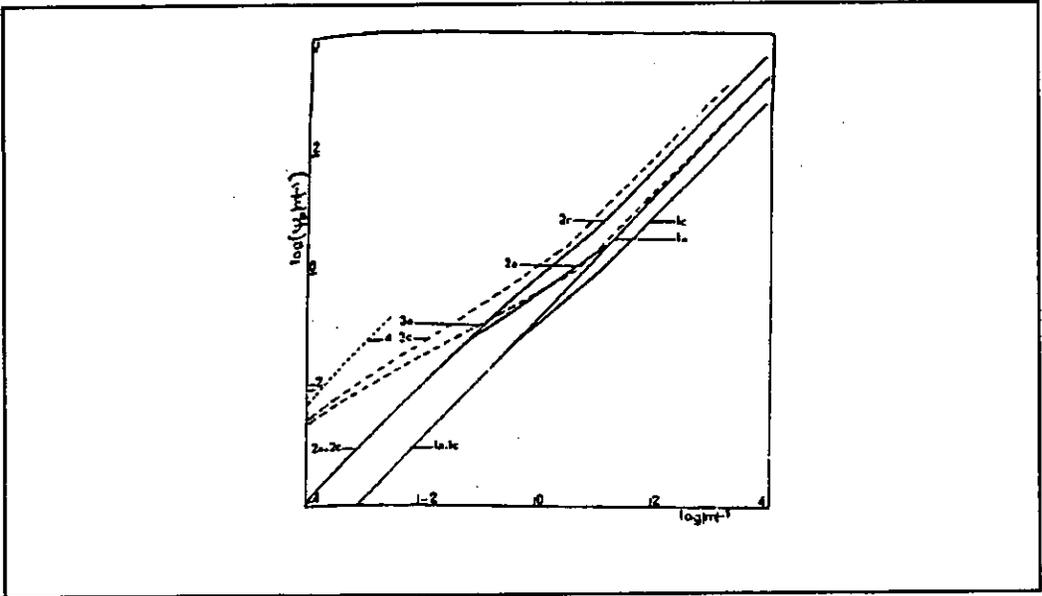


Figura A16.- Variaciones de  $\log(\psi|m|^{-1})$  en función de  $\log|m|^{-1}$  a 25°C,  $\alpha=0.5$ , c=catódico, a=anódico, (1)  $\beta\theta_T=-1$ ;  $\gamma\theta_T=1$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  $\nu G\theta_T=-2$ ,  $s=0$ , (2)  $\beta\theta_T=0.75$ ;  $\gamma\theta_T=-0.75$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  $\nu G\theta_T=1.5$ ,  $s=0$ , (3)  $\beta\theta_T=0.995$ ;  $\gamma\theta_T=-0.995$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  $\nu G\theta_T=1.99$ ,  $s=0$ , (4) Asíntota límite para el caso precedente ( $\nu G\theta_T=1.99$ )

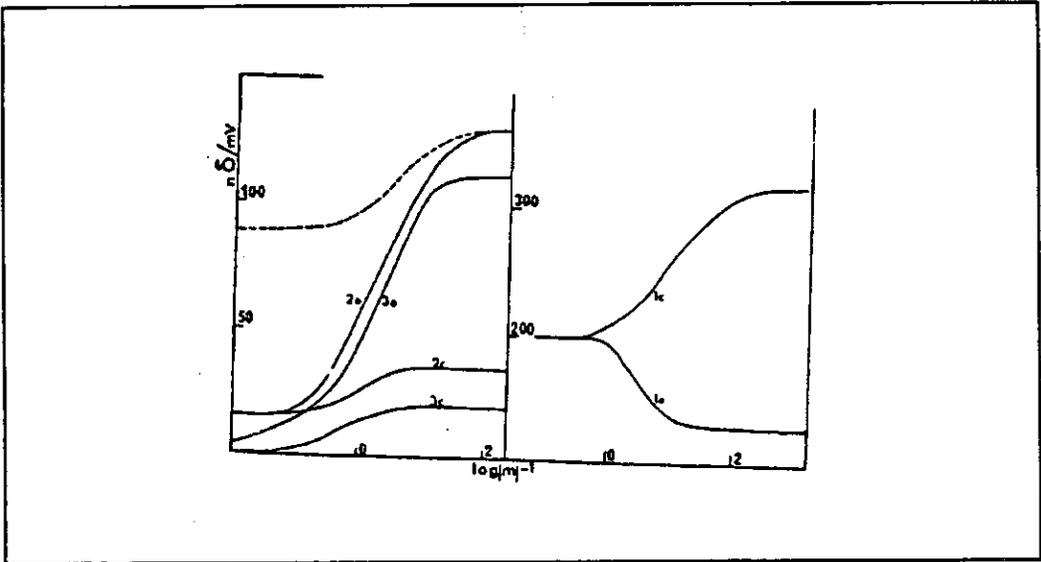


Figura A.17.- Variaciones de la amplitud de pico a 25°C,  $\alpha=0.5$ . Idéntico valor de  $\beta\theta_T$ ,  $\gamma\theta_T$ ,  $\lambda\theta_T$  y  $\mu\theta_T$  que en la figura anterior (---). Valores correspondientes a la isoterma de Langmuir con  $\alpha=0.5$  y  $n=1$ .

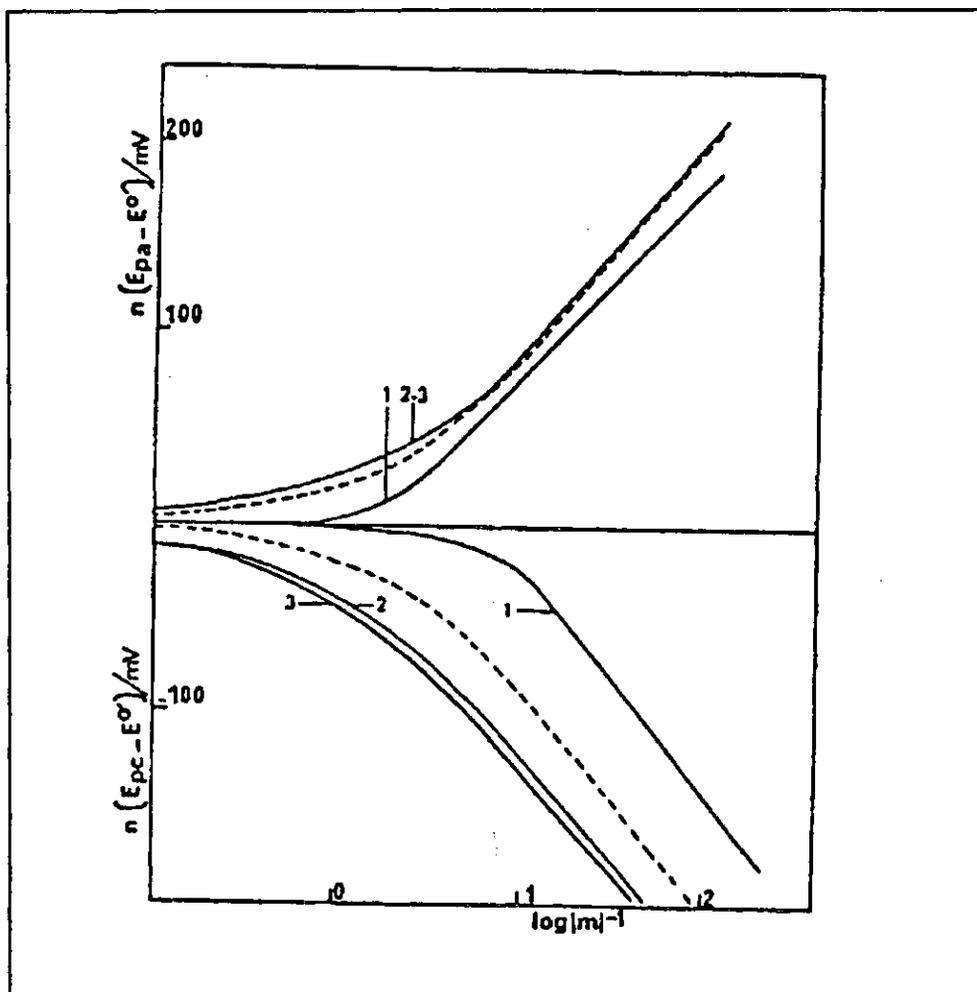


Figura A.18.-  $n(E_{p,c}-E^{\circ})$  y  $n(E_{p,a}-E^{\circ})$  como función de  $\log|m|^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ;  $\alpha=0.5$ ,  $n=1$ .  
 (1)  $\beta\theta_T=-1$ ;  $\gamma\theta_T=1$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  $\nu G\theta_T=-2$ ,  $s=0$ , (2)  $\beta\theta_T=0.75$ ;  $\gamma\theta_T=-0.75$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  
 $\nu G\theta_T=1.5$ ,  $s=0$ , (3)  $\beta\theta_T=0.995$ ;  $\gamma\theta_T=-0.995$ ;  $\lambda\theta_T=\mu\theta_T=0$ ;  $\nu G\theta_T=1.99$ ,  $s=0$ . (---)  
 Valores correspondientes a la isoterma de Langmuir con  $\alpha=0.5$ .

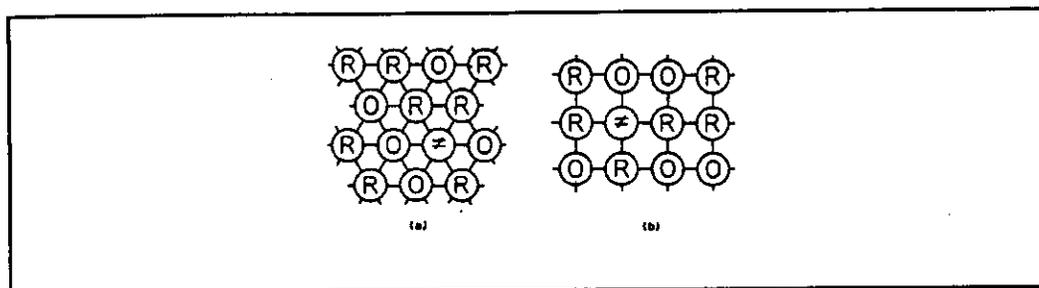


Figura A19.- Modelo de red bidimensional cuasicristalino para a)  $z=6$  y b)  $z=4$ . R, O y  $\neq$  representan las formas reducida y oxidada del par redox y el complejo activado, respectivamente.

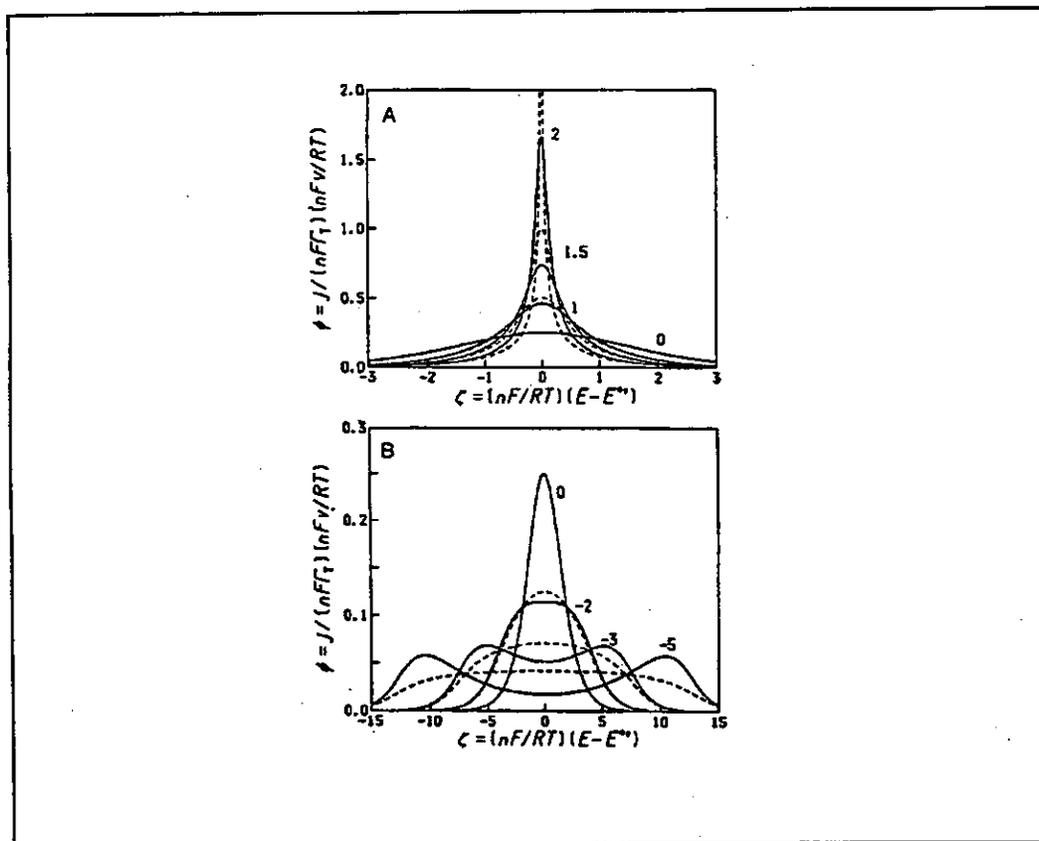


Figura A20.- Dependencia del voltamograma cíclico reversible con el parámetro de interacción  $W/RT$ . Los números de las curvas son los valores de  $W/RT$ . Las curvas continuas son para  $z=6$  y las discontinuas para una distribución al azar ( $z \rightarrow \infty$ ).

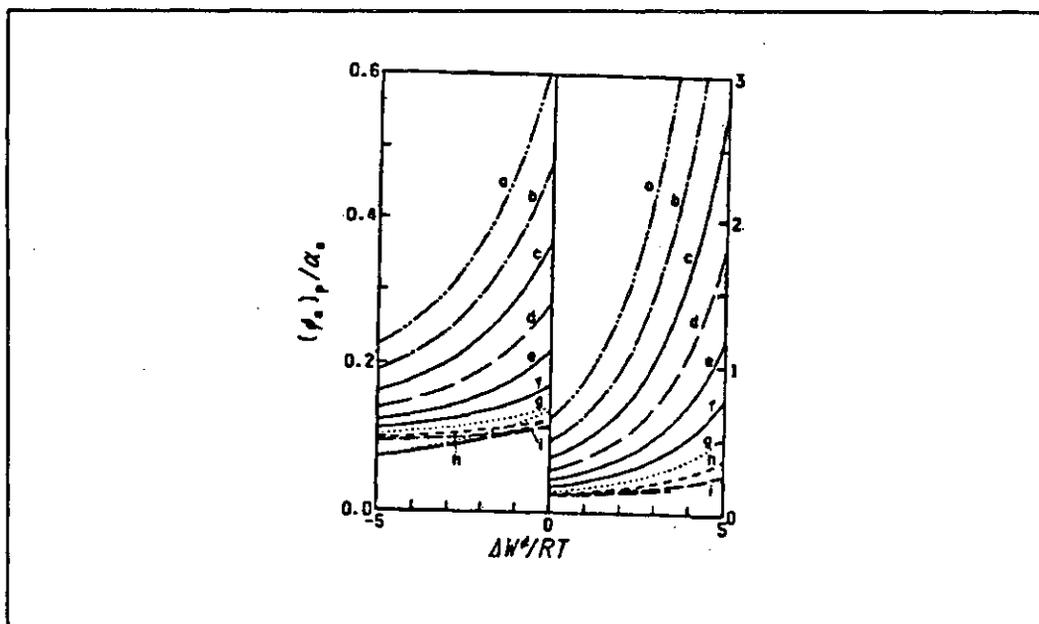


Figura A21.- Dependencia de la corriente de pico anódica reversible con los parámetros  $W/RT$  y  $\Delta W^0/RT$  para  $z=6$ . Los valores de  $W/RT$  son a) 2, b) 1, c) 0, d) -1, e) -2, f) -3, g) -4, h) -5 e i) -6. Las dos curvas para los casos g, h e i indican la presencia de dos picos.

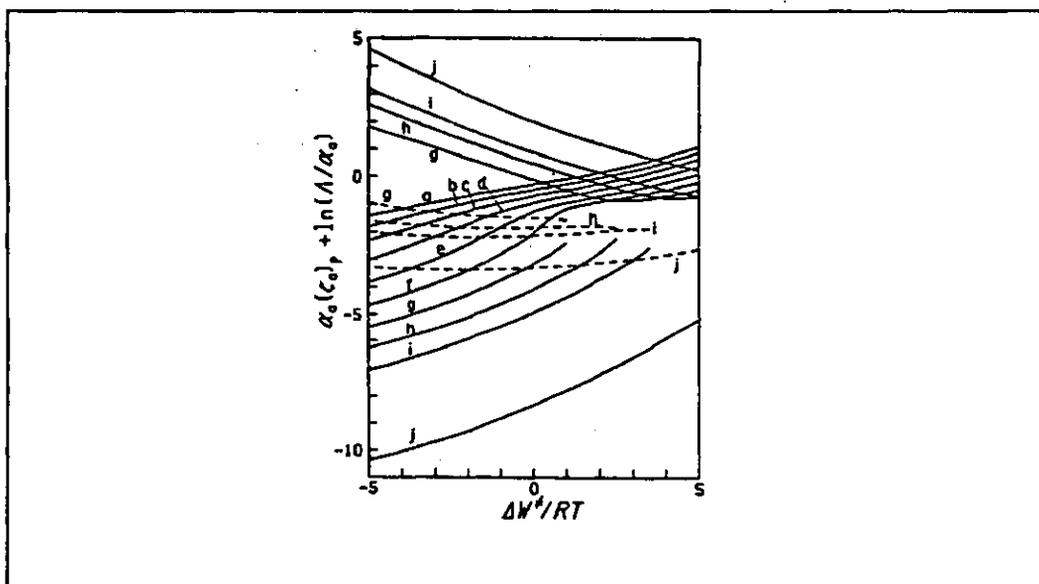


Figura A22.- Dependencia de los potenciales de pico irreversible con los parámetros  $W/RT$  y  $\Delta W^0/RT$  para  $z=6$ . Los valores de  $W/RT$  son a) 2, b) 1, c) 0, d) -1, e) -2, f) -3, g) -4, h) -5, i) -6 y j) -10. Las dos curvas para los casos g, h, i y j indican la presencia de dos picos. Las curvas punteadas indican los potenciales donde las corrientes alcanzan un mínimo.

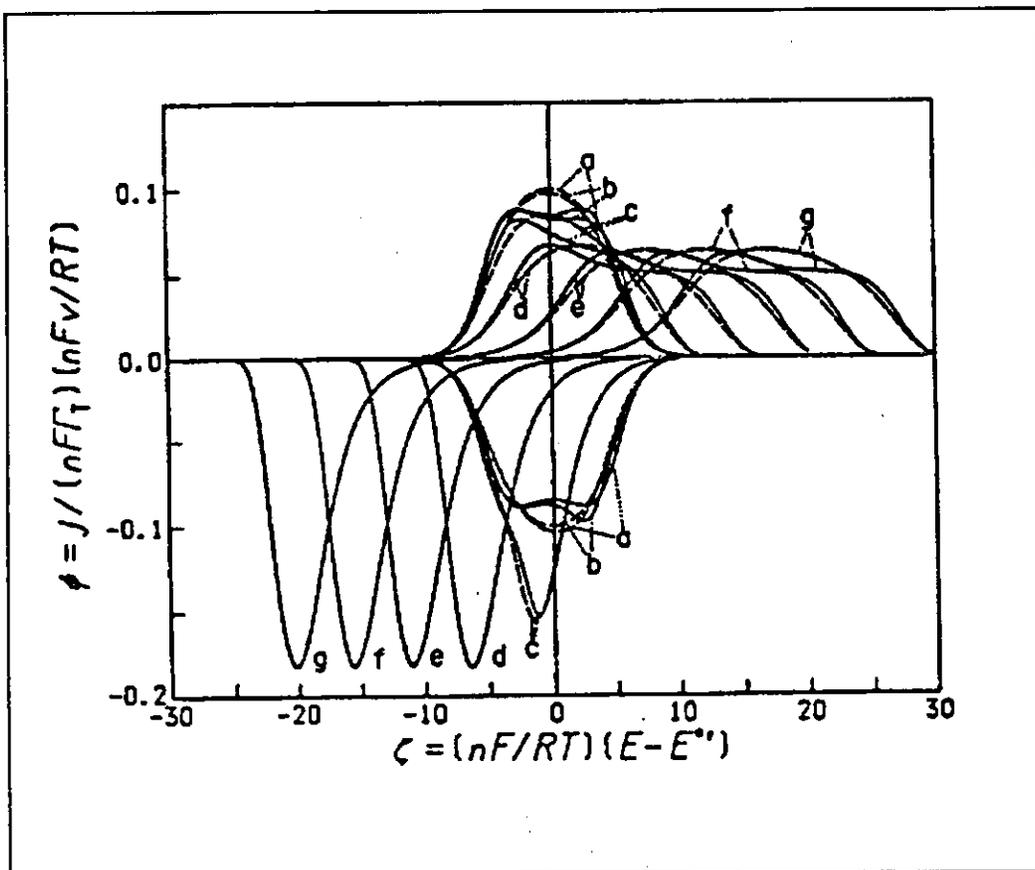


Figura A23.- Voltamogramas cíclicos para  $z=6$  (líneas continuas) y para  $z \rightarrow \infty$  (distribución aleatoria, líneas discontinuas) cuando  $W/RT=-3$ ,  $\Delta W^*/RT=-3$ ,  $\alpha_a = \alpha_c = 0.5$  y  $\Lambda$ : a)  $\infty$ , b) 1, c) 0.1, d)  $10^{-2}$ , e)  $10^{-3}$ , f)  $10^{-4}$  y g)  $10^{-5}$ .

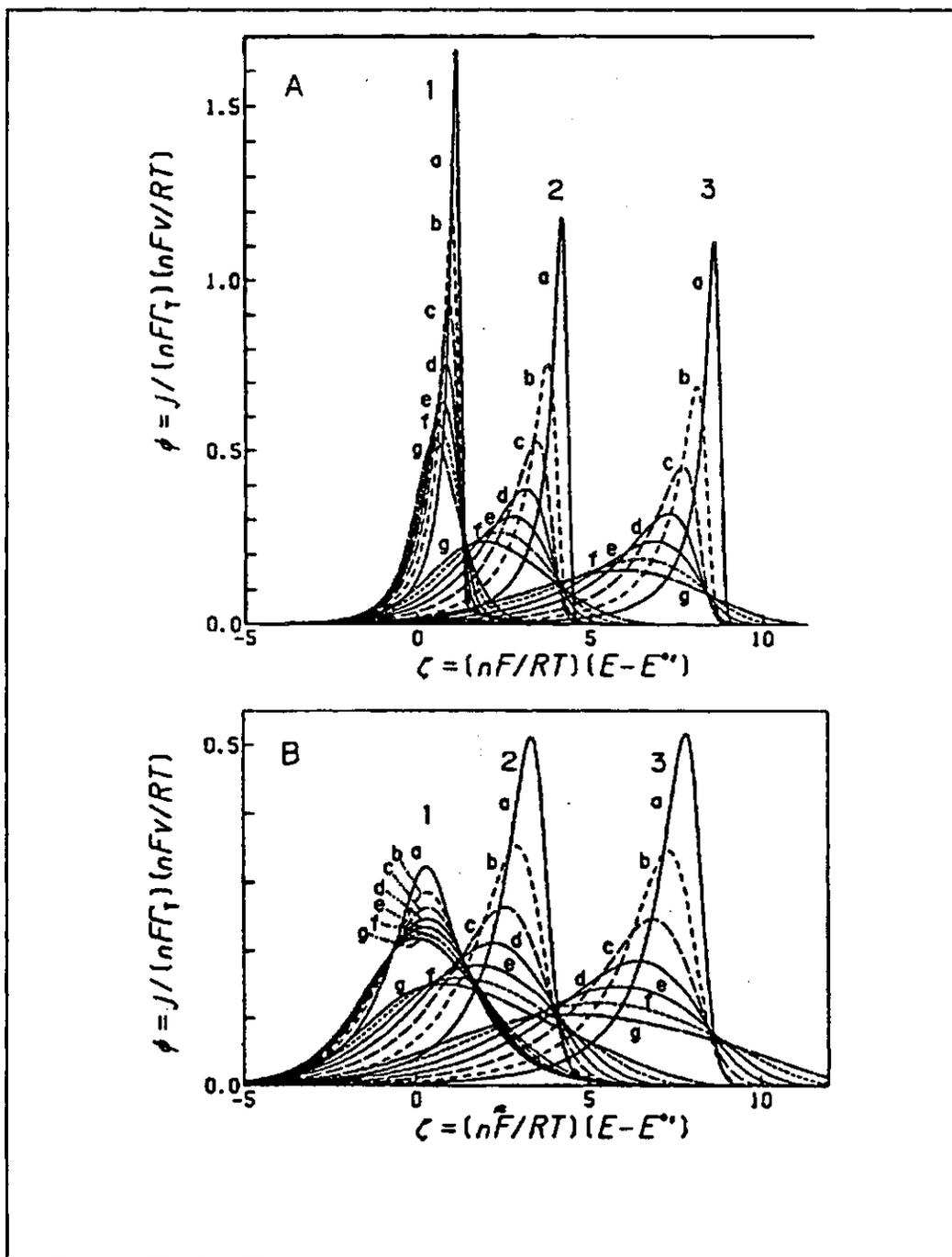


Figura A.24.- Ejemplo de voltamogramas de barrido de potencial directo para  $W/RT=2$  (A) y 0 (B),  $z=6$ ,  $\alpha_s=0.5$ , diferentes valores de  $\Delta W^0/RT$ : a) 3, b) 2, c) 1, d) 0, e) -1, f) -2 y g) -3, y para tres valores de  $\Lambda$ : 1) 1, 2) 0.1 y 3) 0.01.

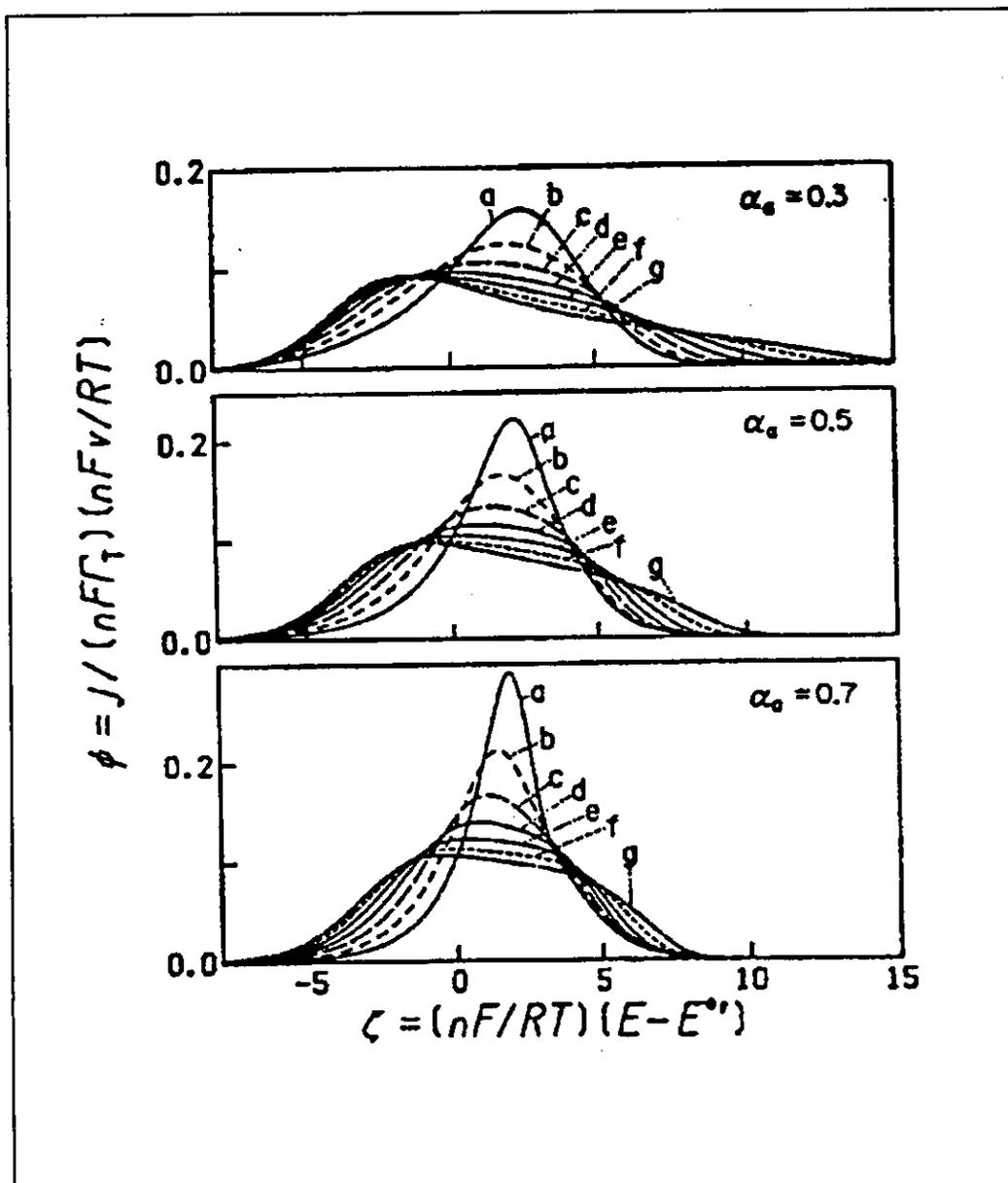


Figura A.25.- Variación de los voltamogramas de barrido de potencial directo con el coeficiente de transferencia de carga  $\alpha_c$  para  $\Lambda=0.1$  y  $W/RT=-2$ , y diferentes valores de  $\Delta W^*/RT$ : a) 3, b) 2, c) 1, d) 0, e) -1, f) -2 y g) -3 y  $z=6$ .

UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Servicio de Bibliotecas



1700757416