

Artículo original

Más acerca del comportamiento electroquímico de la dopamina con el pH del medio electrolítico.

More about of the electrochemical behavior of dopamine with the pH of electrolytic medium.

Menolasina Sabino.

Departamento de Análisis y Control, Laboratorio de Investigaciones Electroquímicas, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido febrero 2014 - Aceptado septiembre 2014

RESUMEN

El comportamiento electroquímico de la dependencia de la oxidación de la dopamina (DA) con el pH fue estudiado usando un electrodo de carbón vítreo modificado electroquímicamente (CVMEQ) en medio ácido, usando la técnica de voltamperometría cíclica (VC) variando la velocidad de barrido de potencial. Se encontró que el potencial redox de la DA $\left(E_{redox} = \frac{E_{p_{oxid}} + E_{p_{red}}}{2} \right)$ es inversamente proporcional al pH, lo cual indica que la DA sufre un proceso de deprotonación. A medida que aumenta el pH, la reacción electroquímica de oxidación de la DA se va haciendo más reversible. Sin embargo a valores de $pH \geq 6$ el producto de la oxidación electroquímica de la DA, la dopaminoquinona (DAQ) experimenta una reacción de adición de Michael la cual consiste en una reacción de ciclización que da origen a la formación de dopaminocromo. Este proceso puede ser confirmado por VC a velocidades de barrido $< 50 \text{ mV s}^{-1}$.

PALABRAS CLAVE

Electrooxidación de Dopamina, dopa-minocromo, Electrodo de carbón vítreo modificado.

ABSTRACT

The electrochemical behavior of the dependence of Dopamine (DA) oxidation upon pH variation has been studied at an electrochemically modified glassy carbon (GCEQM) in acidic medium, using cyclic voltammetry, at different potential sweep rates. The

DA redox potential $\left(E_{redox} = \frac{E_{p_{oxid}} + E_{p_{red}}}{2} \right)$ was found to be inversely proportional to pH values, indicating that DA deprotonates. As pH increases, the electrooxidation of DA becomes more reversible. However at $pH \geq 6$, the species produced in this reaction, the dopaminoquinone (DAQ) undergoes an addition reaction Michaelis, which consists of a reaction of cyclization that leads to formation of dopaminochrome. This can be confirmed by VC at potential sweep rates $< 50 \text{ mV s}^{-1}$.

KEY WORDS

Dopamine electrooxidation, dopaminochrome, modified glassy carbon electrode.

INTRODUCCIÓN

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendocrina. La variación en la concentración de este neurotransmisor en ciertas regiones del cerebro puede dar origen a una variedad de enfermedades, tales como, la enfermedad de Parkinson [1], esquizofrenia [2] y epilepsia [3]. En pacientes portadores de la enfermedad de Parkinson [1], existe una disminución importante en el contenido de dopamina en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen). Actualmente se considera que los efectos de la transmisión dopaminérgica sobre los comandos motores pueden reflejar acciones combinadas de la

dopamina en el neuroestriado, en la sustancia negra reticulada y en el núcleo subtalámico [4-6]. La esquizofrenia se cree que podría estar relacionada con alteraciones específicas de la transmisión dopaminérgica [2]. Mientras que la epilepsia, en base a diversas observaciones clínicas, podría ser un síndrome de hipoactividad dopaminérgica, con disminución de la transmisión mesolímbica en particular [3].

El desarrollo de métodos analíticos que puedan ser implementados en la detección y cuantificación de DA en el análisis clínico de muestras provenientes de diferente regiones del cerebro, permitirá no sólo avanzar en la comprensión de la función de los sistemas dopaminérgicos, sino también diseñar nuevas estrategias farmacológicas que incidan en la terapéutica de los diferentes procesos patológicos que son causados por la pérdida o disminución de este neurotransmisor.

La DA se oxida fácilmente en un intervalo de potencial donde el medio electrolítico no se descompone. Sin embargo la determinación electroquímica de DA es complicada debido a la interferencia de varias sustancias electroactivas que pueden estar presentes con la DA en el medio de reacción [7]. Además, la capacidad buffer del medio electrolítico puede afectar el comportamiento electroquímico de la DA [8].

En el líquido extracelular del sistema nervioso central, el nivel de concentración de DA es tres órdenes de magnitud menor que la de ácido ascórbico (AA) y además el AA se oxida a potenciales cercanos al propio potencial de oxidación de la DA [7,9]. Por otro lado el comportamiento electroquímico de la DA y del AA depende de la concentración de la solución reguladora de pH utilizada como medio electrolítico cuando esta concentración no es lo suficiente alta para neutralizar los protones producidos en la oxidación electroquímica de dichas sustancias [8]. En diversos trabajos publicados utilizan un determinado electrodo modificado electroquímicamente para separar las señales de oxidación de la DA y del AA [10-12]. El tratamiento electroquímico de electrodos de carbón vítreo a través de la aplicación de programas de potenciales de oxidación conduce a la formación de grupos funcionales sobre la superficie del mismo. Este tipo de modificación ha permitido la determinación de sustancias de interés biológico [11] y la determinación simultánea de DA, AA y ácido úrico (AU) [12]. Otro tipo de modificación consiste en aplicar un potencial lo suficientemente positivo $\geq +1,5$ V durante un tiempo determinado a un electrodo de grafito pirolítico en presencia de DA en buffer fosfato a $\text{pH} \geq 6$ para inducir la formación de una película de melanina

sobre la superficie electródica de carbón vítreo, a través de una reacción de polimerización entre compuestos (entre ellos el dopaminocromo) que se originan como consecuencia de reacciones químicas y electroquímicas que experimenta el producto de la oxidación electroquímica de la DA, la dopaminoquinona (DAQ) en presencia de iones hidrogeno fosfato (HPO_4^{2-}). Esta modificación electroquímica permitió la determinación simultánea de DA, AA y AU [13].

Otros investigadores por el contrario hacen uso de la señal de reducción electroquímica del dopamino-cromo, producto que se forma por la actividad enzimática de la enzima tirosinasa sobre la oxidación de la DA para la determinación indirecta de dicha sustancia a potenciales menos positivos a los potenciales de oxidación de los interferentes como el AA [14,15].

En algunos trabajos relacionados con la oxidación electroquímica de la DA, se pudo observar que en soluciones buffer $\text{pH} \geq 6$, dependiendo de la concentración del buffer [8] o del sensor electroquímico utilizado [13-15] o del tipo de celda utilizada [16], aparece una señal de reducción electroquímica cerca de $-0,2$ V, correspondiente a la reducción de dopaminocromo, mientras que a $\text{pH} < 6$ la formación de este compuesto no se detecta.

En este trabajo se estudia el comportamiento electroquímico de la oxidación de la DA con el pH del medio electrolítico y con la velocidad de barrido por VC utilizando un electrodo de CVEQ con la finalidad de analizar las condiciones bajo las cuales la formación de dopaminocromo es posible o no y su efecto sobre el proceso redox de la DA

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos por VC se realizaron utilizando una celda de vidrio de un compartimiento y tres electrodos. Un electrodo de Ag/AgCl (sat) fue utilizado como electrodo de referencia y un alambre de platino como electrodo secundario. Como electrodo de trabajo se utilizó un disco ($d = 3\text{mm}$) de carbón vítreo (CV) modificado electroquímicamente (CVMEQ). El electrodo de CV fue pulido con diferentes grados de alúmina ($0,3$ y $0,05 \mu\text{m}$) provenientes de la Buehler usando agua desionizada como lubricante. Posterior a dicha limpieza mecánica, el electrodo de CV fue modificado electroquímicamente por VC en una solución $0,1\text{M}$ de ácido perclórico (HClO_4) aplicando un determinado número de ciclos consecutivos en una ventana de potencial entre 0 y $1,8$ V.

Los experimentos de VC se realizaron utilizando

un potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12. Todo el material de vidrio fue lavado inicialmente con detergente y abundante agua desionizada. Los reactivos fueron de grado analítico y utilizados sin ningún tratamiento adicional de purificación.

RESULTADOS

Las figuras 1 y 2 muestran la respuesta electroquímica de los electrodos de CV y CVMEQ en solución reguladora acético/acetato pH 4,3 (Fig. 1) y en solución reguladora acético/acetato pH 4,3 + 1×10^{-3} M de iones ferrocianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$), Fig. 2A y 2B.

En la figura 3 se pueden observar las estructuras de las especies predominantes de la DA en diferentes intervalos de pH de acuerdo a resultados reportados por Menolascina y col (2009) [14].

El comportamiento electroquímico de la DA (1×10^{-4} M) con el electrodo modificado CVMEQ a diferentes valores de pH utilizando como medios electrolíticos soluciones reguladoras de ácido acético/acetato (pH = 3,6; 4,1; 4,6; 5,8; 6,1 y 6,7) y fosfato (pH = 7,1) está ilustrado en las figuras 4A y 4B.

En la figura 5, se muestra la reacción de oxidación electroquímica de la DA.

El comportamiento electroquímico del pico de oxidación de la DA y de los picos de reducción de la DQA y dopaminocromo a pH > 6 se muestra en las figuras 6A y 6B.

En la figura 7, se muestran las reacciones que experimenta la DAQ a pH > 6.

En las figuras 6 y 7, se muestran el comportamiento electroquímico de la DA y de las especies electroactivas que se originan a pH 6,7 en función de las velocidades de barrido.

DISCUSIÓN

El electrodo CVMEQ presenta una mayor área activa con respecto al electrodo de CV sin modificar (Fig. 1 y 2).

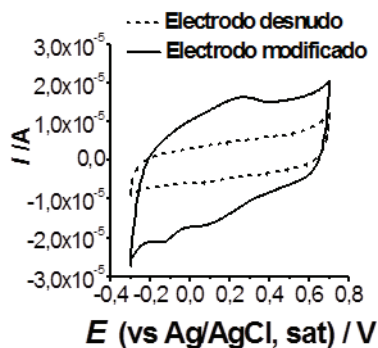


Fig. 1. Respuesta electroquímica en solución reguladora ácido acético/acetato pH 4,3 a $0,2 \text{ V s}^{-1}$ de los electrodos sin modificar (CV) y modificado electroquímicamente (CVMEQ).

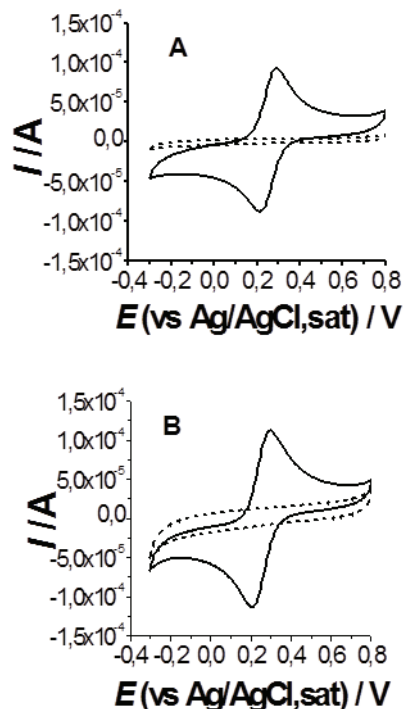


Fig. 2. Respuesta de la oxidación electroquímica del ión ferrocianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) en solución reguladora ácido acético/acetato pH 4,3 a $0,2 \text{ V s}^{-1}$: A) con el electrodo de carbono vítreo sin modificación electroquímica; B) con el electrodo CVMEQ.

El Factor de Rugosidad (FR) y el área real (A_{Real}) de estos electrodos fueron determinados a partir de las ecuaciones 1 y 2:

$$FR = \frac{I_{pa(\text{exp})}}{I_{pa(\text{teórico})}} \quad (1)$$

$$A_{\text{Real}} = FR \times A_{\text{Geométrica}} \quad (2)$$

Donde $I_{pa(\text{exp})}$ es el valor de corriente del pico de oxidación del ión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ que se obtiene al sustraer de la corriente del pico de oxidación de ión, la corriente de fondo obtenida con el mismo electrodo en solución blanco (solución reguladora acético/acetato pH 4,3) a partir de los datos en las figuras 2A y 2B e $I_{pa(\text{teórico})}$ es la corriente que se calcula a partir de la ecuación de Randles-Sevcik:

$$i_{pa(\text{teórico})} = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} D^{1/2} \nu^{1/2} AC \quad (3)$$

Donde n es el número de electrones transferidos, D es el coeficiente de difusión del ión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), v es la velocidad de barrido ($0,2 \text{ Vs}^{-1}$), A es el área geométrica del electrodo de CV sin modificar ($0,2376 \text{ cm}^2$) y C es la concentración de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$).

De las figuras 2A y 2B se tiene que los valores experimentales de I_{pa} son $9 \times 10^{-5} \text{ A}$ para el electrodo sin modificar y $10 \times 10^{-5} \text{ A}$ para el electrodo EQMEQ. De la ecuación (1), $I_{pa}(\text{teórico})$ es igual a $7,87 \times 10^{-5} \text{ A}$. Por lo tanto los FR del electrodo sin modificar y el electrodo CVMEQ son 1,14 y 1,27 respectivamente y las áreas reales de dichos electrodos fueron de $0,2708 \text{ cm}^2$ para el electrodo sin modificar y $0,3019 \text{ cm}^2$ para el electrodo CVMEQ. Estos resultados muestran que la superficie del electrodo CVMEQ es más rugosa que la del electrodo sin modificar.

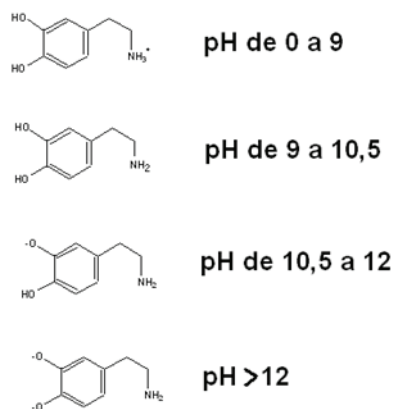


Fig. 3. Estructuras químicas de la Dopamina presentes a diferentes pH.

En los voltamperogramas representados en la figura 4A se observa un descenso en los potenciales de pico de la pareja DA/DAQ al aumentar el pH de 3,6 a 7,1. Este comportamiento es atribuido a la generación de iones hidrógeno durante la reacción de oxidación de la DA (Fig. 5). Por ello, un aumento del pH de la disolución favorece la oxidación de la DA y como consecuencia, los potenciales disminuyen. Esto se corrobora al observar que ΔE_p ($E_{p_{oxid}} - E_{p_{red}}$) disminuye a medida que se incrementa el pH haciéndose más reversible el proceso redox de la DA. A partir de los datos obtenidos de la figura 4A se construyó

un grafico de $\left(E_{redox} = \frac{E_{p_{oxid}} + E_{p_{red}}}{2} \right)$ vs. pH, observándose un comportamiento inversamente proporcional del E_{redox} con el pH (figura 4B). La relación entre el E_{redox} y el pH cumple con la ecuación lineal: $E_{redox} = 0,587 - 0,0544 \text{ pH}$.

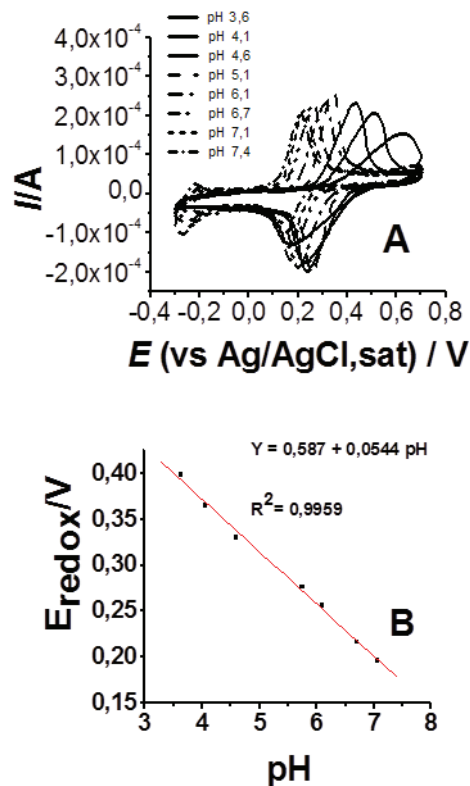


Fig. 4. A) Familia de voltamperogramas cíclicos de DA $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ en solución reguladora a diferentes pH, con el electrodo CVMEQ, $v = 0,2 \text{ V s}^{-1}$; B) V_{redox} vs pH, a partir de los datos en figura 4A.

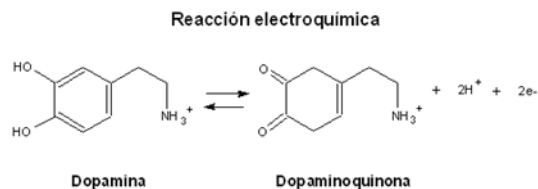


Fig. 5. Oxidación electroquímica de la Dopamina.

De la figura 6A se puede observar que, a medida que se aumenta el pH, por encima de 6, comienza a desarrollarse un pico de reducción a $-0,2 \text{ V}$ (pico 3), el cual es atribuido a la reacción de reducción del dopaminocromo que se origina bajo esas condiciones de pH. A medida que se incrementa el pH, la carga parcial positiva de la molécula DA comienza a disminuir debido al proceso de desprotonación que comienza a experimentar la molécula. A $\text{pH} > 6$, el grupo amino de la molécula DAQ (producto de la oxidación electroquímica de la DA) se desprotona experimentando una reacción de adición 1,4 de Michael, la cual resulta en una reacción de ciclización

que da origen a la formación de dopaminocromo (Fig. 7). Da Silva et al [13] consideraron que la reacción de ciclización es favorecida por las especies fosfatos presentes en la solución buffer utilizada como medio electrolítico. En el presente trabajo se utilizaron diferentes soluciones buffer (ácido acético/acetato y fosfato) y con ambas se observó que al incrementarse el pH por encima de 6,1, el pico de la reducción de dopaminocromo comienza a aparecer, lo que es indicativo de que una reacción química ocurre indistintamente del tipo de anión presente en el medio electrolítico cuando el $\text{pH} > 6$, la cual se origina posiblemente como consecuencia de la desprotonación del grupo amino de la DAQ. A medida que aumenta el pH la desprotonación de la DQA se ve favorecida produciéndose una reacción de ciclización que da origen al dopaminocromo, por ende se observa una disminución del pico de reducción de la DAQ (Fig. 6A, pico 2 y Fig. 6B, así como, un incremento del pico de reducción del dopaminocromo (Fig. 6A, pico 3 y Fig. 6B). Observándose también que el potencial de reducción del dopaminocromo varía con el pH del medio electrolítico.

Conociendo que a $\text{pH} > 6$ ocurre la reacción química de ciclización como consecuencia de la desprotonación del grupo amino del producto de la DAQ, se investigó el comportamiento electroquímico de la oxidación de la DA con la velocidad de barrido a $\text{pH} 6,7$. Las figuras 8A y 8B muestran dicho comportamiento en dos intervalos de velocidad de barrido. Se observa que en el intervalo de velocidades de barrido comprendido entre $0,005$ a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$, se va definiendo un pico a $-0,2 \text{ V}$, el cual es atribuido a la reducción del dopaminocromo mientras que el potencial de reducción de la DAQ ($E_{\text{p(DQA)}}$) disminuye. En el intervalo de velocidades de barrido comprendido entre $0,2$ y 1 Vs^{-1} (Fig. 8B), el potencial de pico de la oxidación de DA ($E_{\text{pox(DA)}}$) aumenta con la velocidad de barrido y el potencial de pico de reducción de la DAQ ($E_{\text{p red(DAQ)}}$) disminuye, no apreciándose claramente el comportamiento del pico de reducción del dopaminocromo.

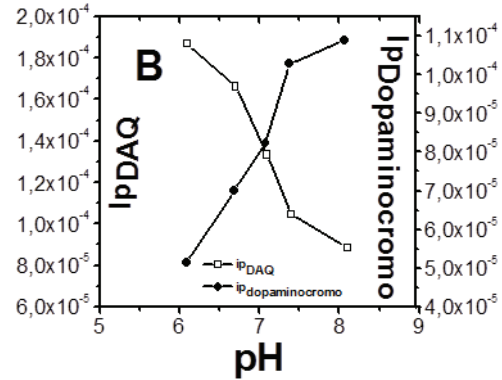
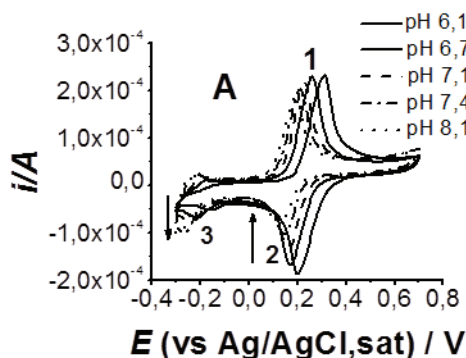


Fig. 6. Comportamiento electroquímico del pico de reducción de DAQ y del dopaminocromo en una solución reguladora + DA $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ variando el pH entre 6,1 hasta 8,1 utilizando el electrodo CVMEQ. $v = 0,2 \text{ V s}^{-1}$.

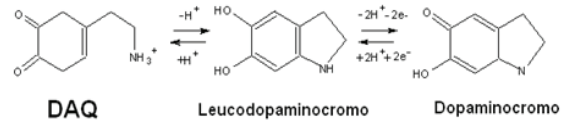
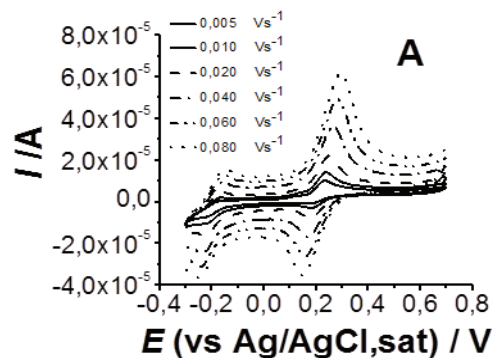


Fig. 7. Reacciones que experimenta la Dopaminoquinona (DAQ) a $\text{pH} > 6$.

La figura 9A muestra el comportamiento del cociente de la corriente de pico de reducción de la DAQ ($I_{\text{p red(DAQ)}}$) con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($I_{\text{p red(DAQ)}}/v^{1/2}$ vs. Velocidad de barrido (v)). Se observa que $I_{\text{p red(DAQ)}}/v^{1/2}$ disminuye rápidamente cuando v aumenta desde $0,005$ a $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ y luego su decaimiento se hace más lento a valores de $v > 0,05 \text{ v s}^{-1}$, lo cual es indicativo de que el proceso de reducción de la DAQ esta acoplado a una reacción química. La figura 9B muestra que la relación entre la corriente de pico de reducción del dopaminocromo y la corriente de reducción de la DAQ ($I_{\text{p dopaminocromo}}/I_{\text{p red(DAQ)}}$) decrece rápidamente entre $0,005$ y $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ y luego su decaimiento se hace lento cuando $v > 0,05 \text{ Vs}^{-1}$.



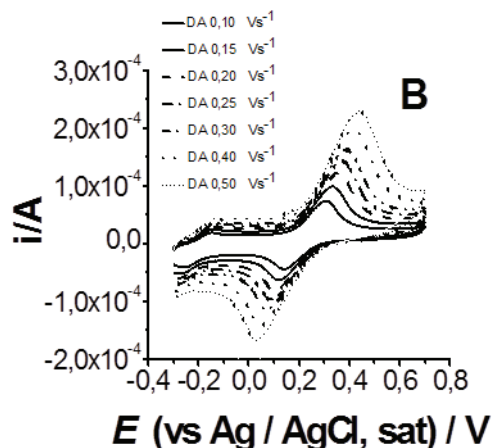


Fig. 8. Voltamperogramas de la DA (1×10^{-4} M) a diferentes velocidades de barrido de potencial en solución reguladora ácido acético/acetato pH 6,7 sobre electrodo CVMEQ.

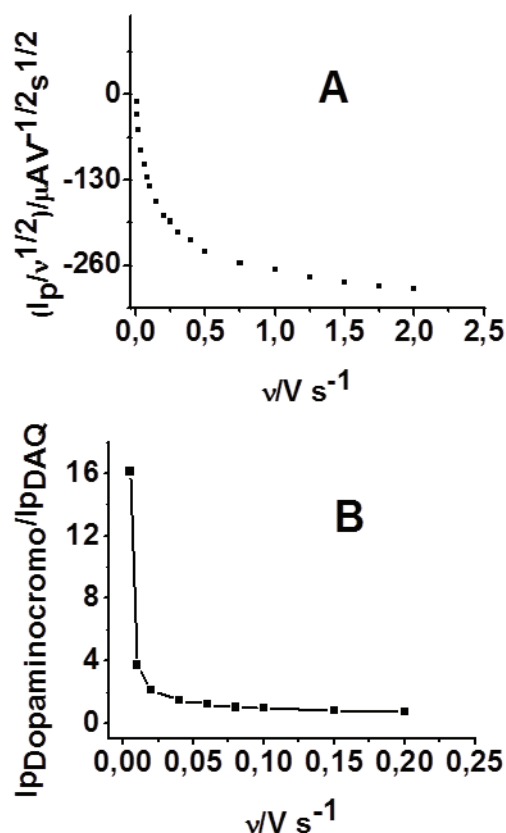


Fig. 9. A) Relación $I_{p_c}/v^{1/2}$ vs. v y B) Comportamiento de $(I_{p_{\text{dopaminocromo}}}/I_{p_c(\text{DAQ})})$ vs. v en solución reguladora ácido acético/acetato pH 6,7 utilizando el electrodo CVMEQ.

CONCLUSIONES

El E_{Redox} de la DA sigue un comportamiento

lineal con el pH del medio electrolítico a través de la ecuación: $E_{\text{redox}} = 0,587 - 0,0544\text{pH}$, la cual demuestra que el proceso general de la oxidación de la DA es dependiente de la concentración de iones hidrógenos y que la transferencia electrónica va acompañada por la transferencia de igual número de iones hidrógenos de acuerdo a la ecuación de Nernst ($E_{\text{redox}} = E' - \frac{0,059m}{n} \text{pH}$), donde m es el número de iones hidrógenos transferidos y n es el número de electrones involucrados en la oxidación electroquímica de la DA.

A valores de $\text{pH} > 6$ el proceso redox de la DA se ve afectado por reacciones que se desarrollan con el producto de su oxidación (DAQ), el cual se desprotona experimentando una reacción de adición de 1,4 de Michael resultando en una reacción de ciclización que da origen a la formación de dopaminocromo.

El proceso de transferencia electrónica de la reducción de la DAQ está acoplado a una reacción química la cual es favorecida a valores de $\text{pH} > 6$. Estos procesos pueden ser observados por VC en el intervalo de velocidades de barrido de 0,005 a 1 V s^{-1} .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Joutsa J, Rinne JO, Eskola O, Kaasinen V. Reduced striatal dopamine synthesis capacity is associated with symptoms of depression in patients with de novo unmedicated Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2013; 3(3): 325-329.
- [2] Stober G, Benschachar D, Cardoni M, Falkai P, Fonteh AN, Gawlik M, *et al.* Schizophrenia: From the brain to peripheral markers. A consensus paper of the WFSBP task force on biological markers. *World J Biol Psychiatry.* 2009; 10(2): 127-155.
- [3] Starr MS. The role of dopamine in epilepsy. *Synapse.* 1996; 22(2): 159-194.
- [4] Waszczak BL, Waters JR. Dopamine modulation of effects of aminobutyric acid on substantianigra pars reticulata neurons. *Science.* 1983; 220(4593): 218-221.
- [5] Johnson AE, Coirini H, Källström L, Wiesel F-A. Characterization of dopamine receptor binding sites in the subthalamic nucleus. *Neuroreport.* 1994; 5(14): 1836-1838.
- [6] Kreiss DS, Anderson LA, Walters JR. Apomorphine and dopamine D1 receptor agonists increase the firing rates of subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience.* 1996; 72(3): 863-876.
- [7] Boulton A, Baker G, Adams RN. *Voltammetric Methods and rain Systems.* The Humana Press, Clifton, NJ (1995).
- [8] Wang J, Wang L, Wang Y, Yang W,

Jiang Wang E. Effect of buffer capacity on electrochemical behavior of dopamine and ascorbic acid. *J Electroanal Chem.* 2007; 601:107-111.

[9] Gonon F, Buda M, Pujol JF. Measurements of neurotransmitter release in vivo. En: Marsden C.A., Editor, Wiley, Chichester, 153-167 (1984).

[10] Menolasina S, De Santis A, Díaz F, Sánchez A, Aguilar A, Contreras O. Factores que influyen en el comportamiento electroquímico de sustancias de interés médico y farmacológico en electrodos modificados. *Avances en Química.* 2010; 5(1):3-14.

[11] Popa E., Notsu H., Miwa T., Tryk D.A., Fujishima A. Selective electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at anodized diamond thin film electrodes. *Electrochem Solid State Lett.* 1999; 2: 49–51.

[12] Thiagarajan S, Tsai TH, Chen SM. Easy modification of glassy carbon electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Biosensors and*

Bioelectronics, 2009; 24:2712-2715.

[13] Da Silva RP, O Lima AW, Serrano SHP. Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution. *Analytica Chimica Acta,* 2008; 612: 89–98.

[14] Menolasina S, Martín-Fernandez B, García-Iñigo FJ, López-Ruiz B. Comportamiento electroquímico de la dopamina en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/ glutaraldehído. *An R Acad Nac Farm,* 2009; 75(3):373-388.

[15] Menolasina S, Martín-Fernandez B, García-Iñigo FJ, López-Ruiz B. Indirect dopamine detection on a glassy carbon electrode based on laponite/ tirosinase. *Sensor Letter,* 2011; 9(5): 1670-1675.

[16] Wang X, Jin B, Lin X. *In-situ* FTIR spectroelectrochemical study of dopamine at a glassy carbon electrode in a neutral solution. *Analytical science.* 2002; 18: 931-93.