

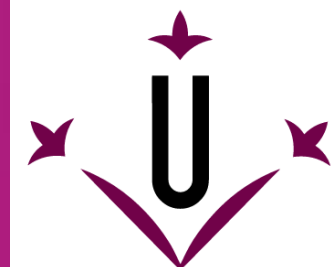
Determinación de la concentración de Zn libre en medios biológicos con la técnica AGNES (Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping).

Presentado por:

Carmen Lucia López Solis

Supervisores:

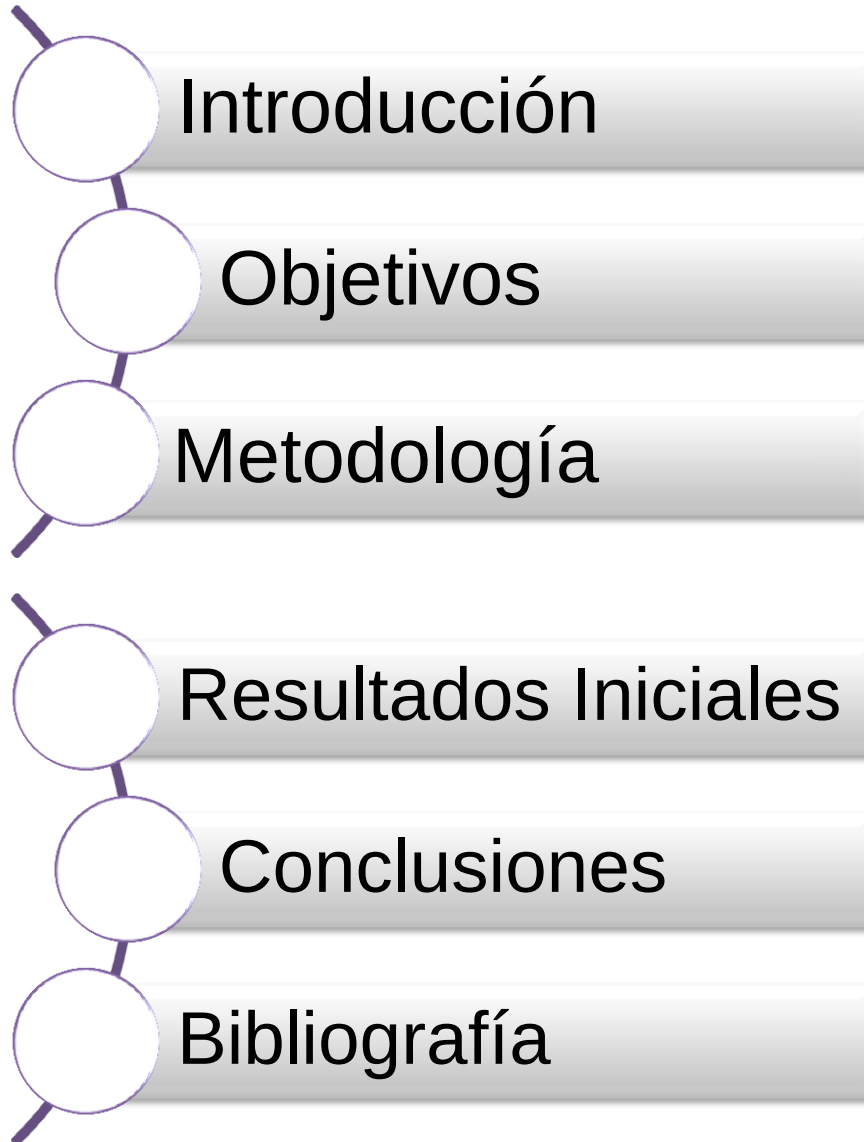
**Dr. Josep Galceran Nogués
Dra. Encarna Companys Ferran**

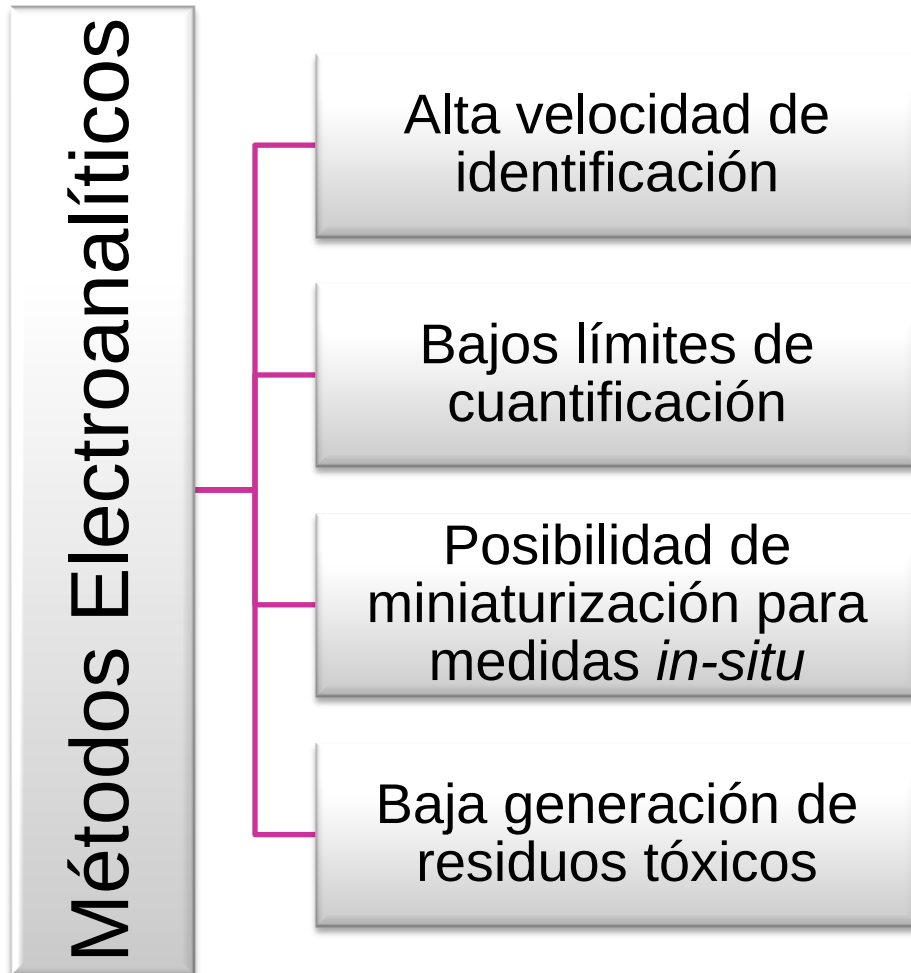


**Universitat
de Lleida**



Contenido

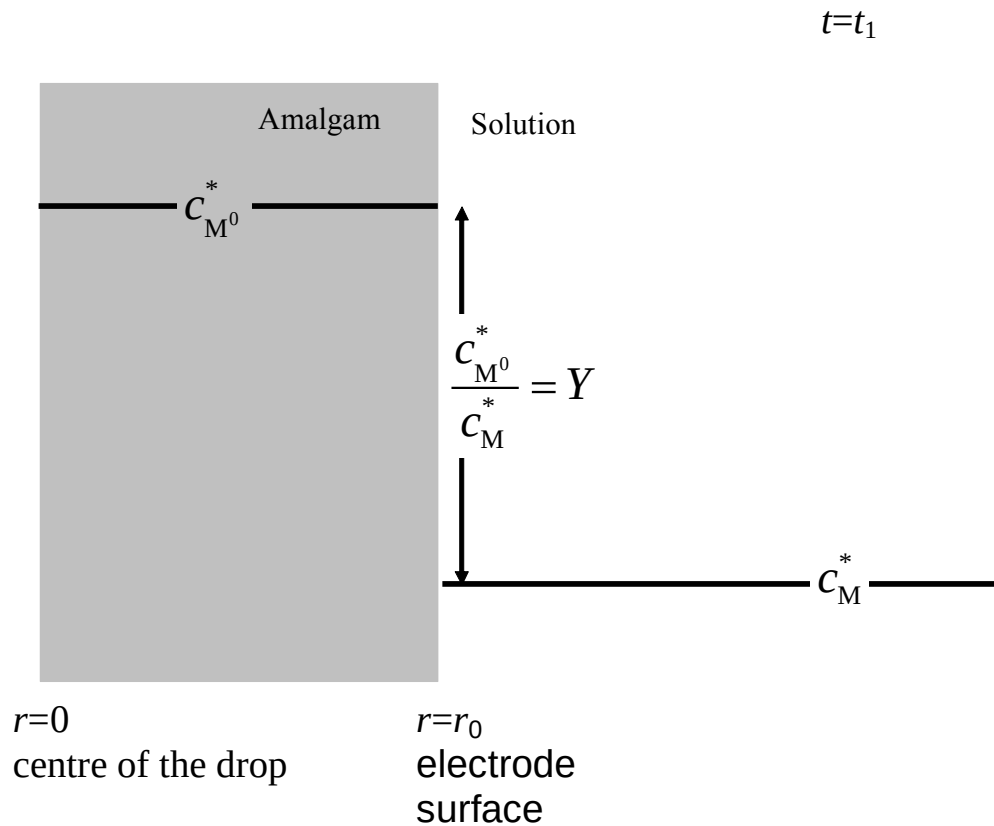




AGNES
(Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping).

AGNES

1^{RA} ETAPA: Preconcentración



E_1 con tiempo suficiente t_1 : $M + n e^- \rightarrow M^0 (\text{Hg})$

Ecuación de Nernst:

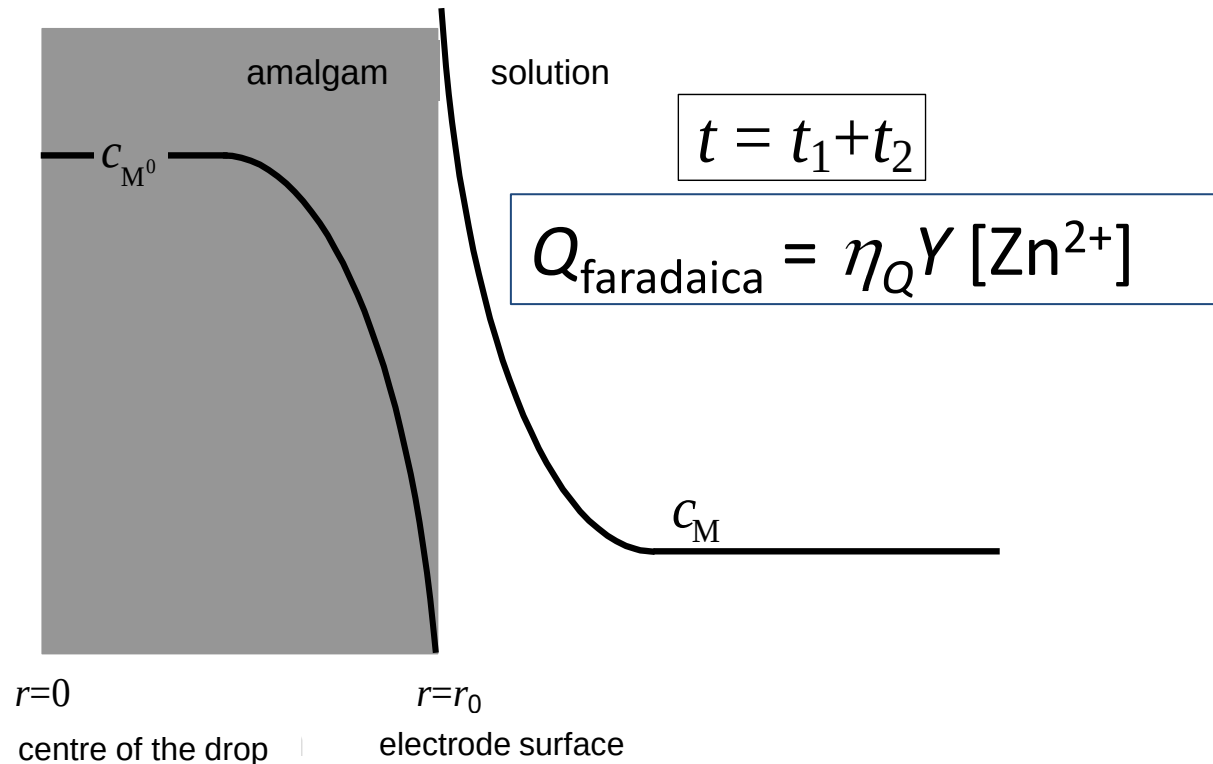
$$Y = \frac{c_{M^0}^*}{c_M^*} = \exp \left[-\frac{nF}{RT} E_1 - E^{o'} \right]$$

Ganancia

AGNES

2^{da} ETAPA: Cuantificación

E_2 dif. lim. y medida de I en t_2 fijo: $M^0 - n e^- \rightarrow M^{n+}$



Variantes de AGNES

AGNES-I

AGNES-Q

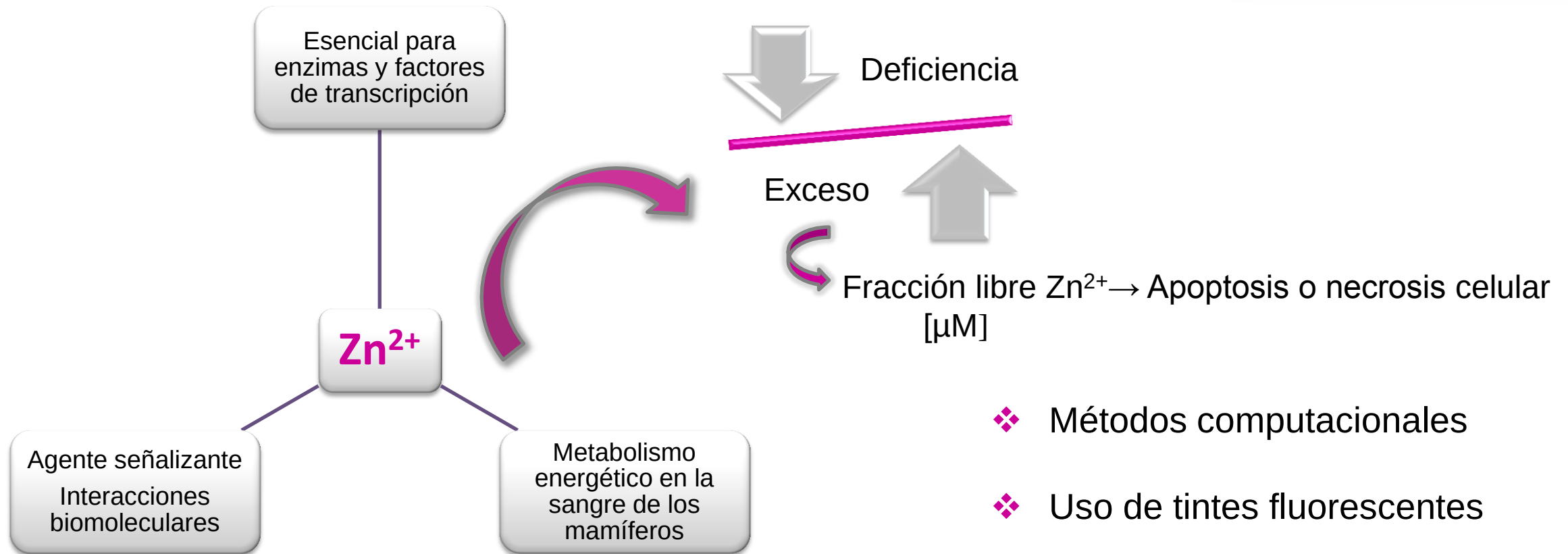
AGNES-SCP

Electrodos

HMDE

RDE

Introducción



Objetivos

Objetivo General

Cuantificar la concentración de Zn libre en medios biológicos con la técnica AGNES

Objetivos Específicos

- ❖ Establecer las condiciones en AGNES → Cuantificar la fracción libre de Zn^{2+} → Sistema biológico tipo Zn Albúmina.
- ❖ Evaluar diferentes electrodos → Electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE)
Electrodo de disco rotatorio con película de mercurio (RDE-TMF) → Nafion.
- ❖ Abordar sistemas con más relevancia biológica → Suero fetal bovino (FBS)
Plasma sanguíneo
- ❖ Se evaluará la capacidad de colorantes → Zinquín, TSQ o TFL

Establecer las condiciones para obtener $[Zn^{2+}]$ en el medio biológico

t , Y , T , $[Zn^{2+}]$, pH, tipo de electrodo.

Zn^{2+} + ALBÚMINA
+ FFA

$[Zn^{2+}]$ y [proteína (albúmina)] fija + [FFA] variable.

Colorantes como el Zinquin, TSQ o TFL

Funcionamiento y limitaciones.

Comparar .

Ventajas o desventajas de los métodos considerados.

[Zn²⁺] en
medio
biológico

AGNES-I con HMDE. Trayectoria

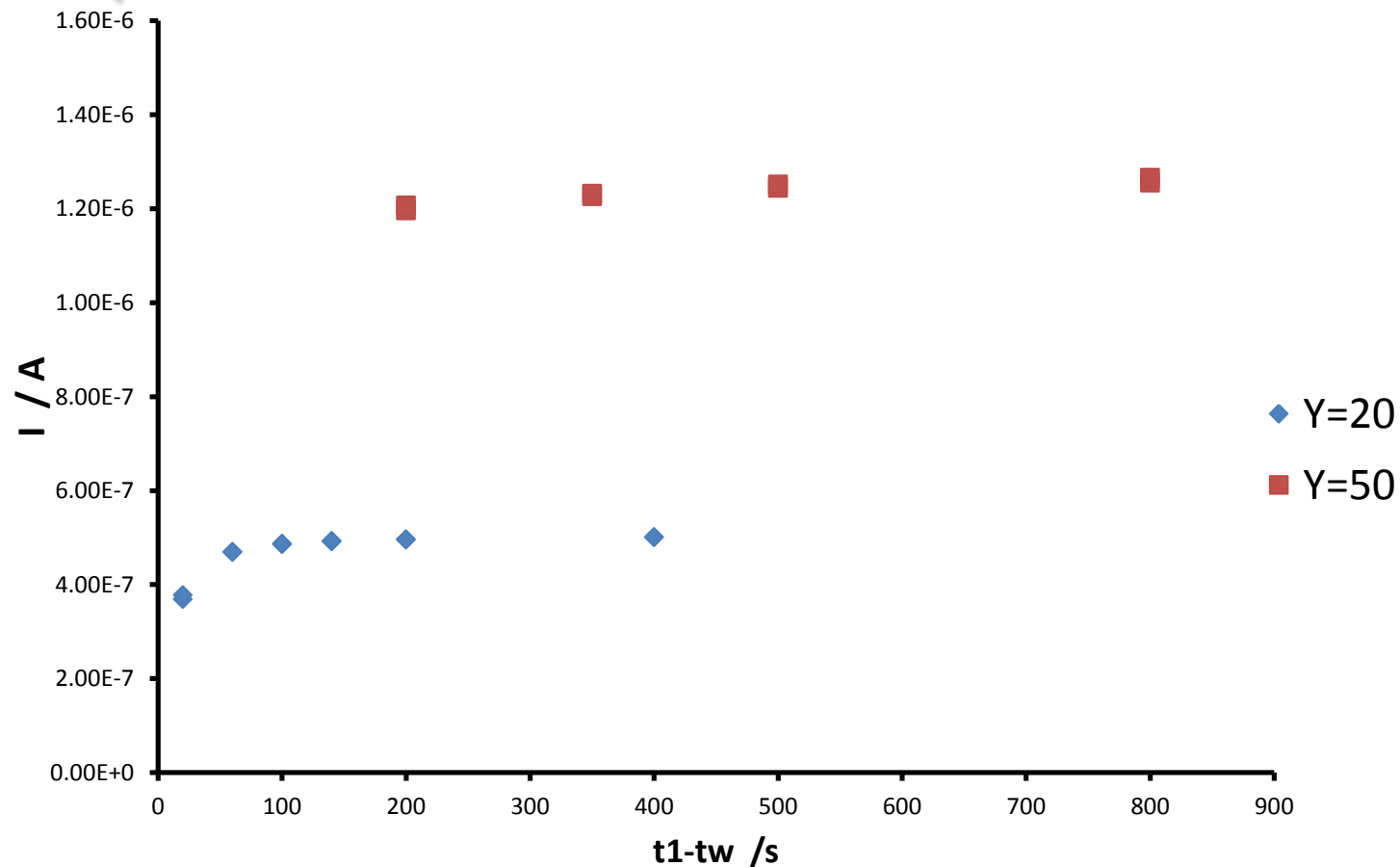


Figura 2. AGNES-I en Zn²⁺ $1.80 \cdot 10^{-6}$ M + KNO₃ 0.15 M, pH 4.5

Resultados

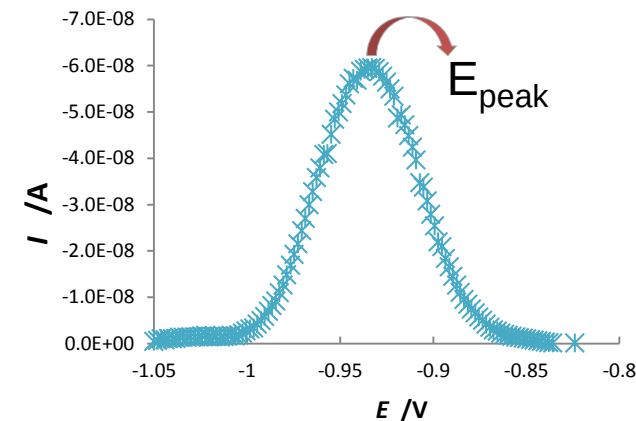


Figura 1. Polarografía Diferencial de Pulso (DPP) en Zn²⁺ $1.07 \cdot 10^{-5}$ M + KNO₃ 0.15 M, pH 4.5

AGNES-I con HMDE. Calibración y Validación

[Zn²⁺] en medio biológico

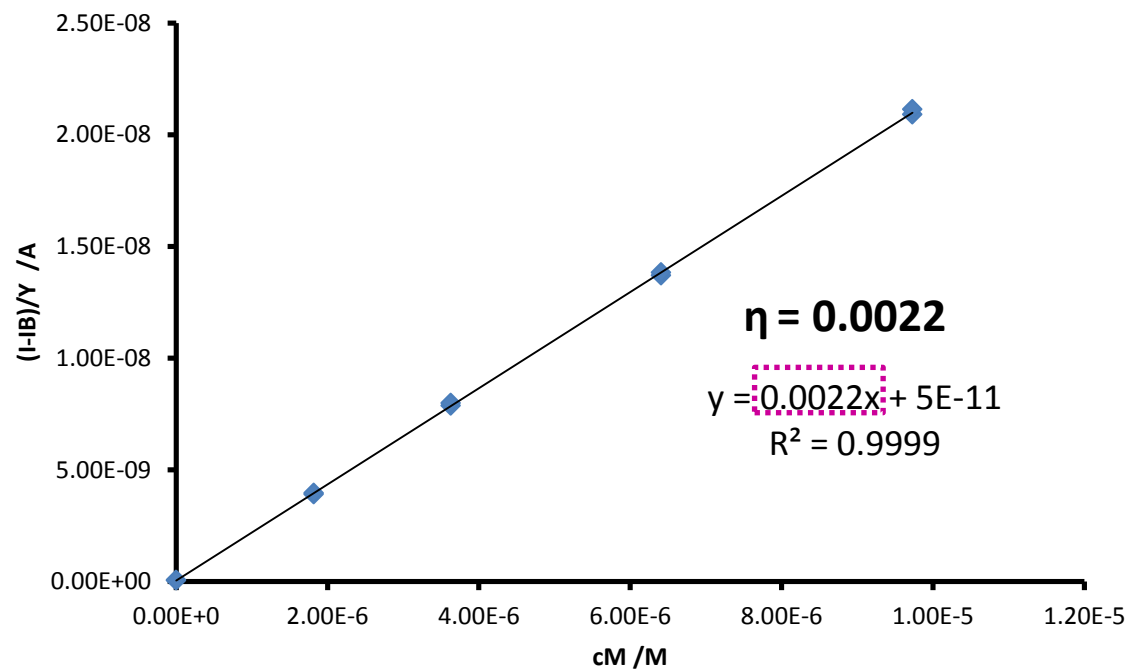


Figura 3. Curva de calibración.

Resultados

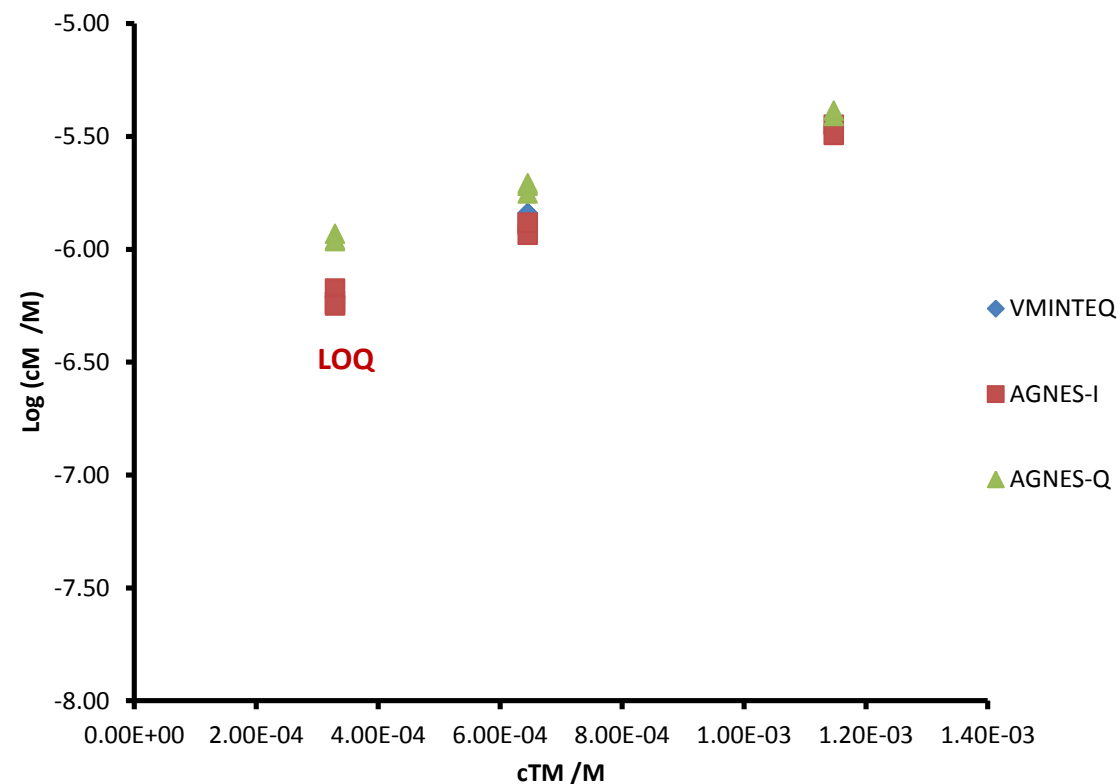


Figura 4. Zn²⁺ + Oxalato de potasio con AGNES-I, AGNES-Q y con VMINTEQ. Y=10, t₁-t_w=100 s

[] —

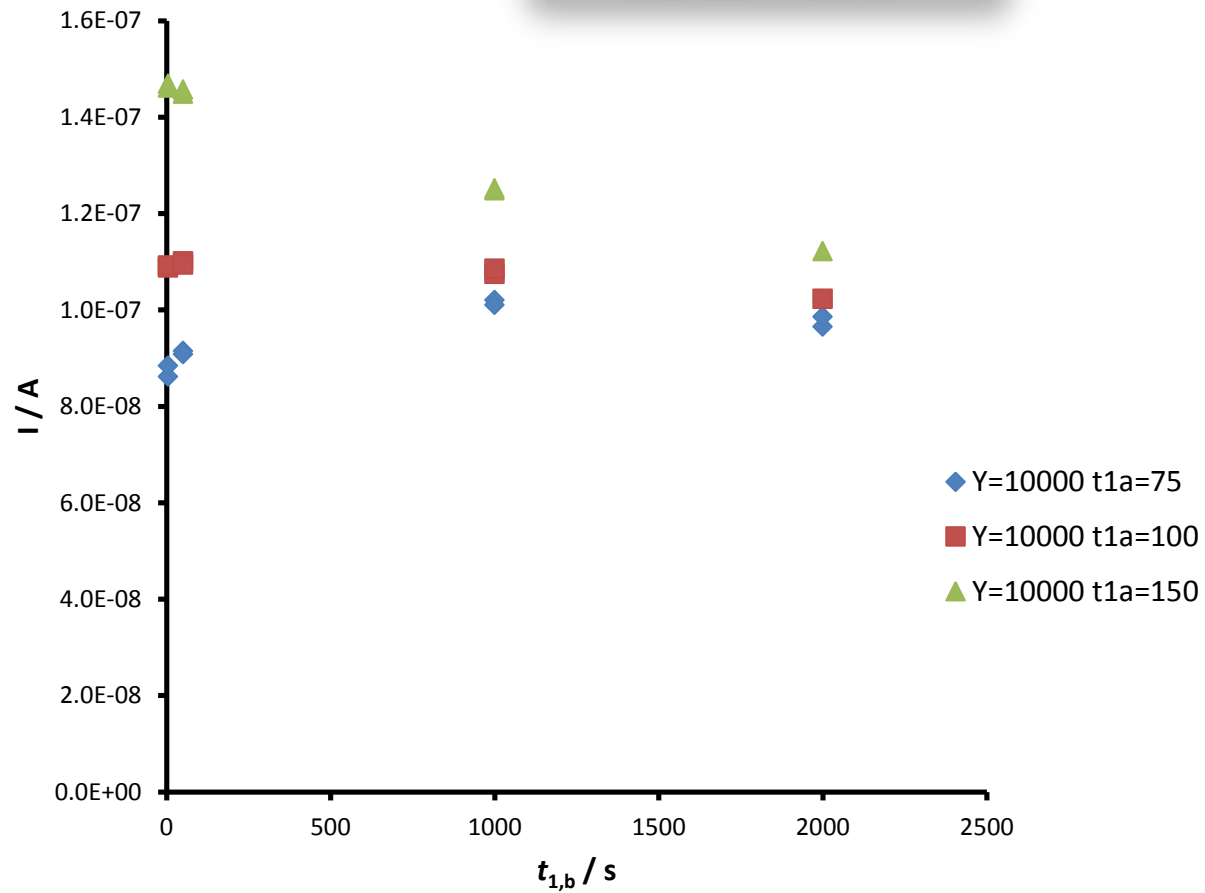
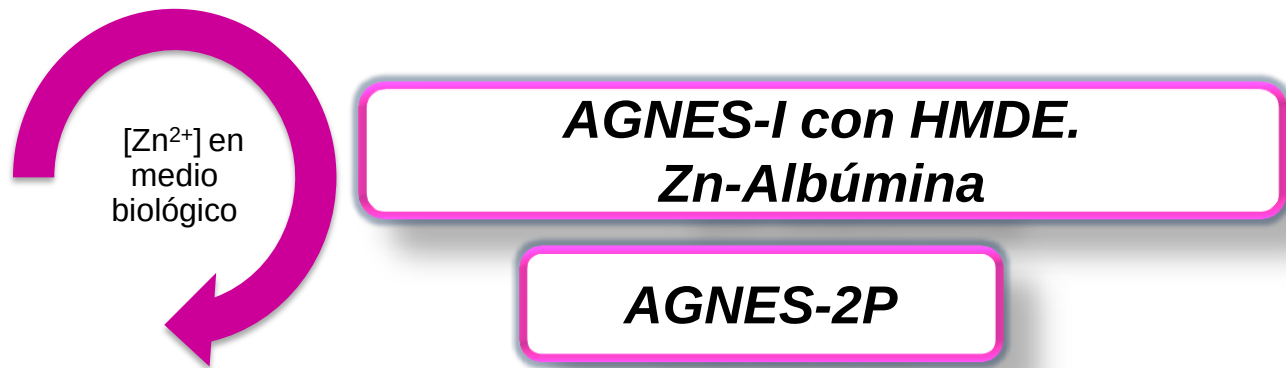


Figura 5. Medidas hasta 2000 s, con Y=10000 de Zn²⁺ 20 μ M en KNO₃ 0.15 M, MOPS 0.045 M y BSA 600 μ M pH = 7.

Resultados

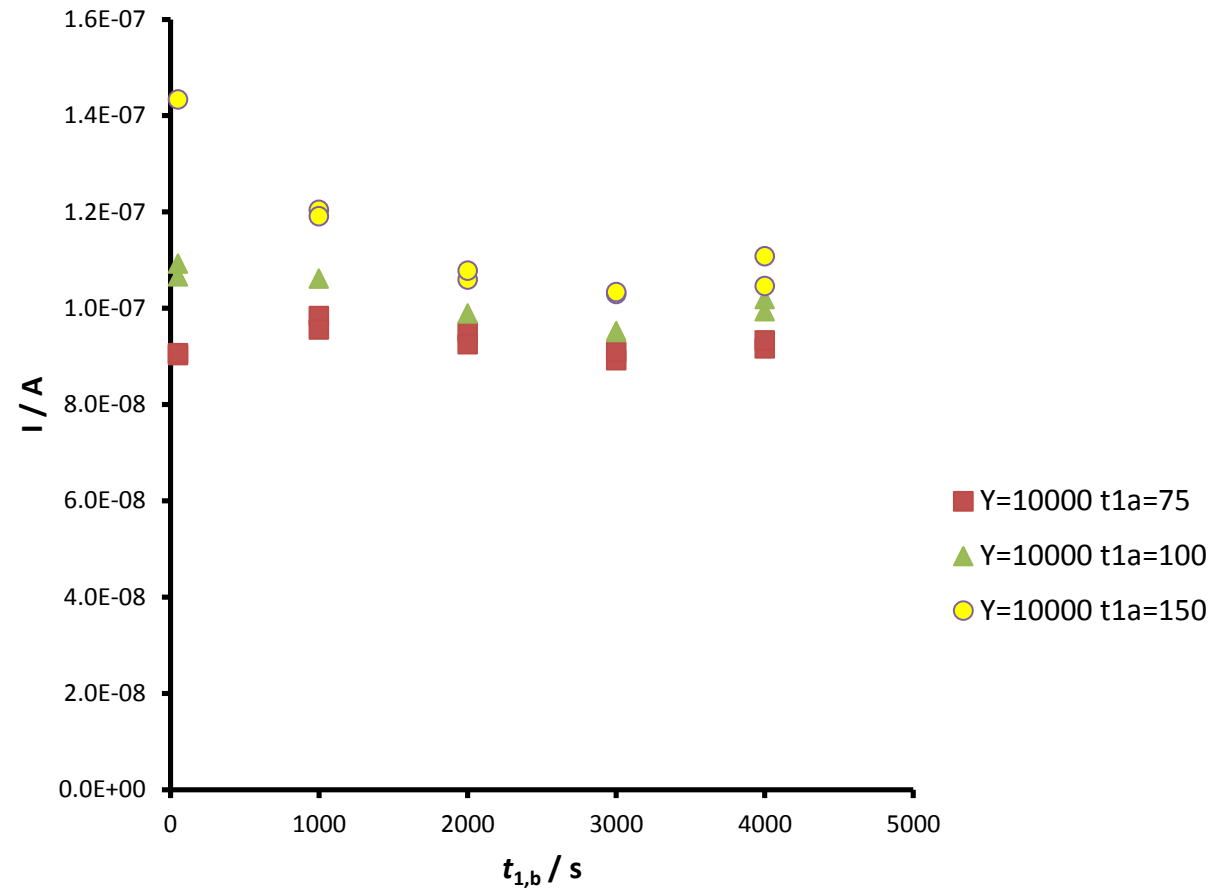


Figura 6. Medidas hasta 4000 s, con Y=10000 de Zn²⁺ 20 μ M en KNO₃ 0.15 M, MOPS 0.045 M y BSA 600 μ M pH = 7.



AGNES-SCP (Stripping Chronopotentiometry) con RDE-TMF

Resultados

— (s/V) vs E (V) → τ

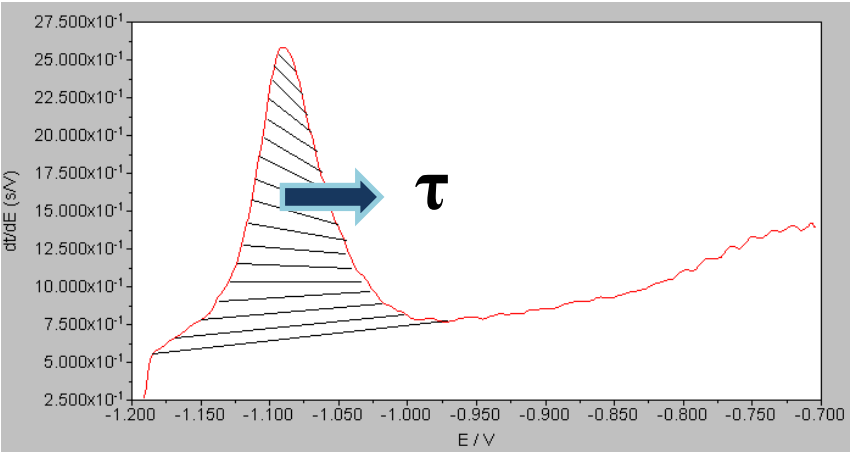


Figura 7. Lectura típica en AGNES-SCP

➤)

➤ [] —

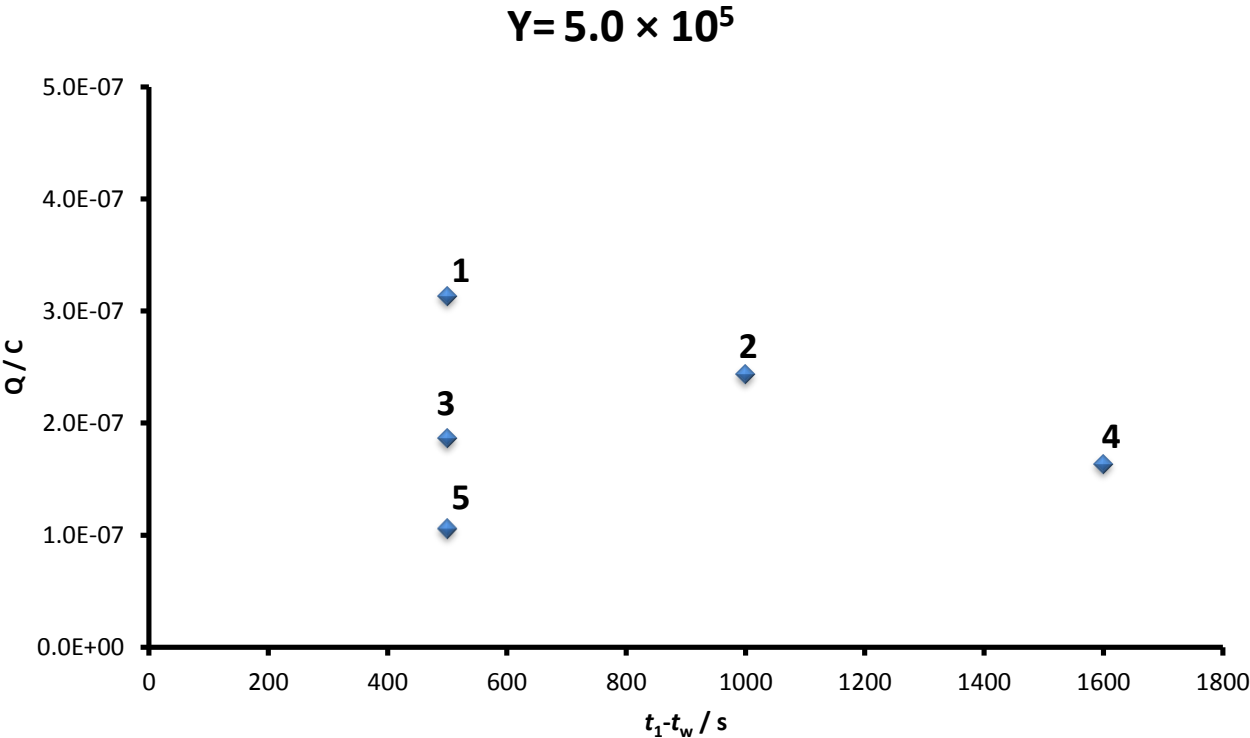


Figura 8. Medidas en Zn²⁺ 20 μ M + KNO₃ 0.15 M + MOPS 0.045 M + BSA 600 μ M pH = 7.

[Zn²⁺] en el medio biológico

AGNES-SCP con RDE-TMF-Nafion

1

Pulir el electrodo GC con alúmina 0.3 μm . Lavar con etanol y agua y sonicar por 2 min

2

Pre-tratamiento electroquímico con un barrido voltamperométrico (x50 ciclos) entre -0.8 V y +0.8 V a 0.1 V s⁻¹ con NH₄Ac 1.0 M y HCl 0.5 M

3

Sobre la superficie del electrodo adicionar 10 μL de Nafion 0.4 %.

4

Evaporar el solvente por 20 min. Secar a 50 °C aprox. por 2 min

5

Depositar el mercurio con un potencial de -1.3 V por 420 a 1000 rpm, con Hg(NO₃)₂ 0.24 mM en HNO₃ 0.15M

6

Determinar la carga asociada al Hg depositado. Barrido lineal con $v = 0.005 \text{ Vs}^{-1}$ desde -0.15 V a +0.4 V con NH₄SCN 1 M (pH = 4.5).

Resultados

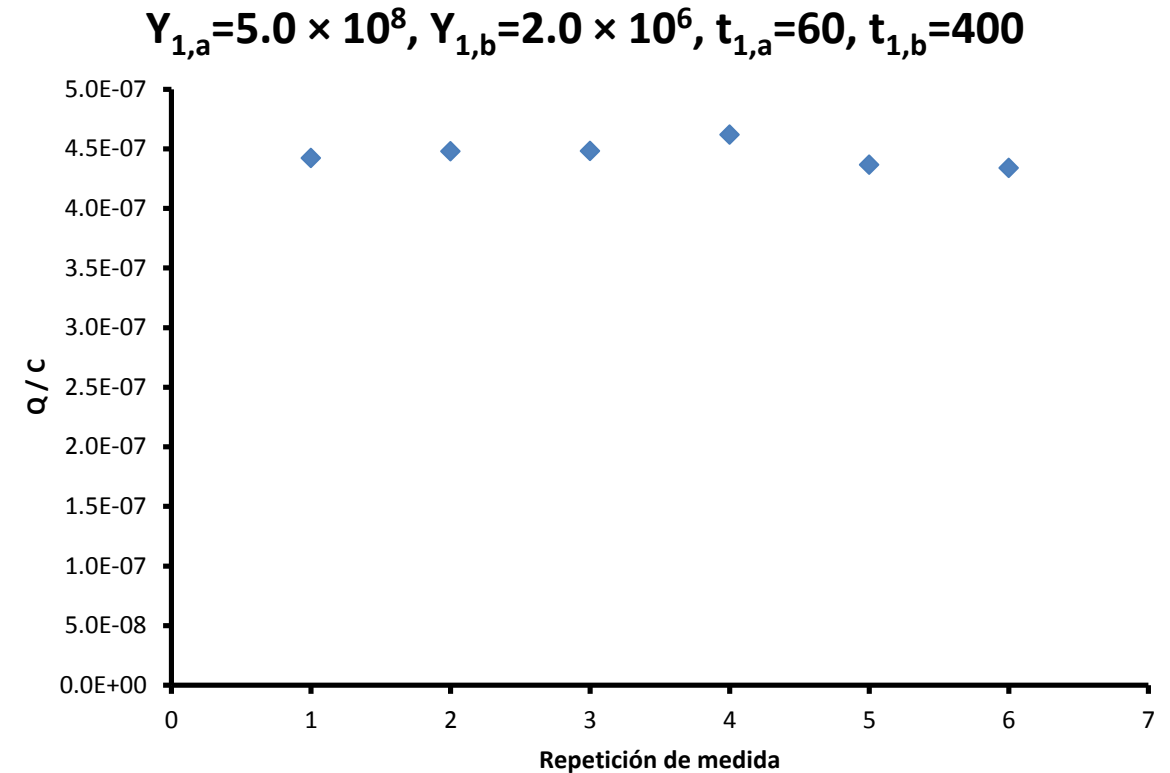
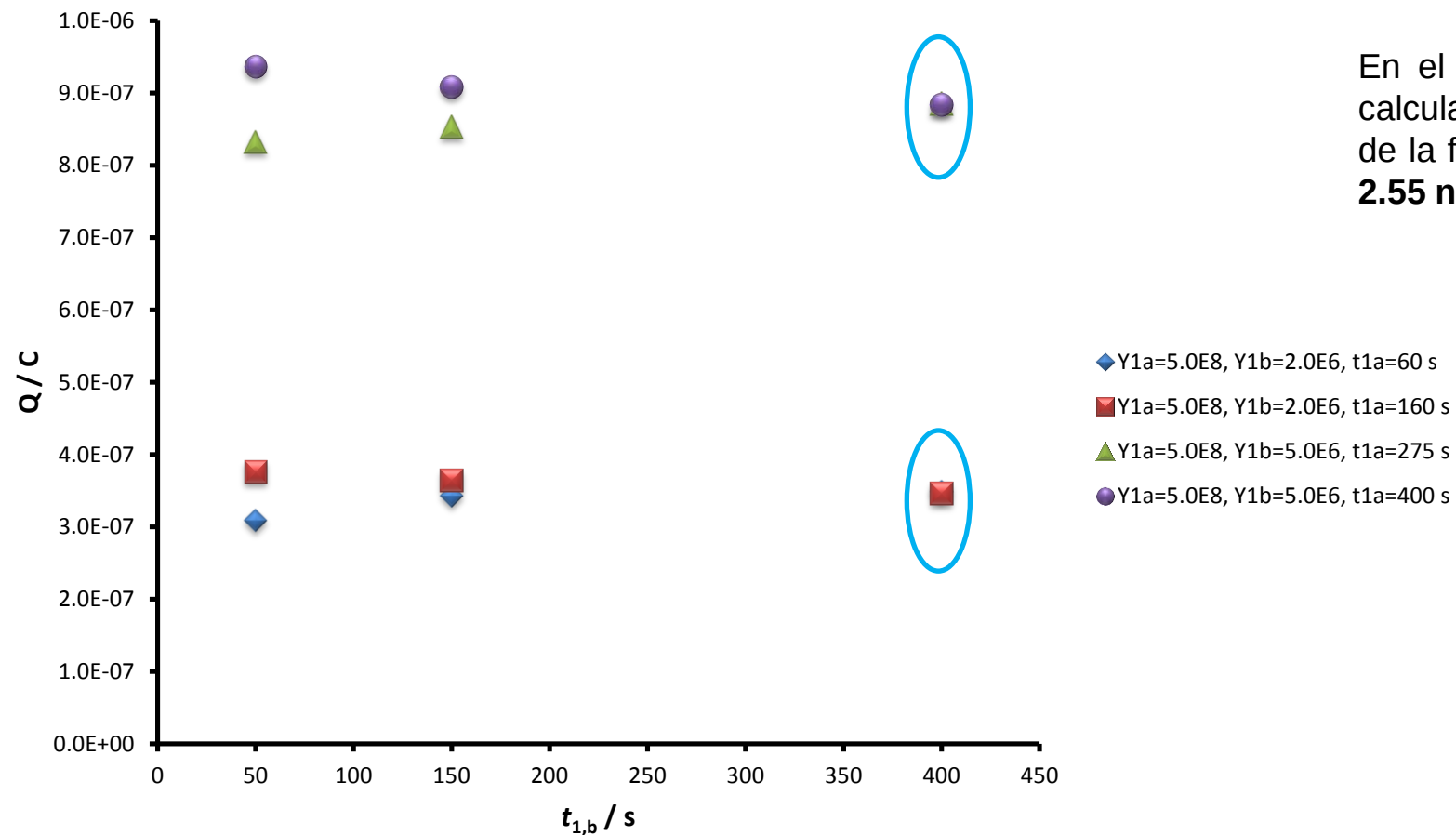


Figura 9. Repeticiones de la medida de la solución de Zn²⁺ 20 μM + KNO₃ 0.15 M + MOPS 0.045 M + BSA 600 μM pH = 7

[Zn²⁺] en
medio
biológico

AGNES-SCP con RDE-TMF-Nafion. Zn-Albúmina.

Resultados



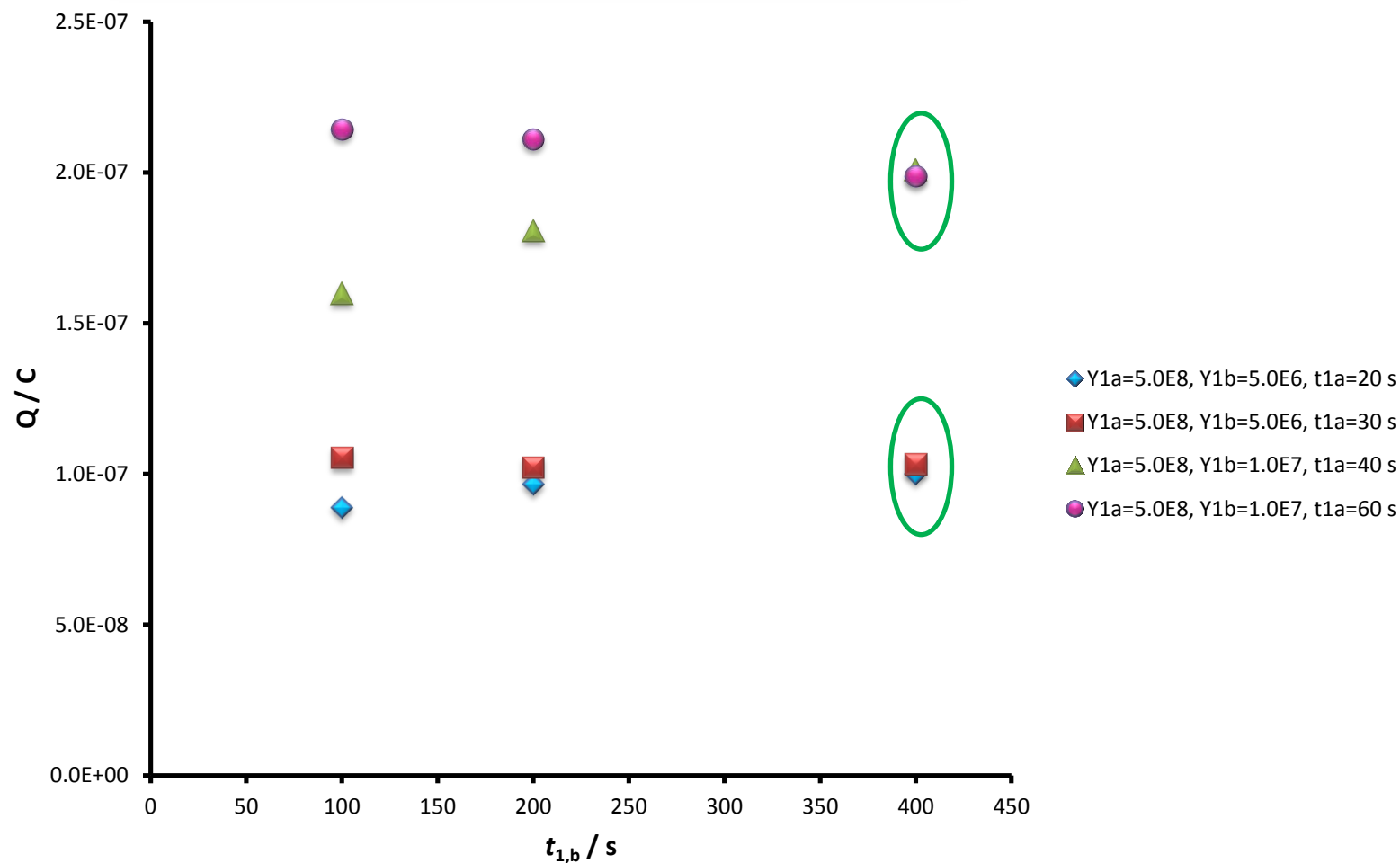
En el punto de equilibrio, se calcula que la concentración de la fracción libre de Zn²⁺ es **2.55 nM**

Fig 10. Medidas en la muestra de 600 μ M BSA + 20 μ M Zn²⁺ + MOPS 0.045 M + KNO₃ 0.15 M, pH = 7.0

[Zn²⁺] en
medio
biológico

AGNES-SCP con RDE-TMF-Nafion. Suero Fetal de Bovino (FBS).

Resultados



En el punto de equilibrio, se calcula que la concentración de la fracción libre de Zn²⁺ es **0.25 nM**

Fig 11. Medidas en la muestra de FBS. Cambio de pH en la muestra de 7.4 a 8.4

[Zn²⁺] en
medio
biológico

AGNES-SCP con RDE-TMF-Nafion. Suero Fetal de Bovino (FBS).

Resultados

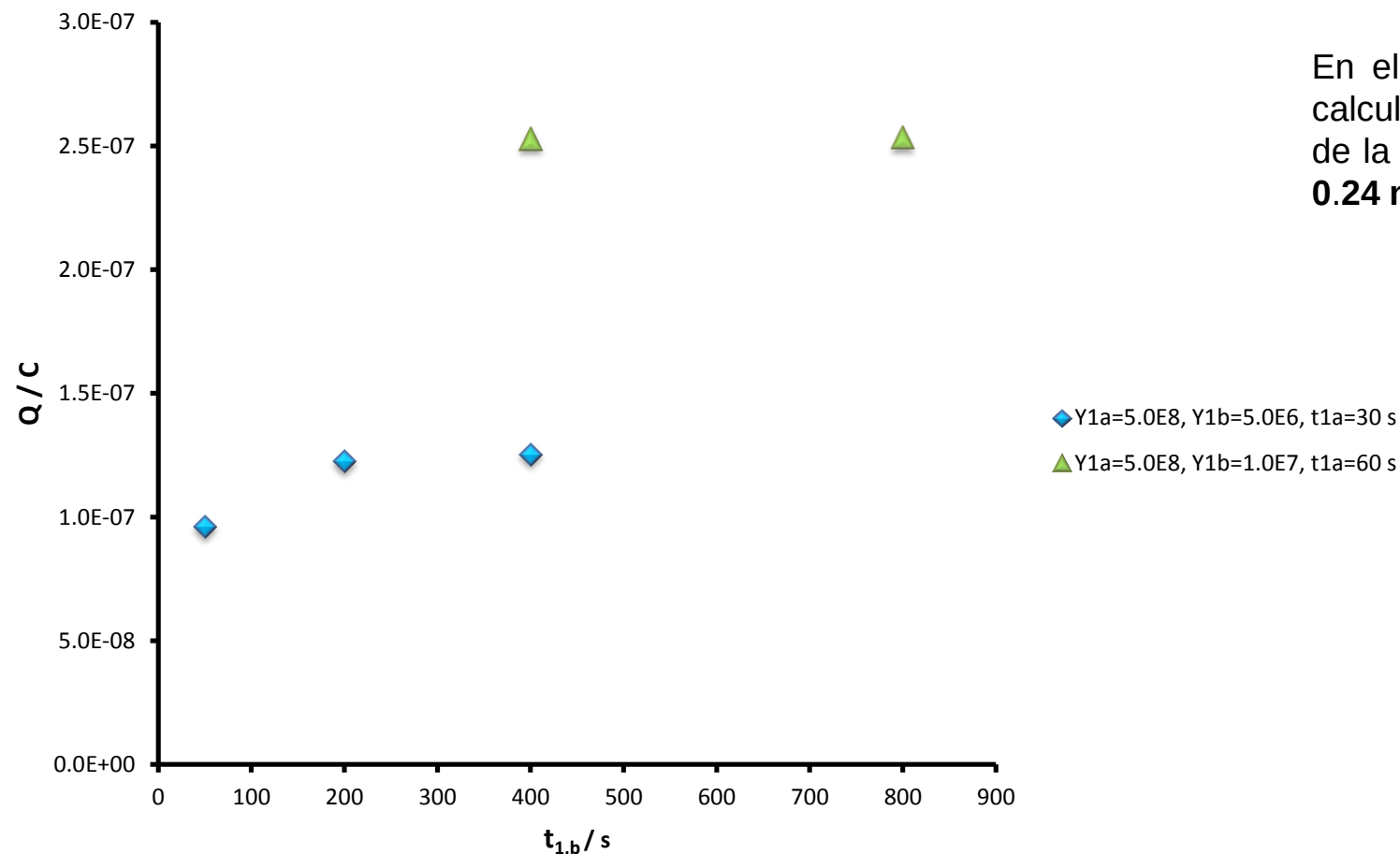


Fig 12. Medidas en la muestra de FBS + MOPS 0.08 M. pH 7.2

Conclusiones

Con la técnica electroanalítica AGNES-SCP-2P, con el electrodo RDE-TMF-Nafion se logra cuantificar la fracción libre de $\text{Zn}^{2+} = 2.55 \text{ nM}$ en el medio tipo Zn-Albúmina ($\text{Zn}^{2+} 20 \mu\text{M}$, $\text{KNO}_3 0.15 \text{ M}$, $\text{MOPS} 0.045 \text{ M}$ y $\text{BSA} 600 \mu\text{M}$ $\text{pH} = 7$).

Con la técnica electroanalítica AGNES-SCP-2P, con el electrodo RDE-TMF-Nafion se logra cuantificar la fracción libre de $\text{Zn}^{2+} = 0.25 \text{ nM}$ en el medio biológico de FBS

Bibliografía

- [1] Vardhan, K., Kumar, P., Panda, R. (2019). A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids*. 290, 111-137.
- [2] Allen, J.B., Faulkner, L.R. (2001). *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*. New York: Wiley, 2nd Ed.
- [3] Galceran, J., Companys, E., Puy, J., Cecilia, J., Garces, J. (2004). AGNES: anew electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration. *Journal of electroanalytical chemistry*. 566, 95-109.
- [4] Galceran, J., Lao, M., David, C., Companys, E., Castro-Rey, C., Salvador, J., Puy, J. (2014). The impact of electrodic adsorption on Zn, Cd and Pb speciation measurements with AGNES. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 722-723, 110-118.
- [5] Prasad, A.S. (2014). Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *Journal of trace Elements in Medicine and Biology*. 28, 357-363.
- [6] Krezel, A., Maret, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 611, 3-19.
- [7] Coverdale, J., Khazaipoul, S., Arya, S., Stewart, A., Blindauer, C. (2019). Crosstalk between zinc and free fatty acids in plasma. *BBA-Molecular and cell Biology of lipids*. 1864, 532-542.