



Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Química

Estudio electroquímico y espectroelectroquímico de  
la oxidación de catecolaminas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

**Carmen Ileana Reyes Hernández**



*México, D.F.*

*2008*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

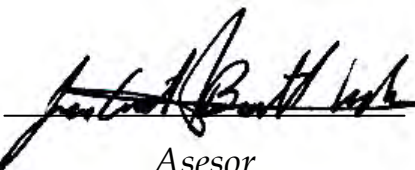
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

## JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Martha Aguilar Martínez  
Vocal: Prof. Fernando León Cedeño  
Secretario: Prof. José Antonio Bautista Martínez  
1er. Suplente: Prof. Daniel Méndez Iturbide  
2º. Suplente: Profa. Minerva Carrasco Fuentes

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Electroquímica Molecular, anexo laboratorio 4F  
Edificio A, Departamento de Fisicoquímica,  
Facultad de Química, UNAM



*Asesor*

Dr. José Antonio Bautista Martínez

---

*Sustentante*

Carmen Ileana Reyes Hernández

## AGRADECIMIENTOS

En realidad esta ha sido una parte complicada de escribir, porque implica echar un vistazo hacia atrás y darse cuenta de la importancia que han tenido para mí una diversidad de personas, algunas con rostros borrosos por el paso del tiempo y otras con sonrisas tan nítidas como si las hubiera visto ayer.

A quienes quiero agradecer afablemente es a mi familia, en especial a mi mamá y a mi papá por sus cuidados, su apoyo, su paciencia, su cariño, en fin por todo aquello que han tenido a bien ofrecerme, y sólo espero que estén orgullosos de mí tanto como yo de ellos.

También a mi abuelita Carmen porque ha sido otra mamá para mí.

A los cuates por su amistad, por dejarme grandes y valiosos recuerdos, porque me han permitido andar sus pasos por lo menos durante un tiempo para disfrutar de su compañía y contagiarme un poco de su locura.

A Pedro por formar parte mí...



A José Antonio Bautista con especial afecto por la oportunidad que me brindo para trabajar en el Laboratorio de Electroquímica Molecular, pero sobre todo por su invaluable apoyo, amistad y por la confianza que siempre me demostró.

A la Dra. Martha Aguilar por permitirme amablemente unirme a su equipo de investigación y por el apoyo otorgado para el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del jurado por el valioso tiempo otorgado para la revisión de esta tesis

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química  
y al Proyecto CONACYT: 40702-Q

...conocer es luchar, en la medida en que el conocimiento es transformación  
y por ello conocer es abrir espacios de lucha...

Paulo Freire

Sí los sueños no fueran un despertar,  
un cierto modo de despertar,  
hubieran pasado inadvertidos siempre.

María Zambrano



## PRODUCTOS DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

### **XXII Congreso Latinoamericano y 1ro Iberoamericano de Ciencias Fisiológicas en la ciudad de Buenos Aires, Argentina del 4 al 7 de noviembre de 2006**

Reyes-Hernández Carmen I, Santiago-López Darío, Bautista-Martínez José A., Rivas-Arancibia Selva, Aguilar-Martínez M. “*Determinación electroquímica de la oxidación de la dopamina, en plasma de ratas sometidas a un modelo de daño por ozono*”.

### **XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y VII Semana de Geología, Minería, Metalurgia y Materiales en la ciudad de Pachuca de Soto Hidalgo del 27 de mayo al 1 de junio de 2007**

Reyes-Hernández C. Ileana, Bautista-Martínez J. Antonio, Díaz de León-Luna Pedro, González Ignacio, Aguilar-Martínez Martha. “*Estudio electroquímico y espectroelectroquímico de la oxidación de catecolaminas en medio amortiguado a pH 7.1*”

### **Artículo en proceso de revisión para su publicación**

D. Santiago-López, JA. Bautista-Martínez, C. I. Reyes-Hernández, M. Aguilar-Martínez, S. Rivas-Arancibia. Effects of oxidative stress on dopamine oxidates metabolites and progressive damage in substantia nigra in rats exposed chronically to ozone.

---

## CONTENIDO

<b>I.</b> Índice de figuras y tablas	i
<b>II.</b> Lista de símbolos y abreviaturas	vi
<b>III.</b> Introducción	1

### ص **Capítulo 1** ص

1. Antecedentes	5
1.1. Importancia de las catecolaminas	6
1.2. Quinonas de catecolaminas	11
1.3. Electroquímica aplicada al estudio de las catecolaminas	16
1.4. Voltamperometría cíclica	22
1.4.1. Factores que influyen en la corriente	30
1.4.2. Parámetros voltamperométricos para el análisis de reacciones electroquímicas	35
1.5. Espectroscopia de ultravioleta-visible	38
1.6. Espectroelectroquímica	40
<b>IV.</b> Hipótesis	45
<b>V.</b> Objetivos	46

---

**ص Capítulo 2 ص**

2. Desarrollo experimental	47
2.1. Reactivos	48
2.2. Preparación de las soluciones	49
2.3. Instrumentación	
2.3.1. Análisis electroquímico	49
2.3.2. Preacondicionamiento de los electrodos	50
2.3.3. Análisis espectroelectroquímico	51
2.4. Metodología para voltamperometría cíclica	52
2.5. Análisis electroquímico de plasma de ratas	53
2.6. Estudio espectroelectroquímico	54

**ص Capítulo 3 ص**

3. Resultados y discusión	55
3.1. Determinación de especies oxidadas en plasma de ratas expuestas a ozono	57
3.1.1. Adición de catecolaminas en plasma de ratas control	61
3.2. Comportamiento electroquímico del catecol en medio acuoso	66
3.3. Comportamiento electroquímico de las catecolaminas en medio acuoso	75
3.3.1. Efecto de las reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga	83
3.3.2. Análisis de los parámetros voltamperométricos de las catecolaminas	96
	106

---



3.4. Espectroelectroquímica UV-visible aplicada en el estudio de la oxidación electroquímica de catecolaminas

**VI.** Conclusiones 111

**VII.** Perspectivas 115

## ص **Anexos** ص

A.1. Estrés oxidativo y radicales libres 117

A.2. Enfermedad de Parkinson 125

A.3. Calibración de espectrofotómetro Agilent 129

A.4. Determinación de la estabilidad de las catecolaminas en medio acuoso a pH 7 por espectroscopia UV-vis 131

**VIII.** Referencias 135

---

## I. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de reacciones que conforman la ruta metabólica de síntesis de la dopamina.	7
<b>Figura 1.2.</b> Función de las enzimas MAO y COMT en el catabolismo de la dopamina	8
<b>Figura 1.3.</b> Esquema de reacciones del metabolismo de la dopamina para la síntesis de otras catecolaminas.	9
<b>Figura 1.4.</b> Función de las enzimas MAO y COMT en el catabolismo de la adrenalina y la noradrenalina	10
<b>Figura 1.5.</b> Mecanismo de autooxidación de la dopamina en presencia de L-cisteína	14
<b>Figura 1.6.</b> Reacciones de oxidación catalizada por la enzima lacasa, desprotonación, ciclización intramolecular y desproporción de la dopamina	20
<b>Figura 1.7.</b> Esquema de una celda electroquímica con tres electrodos. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones cuando la reacción de interés es una reducción.	23
<b>Figura 1.8.</b> Principio de estimulación en un sistema electroquímico a potencial controlado	24
<b>Figura 1.9.</b> Señal de excitación aplicada en voltamperometría cíclica	25
<b>Figura 1.10.</b> Voltamperograma cíclico típico para una reacción reversible.	26
<b>Figura 1.11.</b> Perfiles de concentración asociados al voltamperograma de la figura 1.10	27
<b>Figura 1.12.</b> Técnicas espectroelectroquímicas en A) celda de capa fina y B) en una celda convencional para experimentos de difusión semi-infinita	42
<b>Figura 2.1.</b> Estructuras de especies químicas derivadas del catecol y sus valores de pKa	48

<b>Figura 2.2.</b> Celda para experimentos de electroquímica	50
<b>Figura 2.3.</b> Celda para experimentos de espectroelectroquímica	52
<b>Figura 3.1.</b> Voltamperograma cíclico típico de plasma de ratas del grupo control. Velocidad de barrido 100 mV/s.	58
<b>Figura 3.2.</b> Voltamperograma cíclico típico de plasma de ratas expuestas a ozono durante 30 días. C vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 100 mV/s.	60
<b>Figura 3.3.</b> Voltamperograma cíclico típico de plasma de ratas expuestas a ozono durante 60 días. C vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 100 mV/s.	60
<b>Figura 3.4.</b> Voltamperograma cíclico de DA 1.05 mM en plasma de ratas sin exposición a ozono. C vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 100 mV/s.	61
<b>Figura 3.5.</b> Voltamperograma cíclico de AA 3.78 mM en plasma de ratas sin exposición a ozono. C vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 100 mV/s.	62
<b>Figura 3.6.</b> Voltamperograma cíclico de L-dopa 0.1 mM en plasma de ratas sin exposición a ozono. C vítreo como electrodo de trabajo. Velocidad de barrido 100 mV/s.	64
<b>Figura 3.7.</b> Voltamperograma cíclico típico de catecol 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.	67
<b>Figura 3.8.</b> Esquema de las posibles reacciones durante la oxidación de hidroquinonas	69
<b>Figura 3.9.</b> Gráfica de $i_{pc} / i_{pa}$ vs log de la velocidad de barrido para el catecol en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.	70
<b>Figura 3.10.</b> Gráfica de $\Delta E_p$ vs log de la velocidad de barrido para el catecol en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7	71
<b>Figura 3.11.</b> Diagrama de variación de la fracción molar de las especies de (●) $H_2Q$ , (□) $HQ^-$ y (▲) $Q^{2-}$ asociadas al catecol en función del pH.	72

<b>Figura 3.12.</b> Esquema de reacciones de oxidación de hidroquinonas. La zona sombreada indica la ruta de oxidación propuesta para el catecol en medio prótico y pH 7.	<b>73</b>
<b>Figura 3.13.</b> Voltamperograma cíclico típico de dopamina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.	<b>76</b>
<b>Figura 3.14.</b> Voltamperograma cíclico típico de dopamina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 20 mV/s. $E_{\lambda} = 0.4$ V	<b>77</b>
<b>Figura 3.15.</b> Representación de la donación de densidad electrónica del carbono hacia el anillo aromático que conforma al catecol	<b>78</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Resultados obtenidos por voltamperometría cíclica para el sistema $I_a/I_c$	<b>78</b>
<b>Figura 3.16.</b> Voltamperograma cíclico típico de noradrenalina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.	<b>79</b>
<b>Figura 3.17.</b> Voltamperograma cíclico típico de adrenalina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.	<b>80</b>
<b>Figura 3.18.</b> Voltamperograma cíclico típico de L-Dopa 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.	<b>81</b>
<b>Figura 3.19.</b> Comparación del comportamiento electroquímico de Catecol, DA, NAD, AD y L-Dopa 1 mM, en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.	<b>83</b>
<b>Figura 3.20.</b> Gráficas de a) $i_{pc}/i_{pa}$ y b) $\Delta E_p$ en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox I de la DA	<b>84</b>
<b>Figura 3.21.</b> Gráficas de a) $i_{pc}/i_{pa}$ y b) $\Delta E_p$ en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox I de la NAD	<b>85</b>
<b>Figura 3.22.</b> Gráficas de a) $i_{pc}/i_{pa}$ y b) $\Delta E_p$ en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox I de la AD	<b>87</b>
<b>Figura 3.23.</b> Gráficas de a) $i_{pa}/i_{pc}$ y b) $\Delta E_p$ en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox II de la DA	<b>88</b>
<b>Figura 3.24.</b> Gráficas de a) $i_{pa}/i_{pc}$ y b) $\Delta E_p$ en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox II de la NAD	<b>88</b>

<b>Figura 3.25.</b> Gráficas de a) $i_{pa}/i_{pc}$ y b) $\Delta E_p$ en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox II de la AD	89
<b>Tabla 3.2.</b> Parámetros electroquímicos obtenidos por voltamperometría cíclica para el sistema IIa/IIc a una velocidad de barrido de 100 mV/s.	89
<b>Figura 3.26.</b> Diagrama de variación de la fracción molar de las especies ( $\blacklozenge$ ) $H_3Q^+$ , ( $\blacksquare$ ) $H_2Q$ , ( $\blacktriangle$ ) $HQ^-$ y ( $\times$ ) $Q^{2-}$ asociadas a la dopamina en función del pH	91
<b>Figura 3.27.</b> Diagrama de variación de la fracción molar de las especies ( $\blacklozenge$ ) $H_4Q^+$ , ( $\blacksquare$ ) $H_3Q$ , ( $\blacktriangle$ ) $H_2Q^-$ , ( $\times$ ) $HQ^{2-}$ y ( $\circ$ ) $Q^{3-}$ asociadas a la L-Dopa en función del pH	91
<b>Figura 3.28.</b> Diagrama de variación de la fracción molar de las especies ( $\blacklozenge$ ) $H_3Q^+$ , ( $\blacksquare$ ) $H_2Q$ , ( $\blacktriangle$ ) $HQ^-$ y ( $\circ$ ) $Q^{2-}$ asociadas a la noradrenalina en función del pH.	92
<b>Figura 3.29.</b> Diagrama de variación de la fracción molar de las especies ( $\blacklozenge$ ) $H_4Q^+$ , ( $\blacksquare$ ) $H_3Q$ , ( $\blacktriangle$ ) $H_2Q^-$ , ( $\times$ ) $HQ^{2-}$ y ( $\circ$ ) $Q^{3-}$ asociadas a la adrenalina en función del pH.	92
<b>Figura 3.30.</b> Gráficas de $i_{pa}$ vs $v^{1/2}$ de la onda I presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas	96
<b>Tabla 3.3.</b> Parámetros de las rectas ajustadas a los valores de $i_{pa}$ vs $v^{1/2}$ de la onda I	97
<b>Figura 3.31.</b> Gráficas de $-i_{pc}$ vs $v^{1/2}$ de la onda I presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas	98
<b>Tabla 3.4.</b> Parámetros de las rectas ajustadas a los valores de $-i_{pc}$ vs $v^{1/2}$ de la onda I	98
<b>Figura 3.32.</b> Gráficas de $i_{pa}$ vs $v^{1/2}$ de la onda II presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas	99
<b>Figura 3.33.</b> Gráficas de $-i_{pc}$ vs $v^{1/2}$ de la onda II presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas	100
<b>Figura 3.34.</b> Gráficas de $E_p$ vs $\log v$ del sistema I presente en los voltamperogramas del Catecol, DA y NAD	101
<b>Figura 3.35.</b> Gráficas de $E_p$ vs $\log v$ del sistema I presente en los voltamperogramas de AD y L-Dopa	102

<b>Figura 3.36.</b> Gráficas de $E_p$ vs $\log v$ del sistema II presente en los voltamperogramas de DA y NAD	103
<b>Figura 3.37.</b> Gráficas de $E_p$ vs $\log v$ del sistema II presente en los voltamperogramas de AD y L-Dopa	104
<b>Figura 3.38.</b> Espectros de absorción de catecol 0.1 mM obtenidos en amortiguador de fosfatos pH 7.1. Electrólisis a potencial controlado (0.43V) en malla de Pt, electrodo de fibra de carbono como auxiliar y Ag/AgCl como referencia	107
<b>Figura 3.39.</b> Espectros de absorción de dopamina 0.1 mM obtenidos en amortiguador de fosfatos pH 7.1. Electrólisis a potencial controlado (0.38 V) en malla de Pt, electrodo de fibra de carbono como auxiliar y Ag/AgCl como referencia.	108
<b>Figura 3.40.</b> Espectros de absorción de adrenalina 0.1 mM obtenidos en amortiguador de fosfatos pH 7.1. Electrólisis a potencial controlado (0.45 V) en malla de Pt, electrodo de fibra de carbono como auxiliar y Ag/AgCl como referencia.	109
<b>Figura A.1.</b> Formación de especies reactivas del oxígeno en la mitocondria	120
<b>Tabla A.1.</b> Principales sistemas antioxidantes que regulan la concentración de ERO's en el organismo	122
<b>Tabla A.3.2.</b> Longitudes de onda de absorción máxima de derivados de benceno.	129
<b>Figura A.2.</b> Espectros de absorción UV-vis de DA en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7. El inserto muestra la curva de calibración asociada.	130
<b>Figura A.3.</b> Espectros de absorción UV-vis de L-Dopa en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7. El inserto muestra la curva de calibración asociada.	130
<b>Figura A.4.</b> Análisis espectrofotométrico de a) DA y b) L-Dopa 0.05 mM en buffer 0.1 M de fosfatos a pH 7.07, en función del tiempo y con exposición a la luz.	132
<b>Figura A.5.</b> Análisis espectrofotométrico de a) NAD y b) AD 0.05 mM en buffer 0.1 M de fosfatos a pH 7.07, en función del tiempo y con exposición a la luz.	133
<b>Figura A.6.</b> Análisis espectrofotométrico de 6-hidroxidopamina 0.05 mM en buffer 0.1 M de fosfatos a pH 7.07, en función del tiempo y con exposición a la luz.	134

## II. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Símbolos</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidades</b>
$E_p$	Potencial de pico	mV, Volts
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico	mV, Volts
$E_{pc}$	Potencial de pico catódico	mV, Volts
$E_\lambda$	Potencial de inversión	mV, Volts
$i$	Corriente	$\mu\text{A}$ , Ampers
$i_p$	Corriente de pico	$\mu\text{A}$ , Ampers
$i_{pa}$	Corriente de pico anódico	$\mu\text{A}$ , Ampers
$i_{pc}$	Corriente de pico catódico	$\mu\text{A}$ , Ampers
$j$	Densidad de corriente	$\mu\text{Acm}^{-2}$
$J_i(x, t)$	Flujo de la especie $i$	$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
$\Psi_p$	Función corriente	
$v$	Velocidad de barrido	mV/s
$v_{tm}$	Velocidad de transferencia de masa	$\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$
$F$	Constante de Faraday, carga por mol de electrones	C, Coulombs
$A$	Área	$\text{cm}^2$
$\gamma_O$	Coeficiente de actividad de la especie oxidada	
$\gamma_R$	Coeficiente de actividad de la especie reducida	
$E^{\circ'}$	Potencial formal estándar	V, mV
$E^\circ$	Potencial estándar	V, mV
$\Delta E_p$	$ E_{pa} - E_{pc} $ en voltamperometría cíclica	V, mV
$E_{p/2}$	Potencial donde $i = i_p/2$ en voltamperometría de barrido lineal	V, mV
$\phi$	Potencial electrostático	V

<b>Símbolos</b>	<b>Significado</b>	<b>Unidades</b>
$C_i^*$	Concentración de i en el seno de la disolución	M, mol/L
$z_i$	Carga de la especie i	
x	Distancia al electrodo	cm
D	Coefficiente de difusión	cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
A	Absorbancia	
$\epsilon$	Coefficiente de absortividad molar	M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
b	Longitud del paso óptico	cm
$\lambda$	Longitud de onda	nm

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
EP	Enfermedad de Parkinson
CAT	Catecol
DA	Dopamina
NAD	Noradrenalina, norepinefrina
AD	Adrenalina, epinefrina
5-HT	Serotonina
VC	Voltamperometría cíclica
AA	Ácido ascórbico
DHA	Ácido dehidroascórbico
DOPAC	Ácido 3,4-dihroxifenilacético
MAO	Monoamino oxidasa
COMT	Catecol-O-metiltransferasa



<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
VMA	Ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico
<b>ERO's</b>	Especies reactivas de oxígeno
EOx	Estrés oxidativo
ATP	Trifosfato de adenosina
QH <sub>2</sub>	Hidroquinona
Q	Quinona
DAQ	Quinona de dopamina
DHBT-1	Ácido 7-(2-aminoetil)-3,4-dihidro-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazin-3-carboxílico
PVC	Cloruro de polivinilo
O	Especie química en su forma oxidada
R	Especie química en su forma reducida
n	Número de electrones intercambiados, electrones no compartidos
<b>EOT's</b>	Electrodos ópticamente transparentes
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
RL	Radicales libres
NADH	Dinucleótido de la nicotinamida adenina reducido
FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de la flavín adenina reducido
CTE	Cadena de transporte de electrones
SOD	Superóxido dismutasa
GSH	Glutación
GPx	Glutación peroxidasa
CAT	Catalasa

### III. INTRODUCCIÓN

Las catecolaminas son un grupo de moléculas que poseen múltiples funciones dentro del metabolismo de los seres vivos, así actúan como neurotransmisores u hormonas para mantener al organismo humano en homeostasis. En cambio, si dicha función llega a ser ineficiente se desencadena una serie de reacciones químicas que pueden generar algún tipo de padecimiento, por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas. En cuanto al desempeño de los neurotransmisores, se han estudiado ampliamente ciertas enfermedades neurodegenerativas entre ellas la enfermedad de Parkinson, encontrándose que las personas con este padecimiento presentan bajos niveles de dopamina en el sistema nervioso central [1], aunque la causa real de la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas aún se desconoce.

Debido a la importancia que poseen los neurotransmisores como la dopamina (DA), la noradrenalina (NAD), la adrenalina (AD) y la serotonina (5-HT), en el control y la regulación del sistema nervioso central, su cuantificación se vuelve necesaria para monitorear el desarrollo de padecimientos neurodegenerativos.

En una variedad de investigaciones que se enfocan en la determinación de la dopamina en el sistema nervioso central *in vivo* e *in vitro*, se ha recurrido a la aplicación de diferentes técnicas electroquímicas, algunas de ellas muestran buena reproducibilidad pero son

limitadas debido a la baja resolución entre la DA y otras especies electroactivas, tales como el ácido ascórbico (AA) y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) que poseen potenciales de oxidación similares al de la dopamina; además, las muestras biológicas deben ser sometidas a un proceso inicial de purificación y concentración, volviendo más complejas las determinaciones mediante técnicas acopladas con la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Al mismo tiempo se ha profundizado en las investigaciones para elucidar un mecanismo que pueda explicar el progreso de las enfermedades neurodegenerativas; el objetivo final, común en la mayoría de los trabajos realizados en ésta área de la ciencia, es lograr detener el daño neuronal con un tratamiento más adecuado, pero se ha comprobado que la solución no es trivial debido a los diferentes factores que afectan los procesos metabólicos.

El propósito de esta investigación no es entrar en detalle sobre los posibles mecanismos de neurodegeneración, sin embargo se pretende obtener información de la química de catecolaminas en plasma sanguíneo y medios acuosos, que facilite en un futuro el desarrollo de un electrodo modificado que sea apropiado para su uso en el diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas, y específicamente se ha centrado el interés en la enfermedad de Parkinson (EP), dado que los pacientes presentan síntomas hasta que ya han perdido cerca del 80 % de sus neuronas dopaminérgicas.

Además, después de analizar la información existente sobre los diferentes electrodos diseñados para la detección de la dopamina en la región de potenciales de oxidación, así como lo demuestran los resultados de los estudios realizados en plasma de ratas que se presentan en esta tesis, se consideró la posibilidad de distinguir las especies que coexisten en el sistema cerebral, al determinar los potenciales de reducción asociados a las especies oxidadas más estables, ya que el potencial de reducción del ascorbato es diferente al de la quinona derivada de la dopamina.

Con el fin de establecer las bases para desarrollar nuevos métodos para la detección de neurotransmisores se efectuaron experimentos complementarios por voltamperometría cíclica para el análisis del comportamiento electroquímico del catecol, la dopamina, la L-Dopa, la adrenalina y la noradrenalina en medio prótico a pH 7. Se concluyó que pequeñas diferencias estructurales entre las catecolaminas, producen cambios significativos en la presencia y estabilidad de los intermediarios que se forman como resultado de las reacciones químicas acopladas a la reacción rédox quinona-hidroquinona. También, se recurrió a la técnica de espectroelectroquímica UV-visible, que demuestra la presencia de intermediarios producidos por una reacción de intraciclación molecular por una adición-1,4 tipo Michael posterior a la oxidación de las catecolaminas.

Finalmente, con base en nuestros resultados tanto en plasma como en medio acuoso, sugerimos que las investigaciones posteriores se enfoquen en aprovechar la reducción vía dos electrones y dos protones de compuestos 5,6-dihidroxiindolinquinonas derivados de

las catecolaminas, para diseñar un método adecuado en la determinación selectiva de estas especies en la región catódica de potencial ya que están totalmente separadas de los procesos rédox de ácido ascórbico y DOPAC.

# Capítulo 1

## ANTECEDENTES





## **1. Antecedentes**

### **1.1. Importancia de las catecolaminas**

Las principales catecolaminas que se encuentran en el organismo humano son la noradrenalina (NAD), adrenalina (AD) y dopamina (DA), éstas se forman por hidroxilación y descarboxilación del aminoácido tirosina. Estas especies se encuentran estrechamente relacionadas debido a que poseen una estructura química similar, como su nombre lo indica, los grupos funcionales en común son el catecol y una amina, sin embargo cada una tiene funciones particulares.

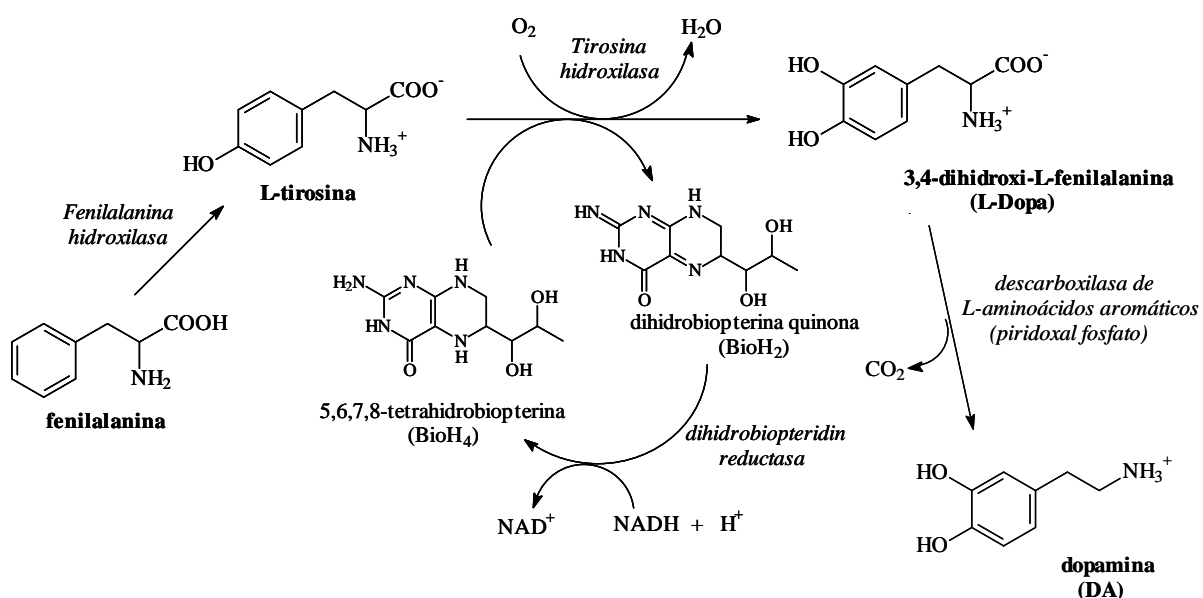
El estudio de las catecolaminas en diversas áreas de la ciencia es de gran interés, puesto que su presencia o ausencia puede ser un indicador del estado de salud de una persona. En especial, ha sido de interés la dopamina por su vínculo con la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson (ver Anexo A.2), y las adicciones [2].

Con respecto a la DA se sabe que es una catecolamina que tiene un papel importante dentro del funcionamiento del cerebro humano como un neurotransmisor inhibitorio. En condiciones fisiológicas está particularmente involucrada en la modulación de las capacidades motoras, en la motivación, el aprendizaje y la memoria. Es sintetizada en las terminaciones nerviosas de las neuronas dopaminérgicas a partir del aminoácido tirosina. Parte de la tirosina se forma en el hígado a partir de la fenilalanina y la enzima fenilalanina



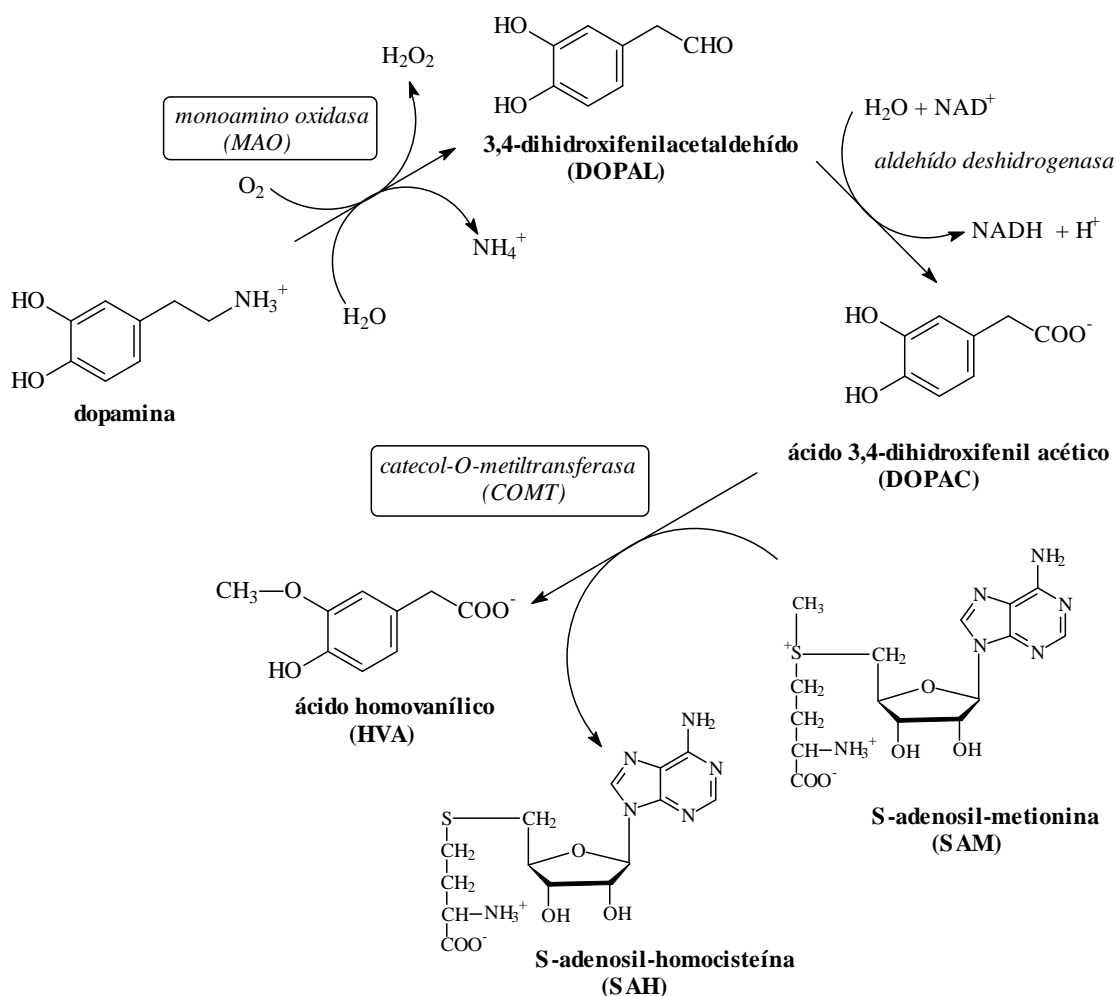
hidroxilasa, aunque la mayor parte proviene de la ingesta de alimentos, y después es transportada hacia el interior de las neuronas secretoras de las catecolaminas.

La síntesis de DA (figura 1.1) comienza con la conversión de la tirosina a L-Dopa a través de una reacción catalizada por la tirosina hidroxilasa, una enzima que requiere de la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina ( $\text{BioH}_4$ ) como coenzima [3]; dicho paso es limitante de la velocidad en esta vía de síntesis y por lo tanto la actividad de la tirosina hidroxilasa está controlada adecuadamente mediante mecanismos de retroinhibición por la dopamina y la noradrenalina. La L-Dopa es entonces inmediatamente metabolizada a dopamina por la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, todo este proceso ocurre en el citoplasma de las células.



**Figura 1.1.** Esquema de reacciones que conforman la ruta metabólica de síntesis de la dopamina

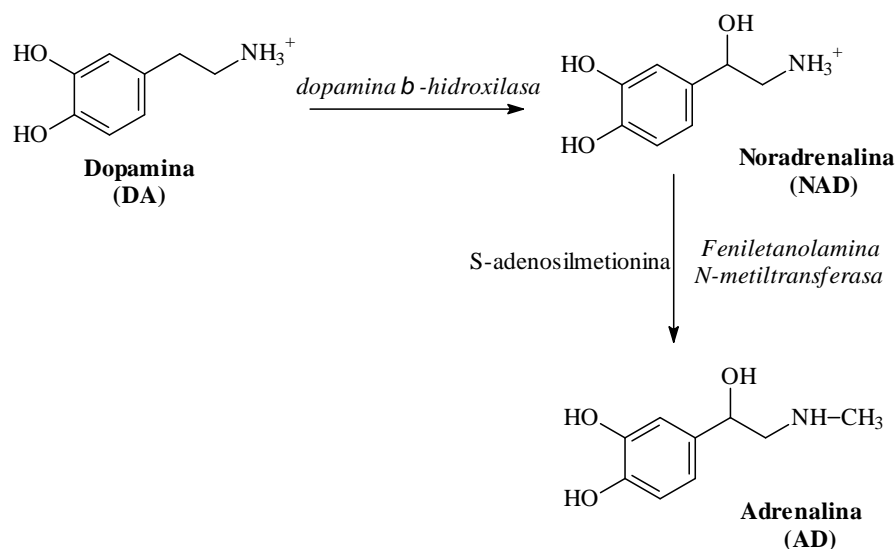
En las terminaciones nerviosas, la dopamina se almacena en pequeñas vesículas granulares (sinápticas), que por su contenido ácido evita el proceso de autoxidación de este neurotransmisor, desde allí es liberado por un proceso de exocitosis que es promovido por el correspondiente estímulo fisiológico. Después de cumplir con su función, la DA es recapturada por proteínas transportadoras asociadas a la membrana y subsecuentemente se reutiliza, o bien, se cataboliza a productos inactivos por las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-O-metil transferasa (COMT) (figura 1.2).



**Figura 1.2.** Función de las enzimas MAO y COMT en el catabolismo de la dopamina

La MAO se localiza en la superficie externa de las mitocondrias de las terminaciones nerviosas. Mientras que la enzima COMT tiene una amplia distribución en hígado, riñones y músculo liso, pero no se le encuentra en las terminaciones nerviosas.

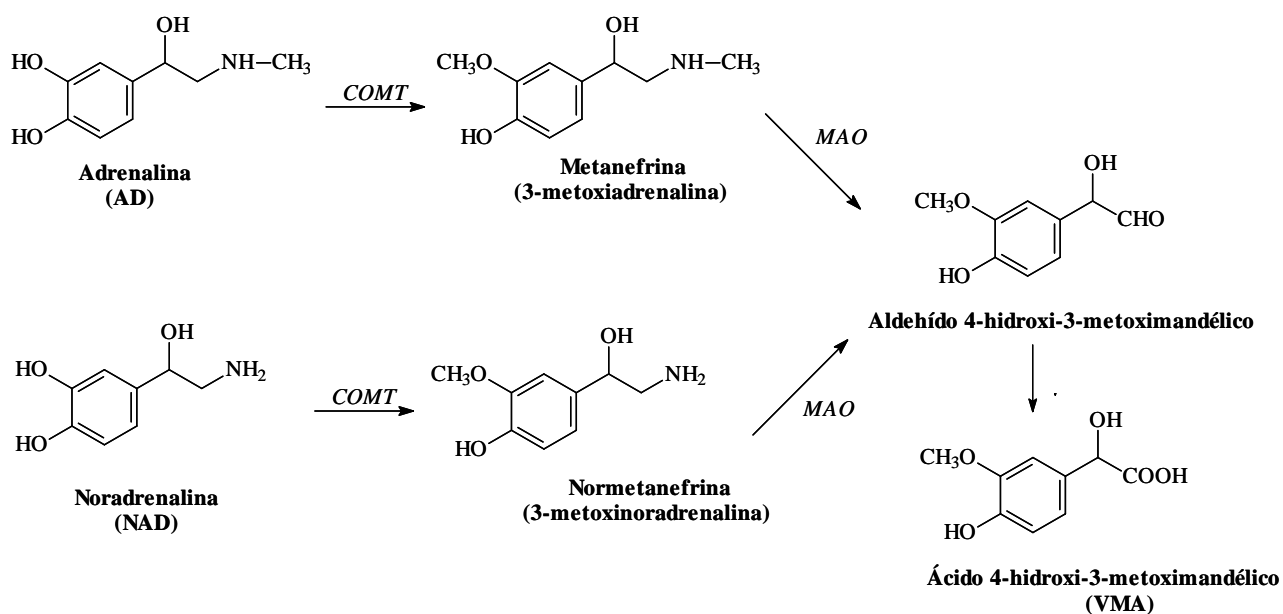
Por otra parte, cuando la DA se encuentra dentro de las vesículas sinápticas también puede convertirse en NAD por la acción de la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa. A continuación la NAD puede salir de las vesículas sinápticas y ser transformada en adrenalina (AD) ya en el citoplasma, por la actividad de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa presente en algunas neuronas. Posteriormente, la AD formada entra en otras vesículas para ser almacenada aunque sólo es activa en las neuronas adrenérgicas.



**Figura 1.3.** Esquema de reacciones del metabolismo de la dopamina para la síntesis de otras catecolaminas

Como se puede observar las catecolaminas antes mencionadas además de tener una relación estructural, también se encuentran involucradas dentro de una misma vía metabólica donde a partir de la tirosina se pueden sintetizar tanto DA, L-Dopa, NAD y AD.

Las enzimas MAO y COMT también regulan la función de NAD y AD, en consecuencia hay dos rutas diferentes de metabolismo, la primera implica la formación directa de derivados O-metilados de las catecolaminas que circulan en el flujo sanguíneo (figura 1.4), los cuales pueden ser excretados en la orina, o bien se oxidan formando el ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico (VMA). La segunda ruta metabólica implica la conversión de la NAD, presente en las terminaciones nerviosas, en derivados desaminados que son fisiológicamente inactivos como el ácido 3,4-dihidromandélico (DOMA) [5].

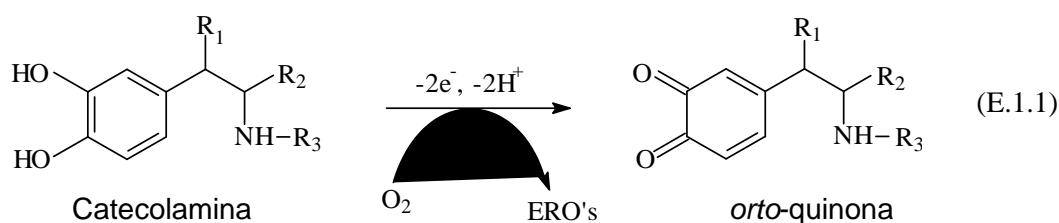


**Figura 1.4.** Función de las enzimas MAO y COMT en el catabolismo de la adrenalina y la noradrenalina

Finalmente, las catecolaminas son especies químicas susceptibles de formar las quinonas respectivas vía reacciones de oxidación. La posibilidad de que las quinonas de catecolaminas se encuentren vinculadas con el progreso del estrés oxidativo, que a su vez se asocia con la muerte celular, se ha propuesto por diversos autores [6,7].

## 1.2. Quinonas de catecolaminas

Debido a la relación que existe entre las quinonas de catecolaminas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, es de gran importancia el entendimiento de las reacciones en las cuales se ven involucradas. Se sabe que cuando las catecolaminas se oxidan forman las correspondientes *orto*-quinonas (E.1.1) junto con especies reactivas del oxígeno (ERO's) como resultado del metabolismo normal.



Las ERO's incluyen los radicales libres derivados del oxígeno como el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), o bien pueden ser especies químicas altamente reactivas como es el ión peróxido ( $O_2^{2-}$ ) o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), todas ellas poseen funciones dentro del organismo, reguladas por sistemas antioxidantes que disminuyen su concentración y reactividad cuando es necesario.

Principalmente las ERO's suelen ser subproductos de la respiración celular que procede en la mitocondria [8]. No obstante, cuando se pierde seriamente el balance entre la

producción de especies reactivas y la capacidad de defensa de las especies antioxidantes, se mantiene al organismo en un continuo estado de estrés oxidativo (EOx), que puede resultar ya sea en la adaptación del sistema o en la muerte celular (ver anexo A.1).

El origen de los factores que hacen que el balance se incline a un estado prooxidante puede ser tanto exógeno como endógeno. También está generalmente aceptado que el EOx está relacionado con diversos padecimientos y enfermedades neurodegenerativas, así como con procesos normales de envejecimiento.

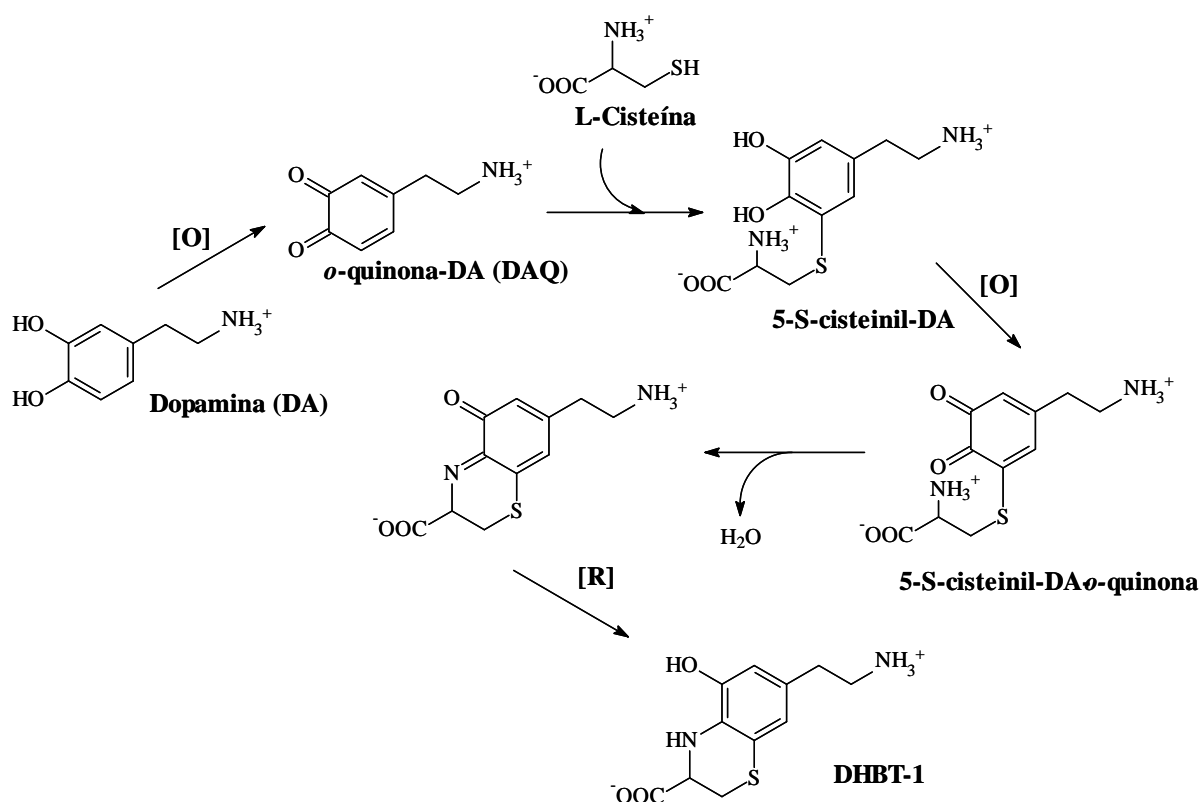
Si bien ha sido objeto de mucha atención el hecho de que el metabolismo de la dopamina produce especies reactivas del oxígeno (peróxido, superóxido, y radical hidroxilo), una mayor evidencia sugiere que los neurotransmisores por sí mismos juegan un papel directo en los procesos de neurodegeneración. Paradójicamente a lo que se mencionó en la sección anterior, también se ha demostrado que la dopamina es una molécula tóxica que contribuye a los desordenes neurodegenerativos como a la enfermedad de Parkinson.

La oxidación de la molécula de DA es catalizada por enzimas como la tirosinasa y xantina oxidasa, o bien, también ocurre por autooxidación. Estos procesos son espontáneos, y acelerados por la presencia de iones metálicos (tales como cobre, hierro y manganeso), produciendo una quinona reactiva que por su naturaleza deficiente en electrones, participa en reacciones de adición nucleofílica en las células.

Los grupos sulfhidrilo (tioles, R-SH) son los nucleófilos más fuertes presentes en la célula a pH fisiológico, por lo tanto son susceptibles a reaccionar con las quinonas de DA. Dicho grupo sulfhidrilo se encuentra predominantemente en el aminoácido cisteína, que puede existir como cisteína libre, o bien puede formar parte de la enzima glutatión u otras proteínas dentro de la célula.

La modificación covalente de las proteínas provocada por la quinona de DA, puede resultar en la inactivación de las mismas, dado que los grupos sulfhidrilo suelen localizarse en o cerca del sitio activo de algunas proteínas. Esta inactivación de proteínas es crítica en la viabilidad de la célula y parece ser el factor más importante en el mecanismo de toxicidad inducida por quinonas [9].

La reacción de adición nucleofílica entre la quinona de DA y el grupo sulfhidrilo ocurre predominantemente en la posición 5 del anillo formando 5-S-cisteinildopamina (figura 1.5), y en menor medida la adición ocurre en la posición 2 del anillo [10]. Los precursores que contienen el anillo de catecol y los metabolitos de DA, L-Dopa y DOPAC, también forman las quinonas respectivas bajo oxidación, que se unirán a residuos cisteinilo [11], [12].



**Figura 1.5.** Mecanismo de autoxidación de la dopamina en presencia de L-cisteína

En particular, las proteínas unidas a las membranas tales como las proteínas transportadoras de DA y glutamato son susceptibles a la inactivación, seguida de su exposición a quinonas de DA [13]. En todos los casos, la alteración de la función de las proteínas se previene por la presencia de glutatión (GSH), que es uno de los sistemas antioxidantes más importantes presentes en el organismo humano.

La tirosina hidroxilasa que participa en el paso limitante de la biosíntesis de catecolaminas, ha demostrado ser inactivada covalentemente tanto por quinonas de DA como de L-Dopa [14]. También se ha encontrado que las quinonas modifican covalentemente proteínas



dentro de la mitocondria, causando alteraciones en la síntesis de ATP y en la permeabilidad de la membrana, que conllevan a la muerte celular [15]. Además, la DA también muestra un potencial genotóxico a través de su habilidad para modificar y dañar el ADN [16].

Como se ha podido observar, las reacciones que transforman las catecolaminas en quinonas son en esencia reacciones de transferencia de electrones. Esta característica vuelve muy atractiva la idea de que este tipo de reacciones se estudie por medio de métodos electroquímicos, puesto que es posible controlar las condiciones del medio de reacción (pH, fuerza iónica, donadores de protones y puentes de hidrógeno, etc) y las condiciones de potencial para que éstas se lleven a cabo. De esta manera se logran simular las distintas situaciones que se establecen en los microambientes dentro del organismo humano.

### **1.3. Electroquímica aplicada al estudio de las catecolaminas.**

Por lo antes mencionado, las reacciones en las que se ven involucradas las catecolaminas han sido de gran interés para su estudio por medio de sistemas electroquímicos. De tal modo que se han empleado diversos métodos electroanalíticos para la determinación directa de una amplia variedad de especies químicas de interés biológico, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*.

A pesar de que algunos métodos electroquímicos son rápidos, sensibles y aportan una gran cantidad de información sobre las propiedades rédox de estas especies, presentan varios problemas durante su detección, los cuales derivan de:

- 1) reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de electrones
- 2) adsorción de sustancias químicas sobre la superficie del electrodo
- 3) interferencias debidas a la presencia de especies electroactivas con potenciales de oxidación semejantes, que son frecuentes cuando se estudian compuestos en medios complejos como lo son los fluidos biológicos.

Por consiguiente, se han desarrollado estrategias donde se adecuan las técnicas electroquímicas para obtener mejores resultados en cuanto a la selectividad, la resolución, el límite de detección y la conservación de las características de la superficie de los electrodos de trabajo empleados en cada caso.

Puesto que el comportamiento electroquímico de las especies químicas está intrínsecamente relacionado con su actividad biológica, se han estudiado las catecolaminas a partir de métodos electroanalíticos para su determinación en fármacos, o bien para monitorear este tipo de compuestos *in vivo* en el tejido nervioso [17].

En la determinación electroquímica de la dopamina (DA), el problema más recurrente que se presenta es la coexistencia de otras especies electroactivas en el sistema cerebral, como lo son el ácido ascórbico (AA), el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) [18] y otras catecolaminas, ya que pueden oxidarse electroquímicamente a potenciales cercanos al de la oxidación de dopamina; en el caso del AA y DOPAC son interferentes potenciales debido a que se encuentran en concentraciones mucho mayores que la DA en el sistema nervioso central [19].

Por una parte el AA es termodinámicamente más fácil de oxidar que la DA pero se sabe que su oxidación, en la mayoría de los tipos de materiales que constituyen la superficie de los electrodos, es por lo general más lenta que en el caso de DA. Además, la reacción homogénea entre el AA y la forma oxidada de la DA (E.1.4) es otro factor que dificulta la detección de DA a través de técnicas electroquímicas [20].



donde DHA simboliza al ácido dehidroascórbico que es la forma oxidada del ácido ascórbico. En las reacciones anteriores se demuestra que la DA se regenera mediante una reacción catalizada por el AA [20].

Para solucionar las dificultades presentes en los estudios electroquímicos de la dopamina, relacionados con la interferencia de otras sustancias electroactivas, se ha requerido del diseño de estrategias más sofisticadas, como el uso de electrodos de carbón vítreo modificados con una variedad de materiales. Por ejemplo, se realizó la fijación electroquímica de la colina y la acetilcolina [21] para la determinación de DA en presencia de AA y 5-HT, sin embargo la preparación del electrodo no es reproducible.

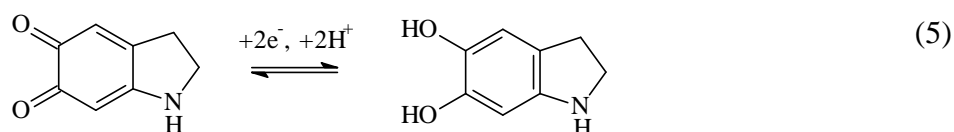
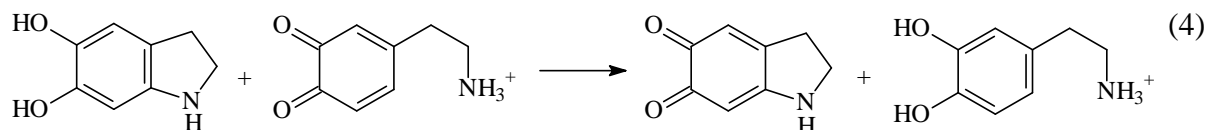
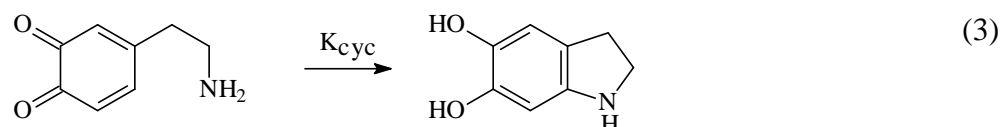
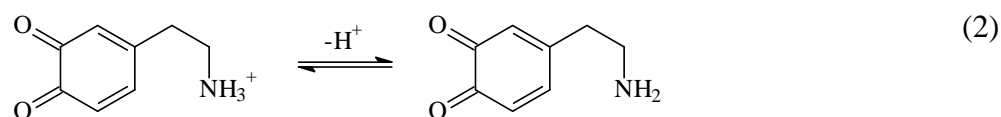
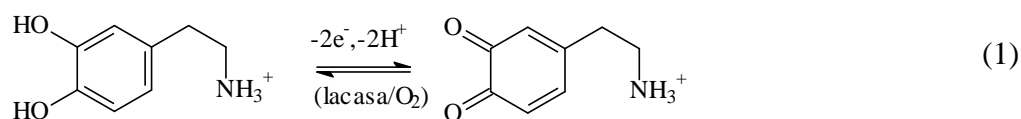
Los primeros electrodos utilizados para la detección *in vivo* de neurotransmisores fueron los electrodos metálicos, como el platino [22], con la desventaja de sufrir contaminación y pérdida de sensibilidad. En cuanto a materiales de carbón se han empleado microelectrodos de fibra de carbón para la determinación de DA y sus características de adsorción [23]; con electrodos de pasta de carbón se obtuvo información relacionada con la oxidación de DA para producir polímeros del tipo melanina [24].

También se han empleado electrodos de carbón vítreo modificados con ácido poli(*p*-aminobenzoico) [25],  $\beta$ -alanina [26], con un polímero tipo melanina [27] obtenido a partir de la polimerización de L-Dopa, para la determinación de DA en presencia de altas concentraciones de AA y DOPAC, o bien electrodos de platino con películas de politiofeno [28], electrodos de oro modificados con monocapas de N-acetilcisteína [29], materiales compuestos tipo carbón-polímero (PVC) [30]; inclusive se ha informado el uso de películas de diamante dopadas con boro [31] donde se obtuvo una separación de 0.2 V entre los potenciales de oxidación de DA y AA.

En general los electrodos empleados se basan en la diferencia de las propiedades químicas y electroquímicas entre la DA, el AA y DOPAC. Por ejemplo, a pH fisiológico normal la DA está cargada positivamente (pKa 8.8), mientras que el AA (pKa 4.1) y DOPAC (pKa 4.2) están cargadas negativamente [32,33]. Esta diferencia permite emplear membranas de intercambio iónico que cubran la superficie del electrodo para atraer a la DA mediante interacciones electrostáticas, y evitar así la presencia de especies químicas con carga negativa en la cercanía del electrodo durante la reacción de transferencia de electrones, este fenómeno es el principio usado en electrodos modificados con Nafión® [34,35] y películas poliméricas [36,37].

Recientemente se realizó un estudio que describe un nuevo método para la determinación selectiva de DA en coexistencia con AA y DOPAC, empleando biosensores electroquímicos

compuestos por nanotubos de carbón y por la enzima lacasa [38], que cataliza la oxidación de DA demostrando una alta selectividad. En este trabajo proponen un mecanismo de reacción adecuado a las características de reactividad de DA, en el cual se demuestra la posibilidad de que ocurran reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga (figura 1.6), donde la dopamina se oxida a su quinona respectiva (DAQ) por la actividad catalítica de la enzima lacasa y la consecuente reducción de  $O_2$ .



**Figura 1.6.** Reacciones de oxidación catalizada por la enzima lacasa, desprotonación, ciclización intramolecular y desproporción de la dopamina

La quinona producida puede seguir una reacción ácido-base con una constante de velocidad dependiente del pH (2). La forma quinoide desprotonada es relativamente reactiva, y puede sufrir fácilmente una reacción de ciclación intramolecular por el ataque del grupo amino sobre el anillo para generar la 5,6-dihidroxiindolina (leucocromo) (3), que después forma la quinona respectiva, mediante una reacción de desproporción con la quinona de la dopamina, DAQ, (4). Posteriormente, la 5,6-dihidroxiindolinquinona (aminocromo) puede ser reducida electroquímicamente (5) a un potencial diferente al de la DAQ.

Sin embargo, con todo ello aún son escasos los electrodos que han sido probados para la determinación de DA en fluidos biológicos, además en algunos casos no se considera la presencia de otras catecolaminas que por su semejanza estructural tienen potenciales de oxidación parecidos, ni tampoco la reacción homogénea con el AA.

Por otra parte, algunos de los electrodos mencionados anteriormente requieren de la preconcentración de las muestras o los métodos para prepararlos son complejos y los materiales costosos, por lo tanto su aplicación no es completamente factible para usarlos cotidianamente en el diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas.

Empleando los electrodos ya modificados también se han aplicado diversas técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica, la amperometría, cronoamperometría, la voltamperometría de pulso diferencial, entre otras.

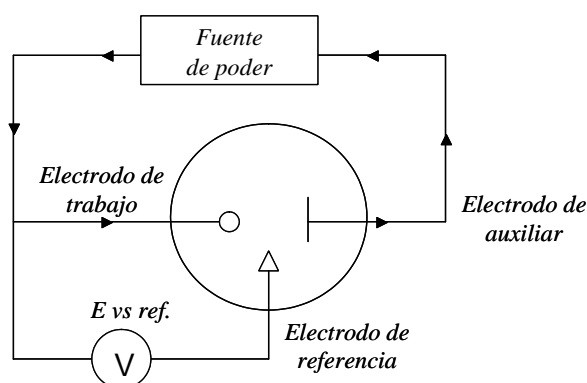
Estas técnicas difieren considerablemente con respecto a su sensibilidad, selectividad química, resolución temporal y el tipo de información proporcionada por cada una de ellas. Por ello es importante conocer los principios fundamentales que se siguen para estimular un sistema y los factores que influyen en la respuesta obtenida.

#### **1.4. Voltamperometría cíclica**

La voltamperometría cíclica (VC) durante muchos años ha sido la técnica a la que se recurre con mayor frecuencia en las pruebas electroquímicas, debido a su relativa simplicidad y a su gran aporte de información. Es por ello que se ha empleado en la determinación de las concentraciones de las catecolaminas aprovechando sus características electroactivas. En general la VC proporciona esencialmente información cualitativa de un proceso electródico, como reversibilidad del proceso, intervalo de potencial de trabajo y una rápida localización de los potenciales de oxidación y de reducción. También es potencialmente útil en el estudio mecanístico de reacciones que involucran transformaciones heterogéneas así como homogéneas.



El arreglo común para una celda electroquímica consiste en el uso de tres electrodos: 1) electrodo de trabajo, donde se efectúa el proceso de interés, 2) un electrodo de referencia, siendo su función establecer una diferencia de potencial con el electrodo de trabajo, y 3) un electrodo auxiliar también conocido como contraelectrodo que mantiene el flujo de electrones cerrando el circuito eléctrico como se muestra en la figura 1.7; es importante mencionar que en este último electrodo se lleva a cabo la reacción contraria a la que se observa en el electrodo de trabajo.

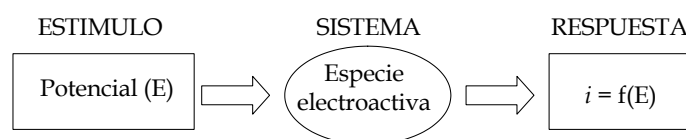


**Figura 1.7.** Esquema de una celda electroquímica con tres electrodos. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones cuando la reacción de interés es una reducción.

Los electrodos son sumergidos en una celda no dividida que contiene la solución del analito sin agitar, limitando así el transporte de masa a un régimen de difusión provocado por gradientes de concentración del analito inicial y de las especies electrogeneradas.

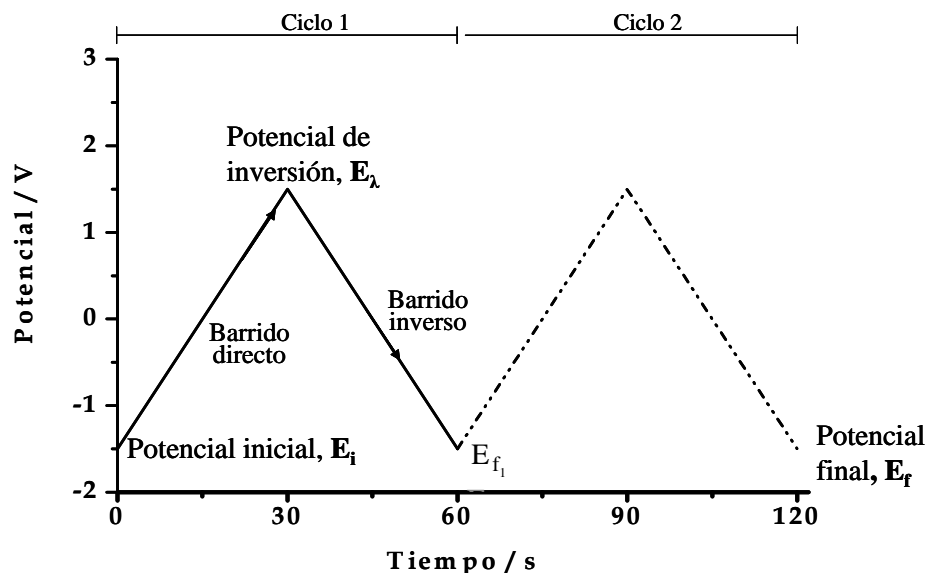
En los procesos de electrodo es esencial el modo de transferencia de masa, si la especie química que participa en la reacción electroquímica está en disolución, aquélla deberá difundir desde el seno de la disolución hasta la interfase electrodo-solución, donde sufre una transformación por ganancia o pérdida de electrones, y después ésta se aleja de dicha interfase. Esta situación se analizará con mayor detalle más adelante.

Ahora bien, los métodos electroanalíticos son parte de los métodos fisicoquímicos de análisis, por lo tanto se basan en los mismos principios de estimulación del sistema químico, el cual responde en función de sus características estructurales, reactivas y de concentración. [39]



**Figura 1.8.** Principio de estimulación en un sistema electroquímico a potencial controlado

El estímulo empleado en voltamperometría cíclica para efectuar una perturbación en la celda electroquímica es la aplicación continua de un potencial eléctrico, el cual se varía linealmente en función del tiempo (barrido lineal) a una velocidad constante ( $v$ ) representada por la pendiente de las rectas que se muestran en la siguiente figura.

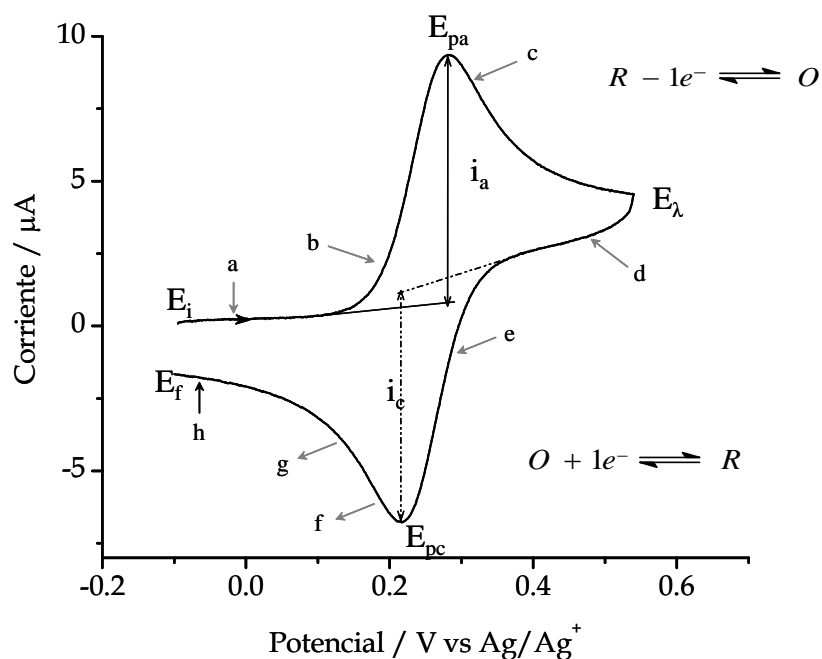


**Figura 1.9.** Señal de excitación aplicada en voltamperometría cíclica

El barrido se inicia en el potencial  $E_i$ , que debe situarse en un punto tal en el que no se altere el estado de oxidación de la especie electroactiva, al cual se le asocia un valor de corriente nula. Conforme se cambia el potencial es posible provocar una reacción de oxidación o de reducción, este fenómeno dependerá de las características intrínsecas del analito presente en la solución y del intervalo de potenciales del barrido (ventana de potencial). Como resultado de la transferencia de electrones se observa una corriente diferente a la del estado estacionario.

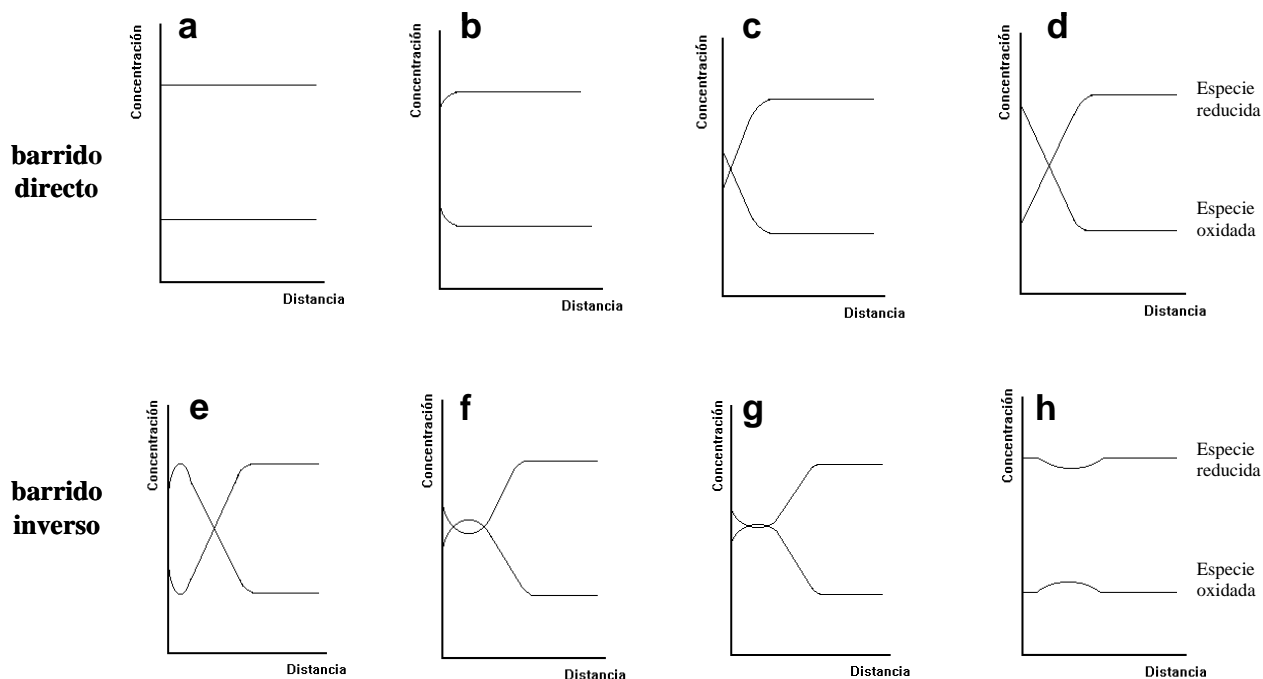
Al llegar a un cierto valor de potencial elegido,  $E_\lambda$ , se invierte el sentido del barrido. Para un sistema reversible, en el barrido inverso se busca que se lleve a cabo la reacción contraria a la del barrido directo, y como resultado también se obtiene un aumento en la intensidad de corriente.

Aunque el barrido de potencial frecuentemente se termina al final del primer ciclo ( $E_f$ ), se pueden realizar ciclos sucesivos, lo que justifica que se le denomine voltamperometría cíclica. De lo anterior, se elabora un gráfico de  $i = f(E)$  como el que se muestra en la figura 1.10.



**Figura 1.10.** Voltamperograma cíclico típico para una reacción reversible.

Las reacciones en la superficie del electrodo cambian la composición de la solución cercana a él, en comparación con el resto de la solución. Estos cambios son más claros cuando se confronta el voltamperograma cíclico con las gráficas de los perfiles de concentración que se muestran en la figura 1.11. Lo que se observa en cada paso son las variaciones de concentración de las especies oxidada (O) y reducida (R) en función de la distancia con respecto al electrodo, cuando la disolución permanece en reposo.



**Figura 1.11.** Perfiles de concentración asociados al voltamperograma de la figura 1.10

Si se tiene una disolución de una especie electroactiva en su forma reducida, antes de aplicar una diferencia de potencial, la concentración de R será la misma desde el electrodo hasta el seno de la disolución, mientras que la concentración de la forma oxidada es cero (figura 1.11a). Posteriormente, a medida que se barre el potencial hacia valores cada vez más positivos (potenciales anódicos), comienza a producirse la oxidación de R, provocando un rápido aumento en la corriente anódica de la curva corriente-potencial. El resultado neto de la transferencia de electrones es una disminución de [R] y un aumento de [O] en la cercanía del electrodo (figura 1.11b).

La relación entre las concentraciones de R y O antes descrita, se mantiene variando de tal manera que se satisface la ecuación de Nernst para cada potencial aplicado [40]:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]}{[R]} \quad (\text{E.1.5})$$

en donde se usan corchetes para indicar la concentración. Lo que se mide directamente es el potencial **formal  $E^{\circ}$  del par** rédox y se define como:

$$E^{\circ} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_O}{\gamma_R} \quad (\text{E.1.6})$$

En la ecuación anterior  $\gamma_O$  y  $\gamma_R$  son los coeficientes de actividad de la especie oxidada y reducida respectivamente, mientras que  $E^{\circ}$  es su potencial estándar. En este caso la fuerza iónica afecta los coeficientes de actividad, por lo tanto el potencial formal dependerá de las condiciones del medio de reacción.

Cuando la concentración de R en la superficie del electrodo es igual a la concentración de O, se deduce de la ecuación (E.1.5) que el potencial aplicado será igual al potencial formal del par rédox. Si se sigue aplicando un potencial lo suficientemente positivo con respecto al potencial formal, se agota completamente la especie R en la superficie del electrodo (figuras 1.11c-d). Sin embargo, debido a la existencia de un gradiente de concentraciones, donde [R] es mayor en el seno de la disolución que en la superficie del electrodo, el sistema tiende a homogenizarse de tal manera que las moléculas de la especie reducida se desplazan hacia la superficie del electrodo.

En este sentido, la distancia promedio que tienen que recorrer las moléculas de reactivo para llegar a la superficie del electrodo es cada vez mayor. En consecuencia la velocidad del transporte de masa decrece provocando una disminución de la corriente observada en el voltamperograma, esta relación está dada por:

$$v = \frac{i}{nFA} = v_{tm} \quad (\text{E.1.7})$$

En la ecuación anterior se observa que la velocidad de la reacción de electrodo ( $v$ ), cuando la transferencia de carga es rápida, dependerá únicamente de qué tan rápido llega la especie R a la superficie del electrodo, es decir, de la velocidad de transferencia de masa ( $v_{tm}$ ). Este efecto también se observa al analizar el perfil de concentraciones (figura 1.11).

A continuación, al invertir la dirección del barrido de potencial (barrido inverso), la oxidación prosigue como lo demuestra la corriente anódica y el perfil de concentración en (e), hasta que el potencial aplicado se hace lo suficientemente negativo como para causar la reducción de O acumulado en la superficie del electrodo. Dicha reducción viene señalada por la aparición de una corriente catódica,  $i_c$ . De nuevo, esta corriente aumenta a medida que el potencial se hace menos positivo, hasta que la reducción de O produce el agotamiento de esta especie en la región cercana al electrodo, regenerando a la especie R de la cual se partió, lo cual ocurre sólo si el sistema es reversible.

Como se puede observar, en el caso de la VC el efecto neto del barrido de potencial directo e inverso, sobre la concentración de la especie electroactiva en su estado de oxidación inicial, es casi nulo (figura 1.11h), volviendo a ésta la técnica ideal para ser utilizada cuando las cantidades de muestra para analizar son limitadas, por lo que se pueden hacer varios experimentos con una misma disolución.

Como se mencionó anteriormente, un sistema que contiene una especie electroactiva responde al estímulo aplicado, que corresponde a una diferencia de potencial en el caso de la VC en donde lo que se mide son los cambios de corriente que dependerán de diversos factores los cuales se analizarán en la siguiente sección.

#### **1.4.1. Factores que influyen en la corriente [41]**

La corriente que se obtiene como respuesta en voltamperometría cíclica depende de: a) la transferencia de carga (proceso faradaico), b) la velocidad de la transferencia de material electroactivo hacia la superficie del electrodo, y c) de los reactivos o los productos de la reacción de transferencia de carga que se acumulan o absorben sobre la superficie del electrodo que consecuentemente generan efectos resistivos y capacitivos (proceso no faradaico), que contribuyen a la intensidad de la corriente total ( $i_p$ ) observada experimentalmente en la curva corriente-potencial.



La transferencia de carga o el flujo de electrones es una respuesta al cambio de potencial asociado a la energía de los electrones, es decir, si el barrido de potencial se realiza hacia valores negativos se aumenta la energía de los electrones libres presentes en el electrodo, y eventualmente alcanzan un nivel de energía suficiente para ocupar sitios vacantes en la especie electroactiva. A este flujo de electrones del electrodo a la solución se le conoce como corriente de reducción o corriente catódica ( $i_c$ ).

De una manera semejante, la energía de los electrones puede disminuir por la imposición de un potencial más positivo, y en un punto dado los electrones de las especies electroactivas pueden encontrar un nivel de energía más favorable en el electrodo. El flujo de electrones de la solución al electrodo, es una corriente de oxidación o corriente anódica ( $i_a$ ). El potencial crítico al cual ocurren estos procesos de transferencia de carga es conocido como potencial estándar  $E^0$ .

La velocidad de una reacción electroquímica está determinada por aquella que tenga la menor constante de rapidez. Como ya se ha mencionado, si la transferencia de carga es muy rápida entonces la transferencia de masa representa un papel importante en la dinámica electroquímica. La transferencia de masa, es decir, el movimiento de materia desde un lugar a otro en la solución, surge de las diferencias de potencial químico o eléctrico entre dos posiciones, o del movimiento hidrodinámico.

Considerando lo anterior, se establece la ecuación de Nernst-Planck que describe el flujo de masa para la especie  $i$  como [42]:

$$J_i(x,t) = -D_i \frac{\partial C_i(x,t)}{\partial x} - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + C_i(x,t)v(x,t) \quad (\text{E.1.8})$$

donde  $J$  es el flujo ( $\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) a una distancia  $x$  de la superficie,  $D_i$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),  $\partial C_i/\partial x$  es el gradiente de concentraciones a una distancia  $x$  del electrodo,  $z_i F/RT$  es la movilidad de la especie iónica con carga  $z_i$  **provocada por  $\partial \phi/\partial x$  que es el** gradiente de potencial eléctrico establecido entre el ánodo y el cátodo,  $C_i$  es la concentración de la especie  $i$ ; mientras que  $v(x,t)$  es la velocidad en  $\text{cm/s}$  con la cual se mueve la especie electroactiva en la solución.

Analizando la expresión (E.1.8) se observa que el primer término, al lado derecho de la igualdad, representa la contribución al flujo de analito hacia el electrodo por un tipo de transferencia de masa conocido como *difusión*. Esto es, la sustancia electroactiva disuelta se mueve en disolución hacia las regiones de la misma donde su concentración sea menor.

El segundo término se asocia a la participación de la *migración*, provocada por atracciones electrostáticas, en el flujo de masa hacia el electrodo, siendo mayor dicha contribución cuanto mayor sea la movilidad del ion y la intensidad del campo eléctrico establecido entre los electrodos.

Finalmente, el último término representa una tercera forma del transporte de masa que contribuye al flujo denominada *convección*, donde hay movimiento de diferenciales de volumen a causa de gradientes de temperatura o bien por una agitación mecánica.

Normalmente en electroquímica analítica se busca minimizar la contribución al flujo de masa por migración, lo cual se logra adicionando un electrolito fuerte e inerte a la disolución, en una concentración por lo menos 100 veces mayor que la de la especie electroactiva, con el fin de dispersar el campo eléctrico generado por la diferencia de potencial entre un mayor número de partículas cargadas y su influencia sobre la especie química bajo estudio es despreciable.

Por esta razón, la ecuación (E.1.8) se transforma en otra más simple, donde sólo se considera la difusión y la convección:

$$J_i = -D_i \frac{\partial C_i}{\partial x} + C_i v \quad (\text{E.1.9})$$

Sin embargo, en voltamperometría cíclica el único proceso de transferencia de masa que se involucra es la difusión, al eliminar toda agitación en la solución manteniendo la temperatura constante durante cada experimento. De tal manera que la velocidad de transferencia de masa estará únicamente en función de la difusión. Por consiguiente, al reacomodar la ecuación (E.1.7) se obtiene:

$$i = nFAD \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (\text{E.1.10})$$

Para la cual se define  $i$  como la corriente faradaica,  $n$  es el número de electrones intercambiados por molécula,  $F$  la constante de Faraday,  $A$  es el área del electrodo de trabajo,  $D$  es el coeficiente de difusión y  $\partial C/\partial x$  corresponde al cambio en la concentración de la especie electroactiva en función de la distancia al electrodo. Además, el área del electrodo se mantiene constante, por lo tanto se puede expresar el resultado de la electrólisis mediante la densidad de corriente,  $j$ , independiente de  $A$  como:

$$j = nFD \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (\text{E.1.11})$$

Así pues, la magnitud de la corriente que se mide como respuesta es fundamental en el análisis electroquímico de una especie electroactiva puesto que es dependiente de las propiedades del sistema. No obstante existen otros parámetros que también pueden ser utilizados para determinar las características de las reacciones de transferencia de electrones, reacciones químicas acopladas y fenómenos de adsorción, en los distintos tipos de electrodos.

### 1.4.2. Parámetros voltamperométricos para el análisis de reacciones

#### electroquímicas [43]

En el análisis de la variación de los parámetros más importantes en voltamperometría cíclica, como resultado de los cambios en la velocidad de barrido y en la concentración del sustrato en el seno de la disolución ( $C_A^*$ ), se incluye a: el potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), el potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), diferencia entre los potenciales de pico ( $\Delta E_p$ ), diferencia entre los potenciales de semipico ( $\Delta E_{p/2}$ ), la corriente de pico anódico ( $i_{pa}$ ), la corriente de pico catódico ( $i_{pc}$ ), el cociente de las corrientes de pico y la función corriente ( $\Psi$ ), ya que proporcionan información útil para determinar las características principales asociadas con las reacciones electroquímicas y químicas.

Es relevante aclarar que el método para medir la corriente de pico,  $i_p$ , implica extrapolar una línea base desde un punto de corriente nula como se muestra en la figura 1.10. De esta manera no se considera la corriente generada por la polarización del electrodo (sobrepotencial), por lo tanto, cuando se disponga de la magnitud de  $i_p$  para establecer alguna relación con el sistema electroquímico esta será más precisa.

Un par rédox para el cual ambas especies intercambian rápidamente electrones con el electrodo de trabajo se denomina un par electroquímicamente reversible. Entonces el

potencial formal asociado a dichas especies se ubica a la mitad de los potenciales de pico, esto es:

$$E^{\circ} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (\text{E.1.12})$$

Además, para un sistema químico donde la reacción de transferencia de carga es reversible, la corriente de pico está relacionada con la velocidad de barrido y el número de electrones intercambiados, mediante la ecuación de Randles-Sevcik a 25 °C:

$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (\text{E.1.13})$$

donde  $C^*$  es la concentración en el seno de la disolución del compuesto que se reduce o se oxida en  $\text{mol cm}^{-3}$  y  $v$  es la velocidad de barrido de potencial en  $\text{V s}^{-1}$ . De acuerdo con esto, la intensidad de  $i_p$  se incrementa a medida que aumenta  $v^{1/2}$ .

Los valores de corriente de pico anódica y catódica deben ser idénticos para un sistema reversible (rápido), por lo tanto el cociente  $i_{pa}/i_{pc}$  será cercano a la unidad. Entre más alejado esté el valor del cociente de 1 el carácter irreversible del proceso electroquímico aumenta. Este parámetro es de gran importancia para determinar la presencia de reacciones químicas acopladas.

Otro criterio común para establecer la reversibilidad de un sistema rédox consiste en **determinar el  $\Delta E_p$**  (E.1.14), considerando que los coeficientes de difusión para la especie química en forma reducida y oxidada sean iguales. A partir de esta relación es posible calcular el número de electrones intercambiados en la reacción de electrodo.

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{0.059}{n} \quad (\text{E.1.14})$$

Cuando un par rédox es reversible entonces el **valor de  $\Delta E_p$**  es cercano a  $0.059/n$  volts y se aleja de este valor si el proceso es irreversible. La irreversibilidad electroquímica es una consecuencia de un intercambio electrónico lento entre la especie electroactiva y el electrodo.

Considerando los parámetros antes mencionados es posible establecer el tipo de reacciones que ocurren en la interfase electrodo-solución, aunque en ocasiones se recurre a otro tipo de técnicas analíticas para tener los elementos suficientes para proponer un mecanismo de reacción más cercano a la realidad. Las técnicas empleadas con mayor frecuencia son la cronoamperometría [44], la amperometría, la voltamperometría lineal, la coulombimetría, etc. Así mismo se ha encontrado una gran ventaja al usar las técnicas electroquímicas acopladas con aquéllas basadas en la absorción de luz como la espectroscopia de UV-visible o infrarroja, las cuales facilitan el análisis de los intermediarios de reacción y de los productos electrogenerados.

### **1.5. Espectroscopia de ultravioleta-visible**

La espectroscopia en general abarca el estudio de la interacción entre la materia y algún tipo de radiación electromagnética; a estos tipos de radiación se les asocia un intervalo de longitudes de onda que los caracteriza, aunque la naturaleza de todas las radiaciones es la misma y todas se desplazan a la velocidad de la luz, difieren en la frecuencia y la longitud de onda, así como en los efectos que producen sobre la materia. Los rayos cósmicos con longitudes de onda tan cortos como  $10^{-9}$  nm e incluso las ondas de radio con longitudes de onda superiores a los 1000 km son ejemplos de radiaciones que forman parte del espectro electromagnético [45].

Un tipo de radiación útil en las determinaciones analíticas son los rayos ultravioleta y la porción visible del espectro electromagnético. Los cambios que provocan estas radiaciones sobre la materia involucran las energías electrónicas de los átomos o moléculas, que absorben una cantidad específica dependiendo de sus características.

La absorción de la radiación UV-visible, por una especie atómica o molecular, es un proceso en dos etapas, la primera implica una excitación electrónica, y la segunda implica el término de la excitación por algún proceso de relajación, entre los cuales el más común es la conversión de la energía en calor [46].



Los compuestos orgánicos presentan transiciones de electrones  $n$ ,  $\pi$  y  $\sigma$  de un estado basal a un estado excitado, aunque no todas son permitidas. Aquéllas transiciones observables en la región de UV-visible corresponden a la transición  $n \rightarrow \sigma^*$  promovida por la radiación en la región de 150 a 250 nm, en compuestos saturados con átomos que tienen pares de electrones no compartidos ( $n$ ); otras dos posibles transiciones son de  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$  observables en el intervalo de 200 a 700 nm.

Los cambios en la energía de los electrones facilitan la caracterización de compuestos, al identificar los grupos funcionales con electrones que puedan seguir alguna de las transiciones antes descritas. También se realiza la cuantificación de alguna especie química en solución mediante la ley de Lambert-Beer, la cual muestra una dependencia lineal entre la absorbancia de dicho compuesto y su concentración mediante la siguiente ecuación [47]:

$$A = \varepsilon b C \quad (\text{E.1.15})$$

donde  $A$  es la absorbancia,  $\varepsilon$  define la constante de absortividad molar,  $C$  la concentración molar de la especie de interés y  $b$  es la longitud de la trayectoria que recorre la radiación a través de la solución, dada en cm.

Durante el progreso de una reacción se pueden aprovechar las características de la espectroscopia de UV-visible antes mencionadas para monitorear la concentración y los cambios en la estructura de los compuestos involucrados. Es por ésta razón que durante

mucho tiempo también se ha empleado la espectroscopia en el análisis de intermediarios y productos de reacciones electroquímicas, y así es posible identificar especies químicas electrogeneradas con el fin de validar los mecanismos de reacción propuestos.

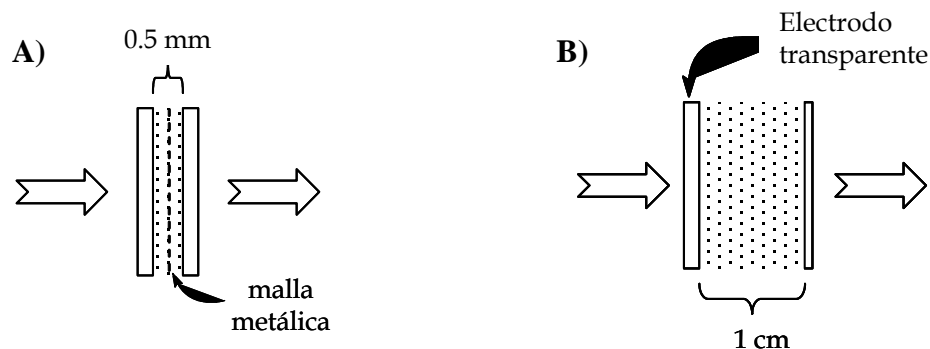
### **1.6. Espectroelectroquímica** [48,49]

La electroquímica y la espectroscopia UV-visible son dos técnicas distintas pero que al usarse simultáneamente se obtiene información para analizar con mayor detalle el comportamiento redox de compuestos inorgánicos, orgánicos o de moléculas de interés biológico. Esta técnica conjunta es conocida como espectroelectroquímica UV-visible. Por una parte, los estados de oxidación de las especies químicas son modificados electroquímicamente, mientras que las mediciones espectroscópicas se obtienen *in situ* de la solución cercana al electrodo de manera paralela y continua.

El desarrollo inicial de la espectroelectroquímica fue estimulado por la disponibilidad de electrodos **ópticamente transparentes (EOT's)**, que permiten el paso de la luz directamente a través del mismo y de la solución adyacente. La clasificación de estos electrodos se basa en la forma en que permiten el paso de la luz a través de los mismos, y del material del que están constituidos. Un primer grupo consiste en mallas muy delgadas de metales tales como el oro, platino y plata, que deben su transparencia a los huecos que se forman entre los hilos de metal que conforman la red, y generalmente permiten la transmitancia del 80 % de la luz que incide en ellos.

Otro tipo de electrodos transparentes incluyen películas delgadas de materiales conductores (Pt, Au, SnO<sub>2</sub>, C) depositadas sobre un sustrato transparente como el vidrio o el plástico (útil sólo para el análisis en la región visible), o cuarzo (para la región UV-visible), y se seleccionan para su uso dependiendo de la región espectral aplicada para irradiar la muestra. La transparencia (20-85%) de estos electrodos se debe al escaso grosor de la película conductora (100- 5000 Å). Por último, también se pueden usar electrodos reticulados de carbón vítreo que funcionan de una manera semejante a las mallas metálicas.

La clase de electrodo así como el tipo de celda y la técnica electroquímica a emplear se combinan dependiendo de la información que se requiera obtener de los procesos electroquímicos, ya sea la identificación de especies o bien para la determinación de parámetros cinéticos asociados a las reacciones de interés, al medir los cambios de absorbancia en función del tiempo. Un experimento típico se realiza en una celda como la que se muestra en la figura 1.12B, en la cual el electrodo está en contacto con la solución electrolítica que tiene un espesor mayor al de la capa de difusión adyacente al electrodo, de tal manera que se presenta una difusión semi-infinita de la especie electroactiva hacia el electrodo.



**Figura 1.12.** Técnicas espectroelectroquímicas en A) celda de capa fina y B) en una celda convencional para experimentos de difusión semi-infinita

La técnica de espectroelectroquímica de difusión semi-infinita, ha sido utilizada primordialmente para estudiar reacciones químicas rápidas en fase homogénea de una especie electrogenerada. Los principios de esta técnica pueden ilustrarse si se considera una solución en contacto con un EOT, donde en un principio está presente la especie R y después es convertida en la especie O, al aplicar un pulso a potencial constante de magnitud suficiente para efectuar una electrólisis en la región limitada por la difusión, donde se observa la dependencia de la concentración de R con la distancia al electrodo. Entonces al hacer incidir luz UV-visible y si R es el único cromóforo en la longitud de onda analizada, la absorbancia total a cualquier tiempo se describe mediante la ecuación de Cottrell:

$$A = \frac{2}{\pi^{1/2}} \epsilon_O C_R^* D_R^{1/2} t^{1/2} \quad (\text{E.1.16})$$

donde  $\epsilon_o$  es la absorptividad molar de la especie O que se detecta ópticamente, mientras que  $C_R$  y  $D_R$  son la concentración de la disolución y el coeficiente de difusión de la especie R respectivamente. La ecuación anterior establece el caso límite en el cual el producto de la reacción electroquímica es completamente estable. No obstante, si alguna reacción química homogénea tiende a disminuir la concentración del producto O, se observará una relación diferente entre la absorbancia y el tiempo.

Otra de las técnicas frecuentemente utilizada es la espectroelectroquímica en capa fina, que ofrece una forma de controlar el estado de oxidación de una especie electroactiva en un volumen muy pequeño de solución, mientras se obtienen espectros de absorción simultáneamente. El diseño de la celda se muestra en la figura 1.12A, la cual debe tener por lo general un espesor dentro del intervalo de 0.05 a 0.5 mm, que será la longitud de la trayectoria que recorra el haz de luz que se hace incidir. Asimismo, se pueden emplear distintas técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica, coulombimetría o hacer una macroelectrólisis.

La ventaja particular de usar la técnica en capa fina es que la macroelectrólisis se finaliza en unos pocos segundos, así que (para sistemas químicamente reversibles) toda la solución alcanza rápidamente un equilibrio con el potencial de electrodo, y los datos espectrales pueden obtenerse de la solución que tendrá una composición constante. Por lo tanto, se pueden obtener los valores del potencial **formal  $E^\circ$**  y el número de electrones intercambiados de un par rédox.

Conjuntamente el análisis en capa fina permite el estudio de reacciones químicas homogéneas de un reactivo electrogenerado. En este caso, se aplica un potencial a la celda durante un tiempo (se sugieren 30 s) para convertir completamente la especie R presente en solución a la especie O. El electrodo es entonces desconectado y la reacción homogénea de la especie O se monitorea ópticamente por el paso de luz a través del electrodo y la solución.

Finalmente, todas las técnicas antes descritas demuestran el esfuerzo realizado para mejorar los métodos de análisis, que permiten establecer los mecanismos de reacción tanto de moléculas simples como de sistemas más complejos, los que a su vez pueden servir para tener un conocimiento más completo acerca de la estructura y la función de los organismos vivos.

## **IV. Hipótesis**

Las catecolaminas son neurotransmisores u hormonas involucradas en diversos procesos metabólicos dentro del organismo humano, en donde gran parte de la química de estos compuestos se basa en reacciones de transferencia de electrones. A partir de modelos de estudio de estrés oxidativo, como el provocado por la exposición a ozono, se sabe que la presencia de quinonas generadas mediante la oxidación de catecolaminas está relacionada con el daño celular provocado durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Así es de esperarse que un estudio electroquímico, tanto en plasma sanguíneo como en medio acuoso en condiciones experimentales controladas, permita establecer una relación entre la actividad biológica de las catecolaminas, la facilidad con la cual se oxidan y su estructura química. Esto se propone con el fin de establecer las bases para el desarrollo de sistemas de detección y diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas.

## **V. Objetivo general**

Precisar la estabilidad de quinonas electrogeneradas a partir de la oxidación de dopamina, noradrenalina, adrenalina y L-Dopa, mediante el análisis de su comportamiento electroquímico en plasma sanguíneo de ratas Wistar y en medio acuoso con un amortiguador de pH 7. Con el fin de establecer las bases para el desarrollo de sistemas de detección y diagnóstico de enfermedades como el Parkinson.

## **Objetivos particulares**

- Analizar vía electroquímica el plasma sanguíneo de ratas Wistar, que fueron expuestas a una atmósfera de ozono con la finalidad de provocar condiciones de estrés oxidativo en su organismo.
  
- Determinar la influencia que tienen las diferentes estructuras químicas de las catecolaminas, en su comportamiento electroquímico mediante voltamperometría cíclica.
  
- Emplear la técnica de espectroelectroquímica para el análisis de los posibles intermediarios que se pueden formar durante el proceso de oxidación.



# Capítulo 2

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

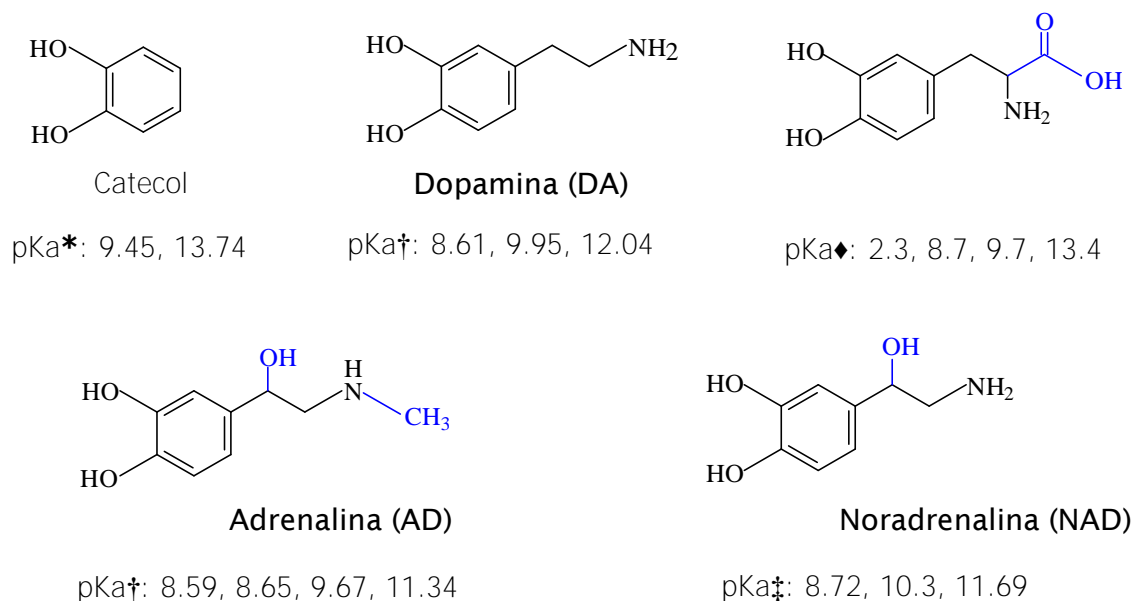


## 2. Desarrollo Experimental

### 2.1. Reactivos

El 1,2-Dihidroxibenceno (catecol), la 2-(3,4-dihidroxifenil)etanamina (dopamina, DA), la 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina (L-Dopa), (1R)-(-)-1-(3,4-dihidroxifenil)-2-(metilamino)etanol (adrenalina, AD), (1R)-(-)-1-(3,4-dihidroxifenil)-2-aminoetanol (noradrenalina, NAD), así como las sales  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

El catecol se purificó mediante sublimación a una temperatura de 80 °C, obteniendo cristales de color blanco que se almacenaron en un vial limpio, seco y protegido de la luz para evitar su oxidación.



**Figura 2.1.** Estructuras de especies químicas derivadas del catecol y sus valores de pKa [\*50, †51, ♦52, † 53, ‡ 54 ]

La alúmina utilizada para el pulido de los electrodos con un tamaño de partícula de 0,05 micras fue marca Buehler.

## **2.2. Preparación de las soluciones**

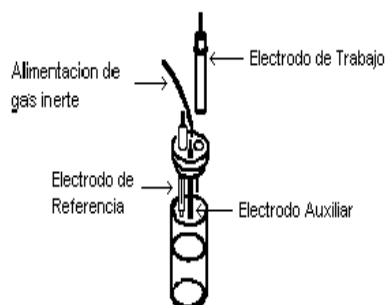
La solución amortiguadora de fosfatos de concentración 0,1 M, se preparó pesando las cantidades necesarias de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  para obtener pH 7, usando como disolvente agua desionizada. Posteriormente, se burbujeó con  $\text{N}_2$  durante 40 minutos y se determinó el valor de pH.

En el caso de las soluciones de los analitos, se prepararon pesando la cantidad de cada compuesto, de tal manera que se obtuviera una concentración 1 mM, al aforar en un matraz de 5 mL con la solución amortiguadora de pH 7, que se preparó el mismo día y a la que previamente se burbujeó con  $\text{N}_2$ .

## **2.3. Instrumentación**

### **2.3.1. Análisis electroquímico**

Los estudios de voltamperometría cíclica (VC) se realizaron en un analizador Epsilon Bioanalytical Systems (BAS), conectado a una computadora que contenía un software del mismo nombre, para ajustar los parámetros necesarios y graficar. Se montó una celda simple de vidrio con un arreglo de tres electrodos, como electrodo de trabajo se empleó un electrodo de carbón vítreo con una superficie de  $0.2827\text{cm}^2$ .



**Figura 2.2.** Celda para experimentos de electroquímica

El electrodo auxiliar fue un alambre de platino de 5 cm de longitud y como electrodo de referencia el sistema Ag/AgCl. Los electrodos antes mencionados fueron marca BAS.

### 2.3.2. Preacondicionamiento de los electrodos

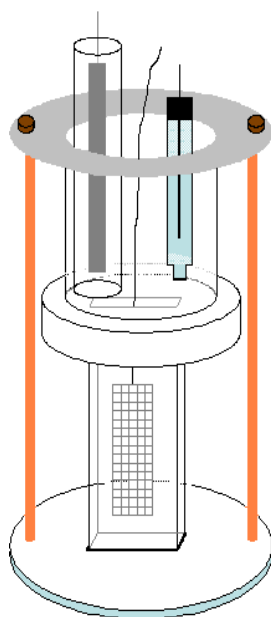
Antes de comenzar a usar el electrodo de carbón vítreo, se sometió a un proceso de pulido; para ello, se usó un paño de nylon marca Buehler, sobre el cual se colocó inicialmente una gota de una solución de polvo de diamante con tamaño de partícula de **15  $\mu\text{m}$  marca BAS**, después se ubicó el electrodo sobre la gota formando un ángulo de  $90^\circ$  moviéndose manualmente describiendo círculos pequeños durante 1 minuto, posteriormente se limpió con agua destilada, se secó con un papel adsorbente y se repitió el mismo procedimiento pero ahora con soluciones de diamante con tamaño de partícula de 6, 3 y 1  $\mu\text{m}$ .

Por último, antes de cada medición, se pulió la superficie del electrodo, colocando una cantidad de alúmina en una tela acojinada, adicionando agua destilada hasta obtener una consistencia pastosa, y se volvieron a hacer movimientos circulares presionando ligeramente el electrodo sobre la mezcla de alúmina/agua durante 1 minuto. Con este procedimiento la superficie del disco de carbón vítreo adquiere una apariencia similar a la de un espejo.

Por otra parte, el electrodo de referencia se mantiene en una solución de NaCl 3 M mientras no se utiliza, y se sumerge en el medio de trabajo 20 minutos antes de iniciar los experimentos para saturarlo.

### **2.3.3. Análisis espectroelectroquímico**

Los espectros de UV-Visible fueron obtenidos en un espectrofotómetro Agilent 8453 acoplado a un potencióstato BAS 100, esto se logró al emplear una celda espectroelectroquímica diseñada y armada en el laboratorio de Electroquímica Molecular de la Facultad de Química de la UNAM por el pasante de la carrera de Química, Pedro Díaz de León Luna. Ésta consiste en una celda de cuarzo de 1mm de paso óptico en la cual se sumerge una malla de platino como electrodo de trabajo, se empleó fibra de carbono dispuesta en un compartimiento separado como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como referencia (figura 2.3).



**Figura 2.3.** Celda para experimentos de espectroelectroquímica

#### **2.4. Metodología para voltamperometría cíclica**

Para efectuar los experimentos de voltamperometría cíclica (VC), se colocan 10 mL de la solución amortiguadora de pH 7, previamente burbujeada con  $N_2$ , en la celda electroquímica con los tres electrodos para obtener un voltamperograma cíclico desde 1.5 a -1.5 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s, con el propósito de ajustar la ventana de trabajo y comprobar que se haya eliminado el oxígeno del medio electrolítico.

Posteriormente, con la misma solución que se tienen en la celda, se preparan 5 mL de la solución del analito correspondiente, y se coloca en otra celda de vidrio limpia; primero se

hace la compensación de caída ohmica y se determinan los valores de potencial de inicio (valor a corriente nula), de inversión y el final, de tal manera que se puedan observar las ondas asociadas a los procesos de oxidación y de reducción de la especie estudiada. Estos pasos se repiten para cada compuesto.

A continuación, se hizo el estudio por voltamperometría cíclica a velocidades de barrido de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 y 10000 mV/s, para el catecol, la dopamina, la L-DOPA, la adrenalina y la noradrenalina.

## **2.5. Análisis electroquímico de plasma de ratas**

Las muestras de plasma sanguíneo de ratas fueron proporcionadas por la Dra. Selva Rivas A. del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UNAM. Se tuvieron 3 grupos de ratas machos Wistar de 250 g, un primer grupo fue el control del experimento y los otros dos se mantuvieron con exposición a 0.25 ppm de O<sub>3</sub> durante 4 horas diarias hasta completar 30 y 60 días respectivamente. Después del tiempo señalado se obtuvo la sangre de cada rata por degollación y se centrifugó para separar el plasma, el cual se dividió en muestras individuales de 2 mL que fueron congeladas hasta su análisis. Previo a cada experimento la muestra únicamente se descongeló lentamente y se vertió en una celda electroquímica de bajo volumen. Posteriormente se desplazó el oxígeno del medio mediante un flujo de nitrógeno constante durante 15 minutos. Las determinaciones

electroquímicas se realizaron con el mismo sistema convencional de tres electrodos aplicando una velocidad de barrido de 100 mV/s.

## **2.6. Estudio espectroelectroquímico**

Se hicieron curvas de calibración para cada una de las catecolaminas, así como de 5-HT y del catecol, preparando soluciones en buffer de fosfatos 0,1 M a pH 7. Posteriormente, se hicieron soluciones de las catecolaminas manteniendo una serie con exposición a la luz y otro sin exposición a la luz, se obtuvo un espectro de absorción en el intervalo de 190 a 1100nm aproximadamente cada hora, con el objetivo de comprobar su estabilidad en solución. Los resultados representativos del análisis descrito anteriormente se presentan en los anexos 3 y 4.

Con respecto al estudio espectroscópico de la electrooxidación de las catecolaminas, se prepararon 10 mL de una solución del analito a una concentración 1mM. Se monta la celda (figura 2.3) y se adiciona la solución a electrolizar teniendo cuidado de que no queden burbujas de aire en el paso del haz de luz del espectrofotómetro. Primero se obtiene un espectro de UV-visible. Posteriormente, se inicia la electrólisis a potencial controlado, el cual se establece aproximadamente a 120 mV después del potencial  $E_{pa}$  (información obtenida a partir de voltamperometría cíclica), y se van monitoreando los cambios obteniendo espectros de UV-visible cada 2 segundos hasta completar 1800 s.



# Capítulo 3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



### **3. Resultados y discusión**

En general, el hecho de poder ampliar el conocimiento del comportamiento redox de las catecolaminas y la influencia que ejercen sobre él factores como el pH, la fuerza iónica, las interacciones de tipo puentes de hidrógeno, así como las propiedades intrínsecas de estas especies químicas, es de gran relevancia en la ciencia debido al impacto que esto tendría en un mediano plazo sobre el mejoramiento de la calidad de vida, en particular de personas con enfermedades neurodegenerativas, ya que existe una relación extensamente estudiada entre las propiedades electroquímicas de diversos compuestos y su actividad biológica.

Como se ha mencionado anteriormente, se considera que la determinación de catecolaminas en fluidos biológicos y en especial la identificación de sus metabolitos oxidados, puede ser un medio para la detección temprana de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. En consecuencia, para esta investigación se recurrió al uso de técnicas electroquímicas para el estudio de especies oxidadas derivadas de las catecolaminas, en plasma sanguíneo y en medio amortiguado de fosfatos a pH 7. También se realizaron pruebas espectroscópicas de UV-visible en medio acuoso con el propósito de comprobar la estabilidad de dichas catecolaminas. Además se acopló un potenciostato a un espectrofotómetro de UV-visible para detectar simultáneamente los intermediarios formados durante su oxidación electroquímica.

### **3.1. Determinación de especies oxidadas en plasma de ratas expuestas a ozono**

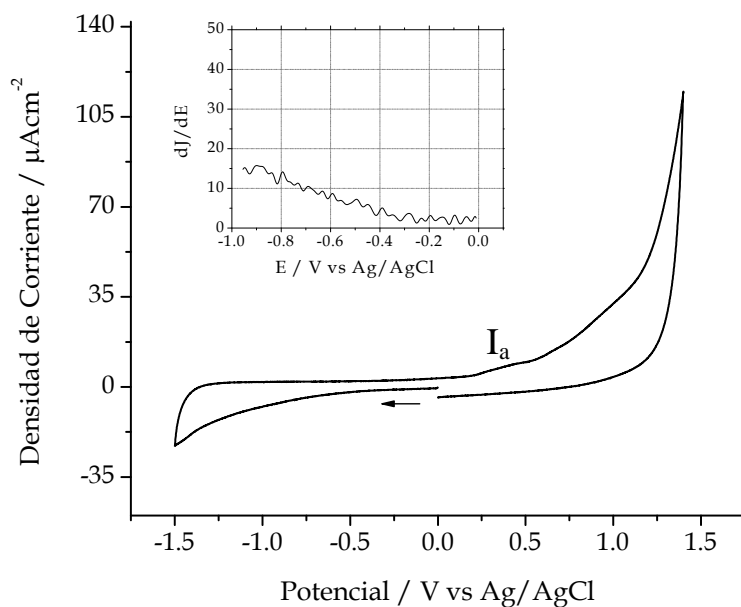
Previamente se ha presentado evidencia donde se comprueba que la exposición de ratas a dosis bajas de ozono puede ocasionar un daño oxidativo específico en las neuronas dopaminérgicas, similar al encontrado en pacientes con enfermedad de Parkinson [1], ya que los resultados de estas investigaciones indican la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas.

El ozono es una molécula capaz de producir condiciones oxidativas en el organismo, favoreciendo la producción de **ERO's** y es posible que contribuya a la formación de quinonas derivadas de las catecolaminas. Por consiguiente, se decidió usar este método como un modelo de estudio aplicando la técnica de voltamperometría cíclica (VC) para determinar especies electroactivas en el plasma.

El plasma se obtuvo de tres grupos compuestos cada uno por 6 ratas Wistar machos, dos de los cuales fueron expuestos en una cámara de ozono a una concentración de 0.25 ppm durante 4 horas al día, hasta completar 30 días para el primer grupo y 60 días para el segundo. El tercer grupo de ratas se mantuvo durante este tiempo bajo las mismas condiciones pero sin exposición a ozono. Todo el proceso indicado anteriormente se realizó en el departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por el M en C. Darío Santiago Alfonso López bajo la dirección de la Dra. Selva Rivas como parte del

proyecto de Doctorado con el título "Efectos del estrés oxidativo causado por exposición crónica a ozono sobre la vía metabólica de la dopamina en ratas".

Una vez que se obtuvo el plasma se realizaron las pruebas electroquímicas correspondientes. Inicialmente se hicieron mediciones en el plasma del grupo de ratas sin exposición a ozono. Por medio de la voltamperometría cíclica se obtuvo que el plasma muestra una ventana electroactiva de -1.5 a 1.4 V vs Ag/AgCl y una resistencia de aproximadamente 200 ohms. El voltamperograma típico de plasma control (figura 3.1) muestra una onda  $I_a$  que se asocia a la oxidación de las especies electroactivas presentes en el plasma en su forma reducida.



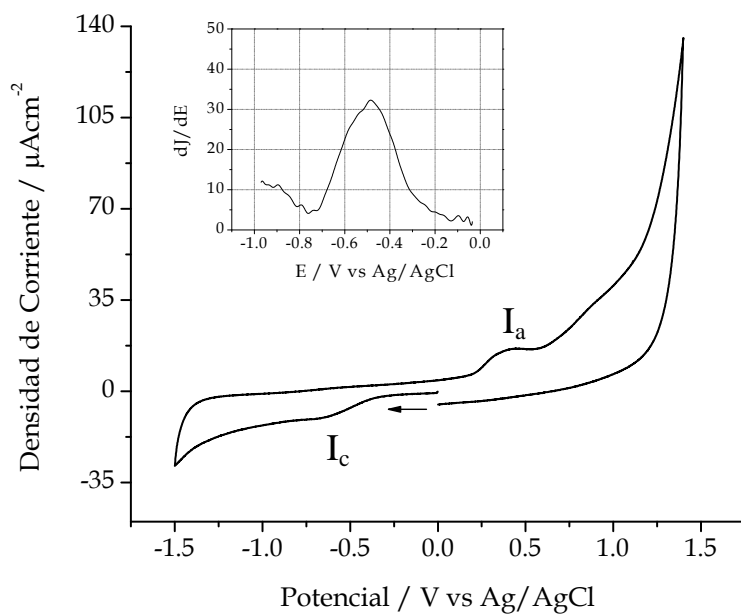
**Figura 3.1.** Voltamperograma cíclico típico de plasma de ratas del grupo control. Velocidad de barrido 100 mV/s. El inserto muestra la gráfica correspondiente a la primera derivada del barrido catódico con respecto al potencial de electrodo.

Por otra parte, para analizar con mayor detalle la zona de potenciales catódicos (reacciones de reducción) se obtuvo la primera derivada o cambio de la densidad de corriente ( $\Delta J$ ) en función del potencial aplicado, a partir de los resultados del voltamperograma cíclico que se muestra en el inserto de la figura 3.1. Así se comprueba que el plasma de ratas control (jóvenes y sin exposición a ozono) no contiene especies oxidadas detectables para las condiciones y características de la voltamperometría cíclica.

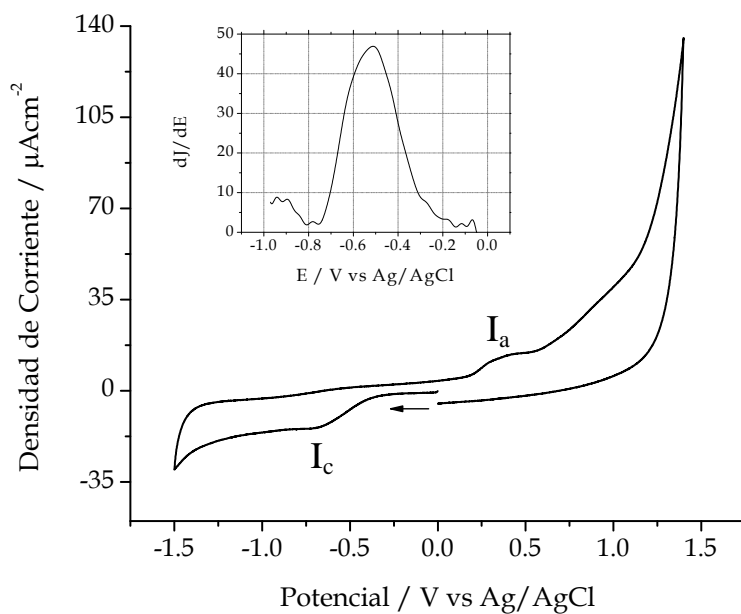
Es muy importante observar que los experimentos de voltamperometría cíclica se realizaron sin la adición de electrolito soporte y que el plasma sanguíneo presentó una buena conducción iónica, lo que hizo posible llevar a cabo estos experimentos sin una manipulación excesiva de las muestras.

A continuación se repitió el mismo procedimiento con el plasma obtenido de ratas expuestas a ozono durante 30 y 60 días. En los voltamperogramas cíclicos correspondientes a cada uno de los tiempos de exposición a ozono (figuras 3.2 y 3.3 respectivamente), se aprecia una onda  $I_a$  de mayor intensidad en comparación con el control, esto se debe a la contribución de las especies que anteriormente fueron reducidas en el potencial de la onda  $I_c$ .

Es importante notar que la densidad de corriente de la onda  $I_c$  aumenta conforme se extiende el periodo de exposición a ozono, lo cual se observa claramente en las gráficas de primera derivada.



**Figura 3.2.** Voltamperograma cíclico típico de plasma de ratas expuestas a ozono durante 30 días. Velocidad de barrido 100 mV/s. El inserto muestra la gráfica correspondiente a la primera derivada del barrido catódico con respecto al potencial de electrodo.

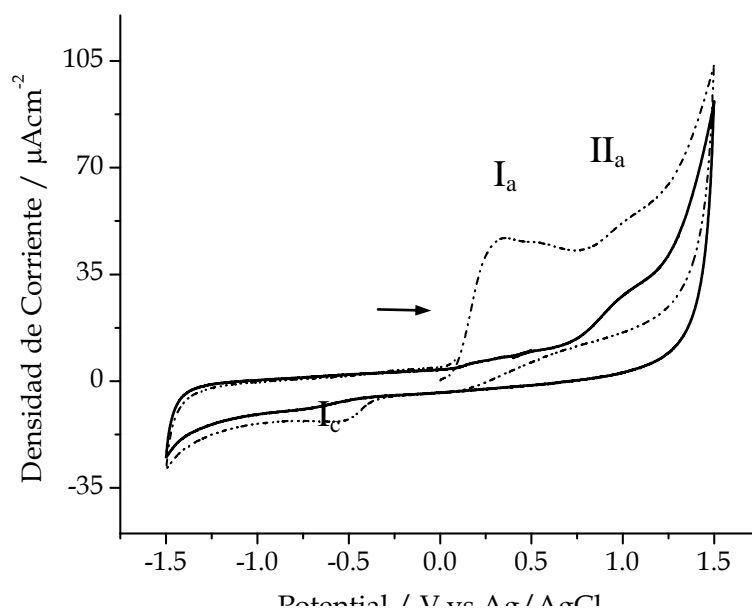


**Figura 3.3.** Voltamperograma cíclico típico de plasma de ratas expuestas a ozono durante 60 días. Velocidad de barrido 100 mV/s. El inserto muestra la gráfica correspondiente a la primera derivada del barrido catódico con respecto al potencial de electrodo.

Con el comportamiento observado en los voltamperogramas podemos confirmar que la producción selectiva de especies oxidadas es desencadenada por el  $O_3$ , ésta respuesta se incrementa con el tiempo de exposición. Sin embargo, para comprobar la posible relación con los procesos rédox de las catecolaminas se realizó el estudio que se presenta en la siguiente sección.

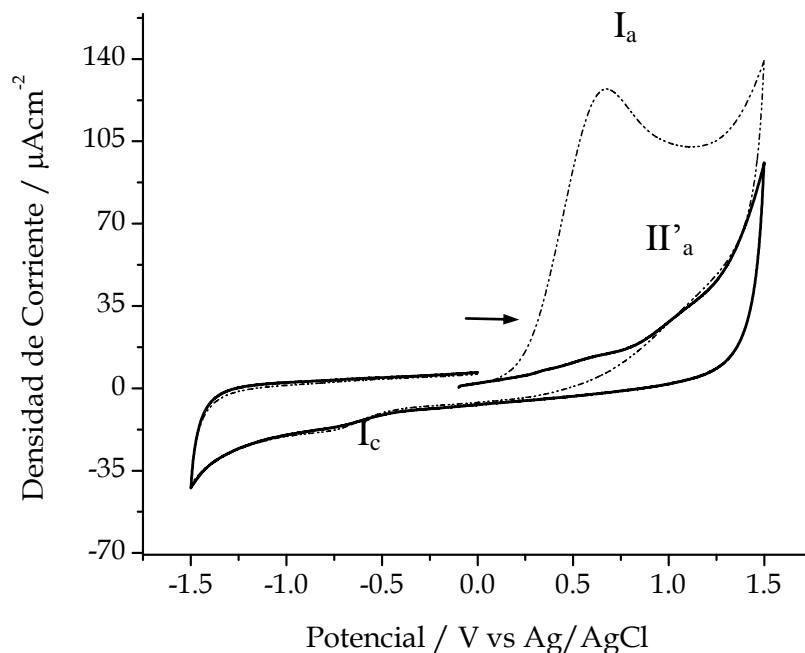
### 3.1.1. Adición de catecolaminas en plasma de ratas control

Con la intención de identificar las especies probables que se pueden estar reduciendo u oxidando en los potenciales observados en las muestras de plasma sanguíneo de ratas expuestas a ozono, se hicieron adiciones de DA, AA y L-Dopa en plasma de ratas control. Antes de cada adición se obtuvo únicamente el voltamperograma del plasma para diferenciar las señales producidas al agregar cada compuesto.



**Figura 3.4.** Voltamperogramas cíclicos de a) (—) plasma control de ratas sin exposición a ozono y b) (---) con 1.05 mM de DA. C vítreo como electrodo de trabajo, v: 100 mV/s

Cuando se adicionó DA hasta una concentración de 1.05 mM a una muestra de plasma del grupo de ratas control, se obtuvo el voltamperograma de la figura 3.4b, en él se observa una onda  $I_a$  en 0.356 mV que corresponde al potencial de oxidación de la dopamina. En el voltamperograma de plasma sin DA (figura 3.4a) también se observan las mismas ondas pero de menor intensidad, debido a la presencia de especies electroactivas en el plasma como era de esperarse. Así la onda  $I_c$  del control (blanco) está vinculada a la reducción de las especies electrogeneradas en el barrido directo (o de oxidación). Entonces se aprecia que al adicionar la DA ésta se oxida y se reduce en los potenciales de las ondas  $I_a$  y  $I_c$  respectivamente.



**Figura 3.5.** Voltamperograma cíclico de a) (—) plasma control de ratas sin exposición a ozono y b) (---) con 3.78 mM de ácido ascórbico. C vítreo como electrodo de trabajo, v: 100 mV/s



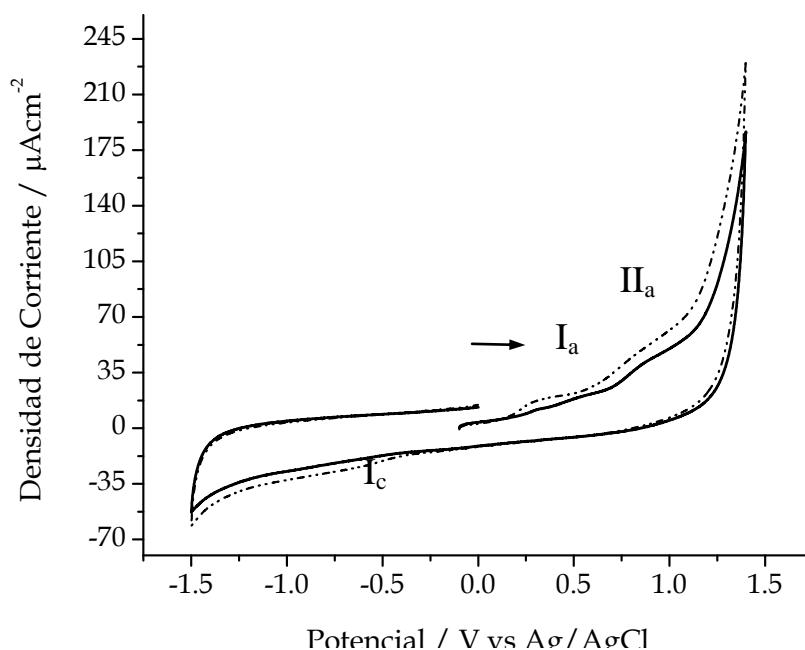
Posteriormente, en otra muestra de plasma control se adicionó AA de tal manera que se obtuvo una concentración 3.78 mM, que es mayor a la concentración adicionada de DA, para simular la relación en la que se encuentran en el organismo humano. Esta diferencia de concentraciones ha sido motivo de diversas investigaciones, por lo cual se considera que el AA es el mayor interferente en las determinaciones electroquímicas.

Sin embargo, con el voltamperograma obtenido de AA en plasma (figura 3.5b), se observa que el potencial de oxidación del AA es de 675 mV. Por lo tanto, en este medio de trabajo sí existe una diferencia de aproximadamente 0.3 V entre los potenciales de oxidación del AA y el de DA, aunque la amplitud de las ondas de oxidación puede disminuir la resolución de las señales. Por supuesto aún no se debe de olvidar que existe una reacción en fase homogénea entre el AA y la DAQ reportada anteriormente [20].

Es de gran relevancia hacer notar que la señal de reducción del ácido dehidroascórbico no aparece. Además, la onda  $I_c$  que se observa antes y después de la adición de AA no muestra cambios, por lo cual la podemos asociar a la reducción de las especies electroactivas que estaban en el plasma desde un principio. Esta evidencia apoya la posibilidad de hacer las determinaciones de las catecolaminas basándonos en las señales que aparecen en la zona de potenciales catódicos.

Por ello, también se adicionó L-dopa al plasma en una menor concentración para analizar su comportamiento electroquímico, el cual se muestra en el voltamperograma de la figura 3.6b.

Aquí se muestra un ligero aumento de la intensidad de la onda de oxidación  $I_a$  con respecto a la señal del plasma control. Lo mismo ocurre con la onda de reducción  $I_c$ . Este comportamiento es similar al de la DA, además las ondas asociadas a los procesos de óxido-reducción para ambos compuestos aparecen en potenciales muy semejantes debido a que poseen una estructura química parecida con los mismos grupos electroactivos.



**Figura 3.6.** Voltamperograma cíclico de a) (—) plasma de ratas control sin exposición a ozono y b) (---) con 0.1 mM de LDA. C vítreo como electrodo de trabajo,  $v$ : 100 mV/s

Finalmente, con los resultados anteriores podemos concluir que a pesar de haber una diferencia entre los potenciales de oxidación del AA y DA en plasma y la ausencia de una señal correspondiente a la reducción del ácido dehidroascórbico (DHA) en la zona de potenciales catódicos, aún se tiene la interferencia de compuestos relacionados estructuralmente con la DA como la L-Dopa.

En consecuencia, para poder establecer con mayor claridad cuales son las posibles especies oxidadas que se observan en los plasmas de rata y su correlación con las catecolaminas, se tuvo la necesidad de realizar experimentos de VC en medio acuoso donde es posible controlar las condiciones de reacción, con el fin de comprender los detalles de la química redox de las catecolaminas. Al mismo tiempo se obtuvo información de cuales son las especies más estables que se generan después de los procesos de oxidación, para que en futuras investigaciones se logren determinar selectivamente por sus potenciales de reducción en medios biológicos.

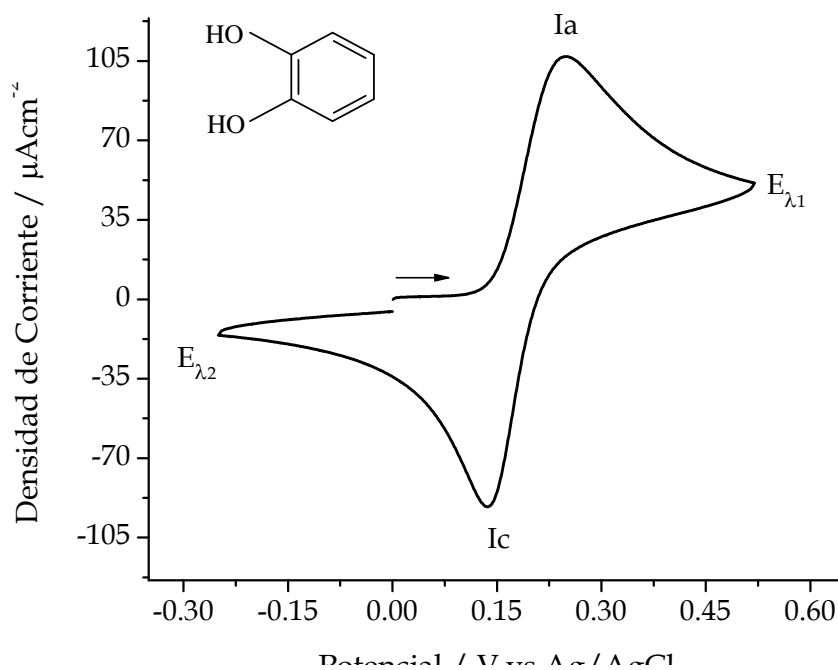
### **3.2. Comportamiento electroquímico del catecol en medio acuoso**

Ya es conocido que los compuestos derivados del catecol son relevantes puesto que participan en diversos procesos biológicos, donde su actividad involucra reacciones de transferencia de electrones. Las catecolaminas son un ejemplo claro de la importancia del grupo catecol presente en su estructura, y sus reacciones ocurren por lo general en fase acuosa. Es por esta razón que se procedió a realizar experimentos de voltamperometría cíclica en un medio acuoso amortiguado a pH 7 usando sales de fosfatos, muy parecido al nivel promedio fisiológico de acidez, para comprender los principios fundamentales de la reacción de electrodo en estas condiciones.

En efecto, los cambios estructurales en una molécula que posee un grupo electroactivo, influyen en sus potenciales oxido-reducción, en la corriente límite por diferencias en el coeficiente de difusión y en el mecanismo, reversibilidad o velocidad del proceso de electrodo; estos cambios son apreciables en voltamperometría cíclica, donde se pueden presentar diferencias en el número, formas de las ondas, así como en la altura de cada onda que está relacionada con el número de electrones intercambiados en los procesos faradaicos [55].

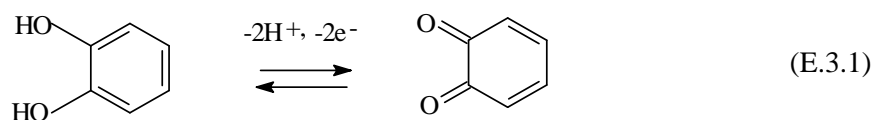
Siguiendo lo establecido en el párrafo anterior se obtuvo el voltamperograma cíclico de la *o*-hidroquinona o el 1,2-dihidroxibenceno (QH<sub>2</sub>). La información adquirida permitió explicar el comportamiento electroquímico de moléculas más complejas como las catecolaminas: dopamina (DA), noradrenalina (NAD), adrenalina (AD) y L-Dopa.

El voltamperograma cíclico típico del catecol en medio amortiguado a pH 7 (figura 3.7), se obtuvo iniciando el barrido directo hacia potenciales anódicos a una velocidad de 100 mV/s. Se determinaron los valores de potencial de inversión adecuados para observar las ondas asociadas al proceso redox, los cuales fueron  $E_{\lambda_1} = 0.52$  V y  $E_{\lambda_2} = -0.25$  V. En este intervalo de potenciales aparece la onda  $I_a$  en un potencial de 0.248 V, referido al par Ag/AgCl, que corresponde a la oxidación de la hidroquinona. Al efectuar la inversión de potencial se tiene el proceso de reducción de la quinona formada en el barrido directo, el cual está asociado a la onda  $I_c$  que se presenta en  $E_{pc} = 0.137$  V.



**Figura 3.7.** Voltamperograma cíclico típico de catecol 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.

En el gráfico anterior de  $j$  vs  $E$ , se muestran las características principales del proceso de transferencia de electrones en medio acuoso que corresponde al sistema hidroquinona/quinona, de donde se deduce que existe un intercambio de dos electrones y dos protones que concuerda con los datos encontrados en la literatura [56], de tal manera que se tiene la siguiente reacción global:

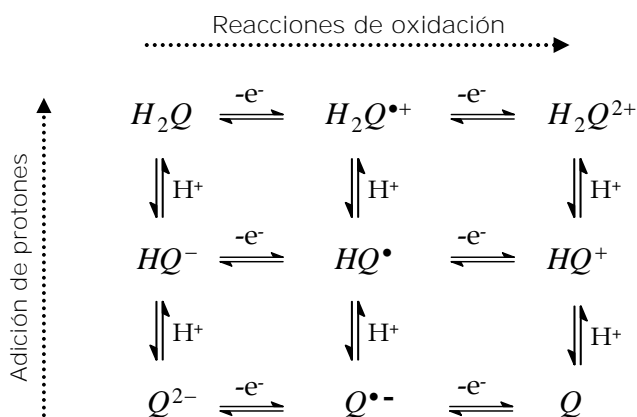


Además, el cociente entre las intensidades de corriente  $i_{pc}/i_{pa}$  tiene un valor de 0.963, este índice sugiere que la reacción electroquímica es reversible; **sin embargo, el  $\Delta E_p$  es de 110 mV** mostrando un comportamiento de una transferencia lenta de electrones. Dado que el sistema intercambia dos electrones, **el valor teórico de  $\Delta E_p$  debería ser cercano a 30 mV**, ésta diferencia entre el valor teórico y el experimental confirma la existencia de una transferencia electrónica lenta que es determinante en la cinética de la reacción.

Aunque el mecanismo de la oxidación del catecol ha sido poco estudiado electroquímicamente, en comparación con el mecanismo de la reducción de las quinonas, a partir de ello es posible obtener información para elucidar las secuencias de reacciones que ocurren en las células, ya que las propiedades electroquímicas de los compuestos influyen directamente sobre su actividad biológica. Así, los estudios en medios apróticos

son útiles para entender las interacciones con partes de las célula que son esencialmente lipídicas como la parte hidrofóbica de los distintos tipos de membranas, mientras que el análisis de las reacciones en medio acuoso permite vislumbrar las interacciones con otras especies que se encuentren en el citosol o en algunos casos dentro de algunos organelos como por ejemplo en la mitocondria, lugar donde se genera una gran cantidad de especies reactivas y radicales libres derivados del oxígeno durante la respiración celular.

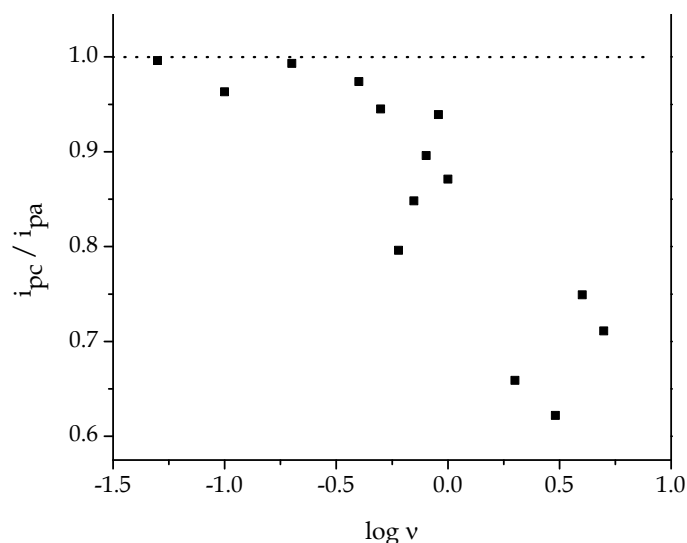
Como se sabe, el mecanismo y la velocidad de las reacciones de óxido-reducción de compuestos semejantes al catecol, dependen de la polaridad del disolvente [57] y de las características ácido-base propias de la especie electroactiva. Dichas propiedades determinan la estabilidad de los intermediarios que se originan a partir de las reacciones de transferencia de electrones y protones. Las reacciones sucesivas durante la oxidación de una hidroquinona, pueden representarse por un esquema cuadrado que muestra todas las rutas posibles que se pueden seguir (figura 3.8).



**Figura 3.8.** Esquema de las posibles reacciones durante la oxidación de hidroquinonas

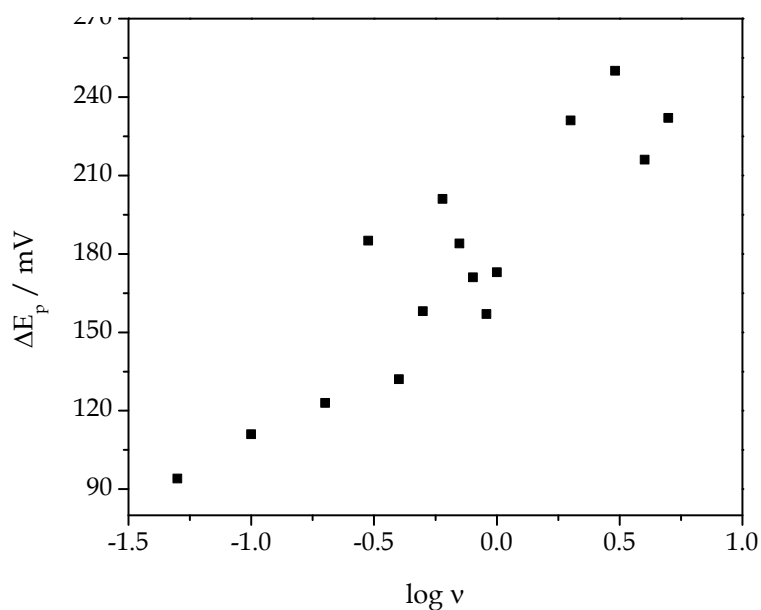
La velocidad de los procesos de electrodo deriva de la rapidez de las posibles reacciones acopladas a la transferencia de carga. Es frecuente encontrar reacciones de transferencia de protones que ocurren como consecuencia del cambio en la basicidad de los átomos de oxígeno después del intercambio de electrones con el electrodo.

Efectivamente, con el análisis de la variación de  $i_{pc}/i_{pa}$  y de  $\Delta E_p$  en función de la velocidad de barrido que se muestran en las figuras 3.9 y 3.10 respectivamente, se comprueba que la transferencia de electrones tiene complicaciones cinéticas. En otras palabras, se puede decir que existen reacciones químicas acopladas en fase homogénea más lentas que el intercambio de electrones que ocurre entre las especies  $H_2Q/Q$  y el electrodo de trabajo, esto provoca que no se observe un valor constante en ambos casos.



**Figura 3.9.** Gráfica de  $i_{pc}/i_{pa}$  vs  $\log$  de la velocidad de barrido para el catecol en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7



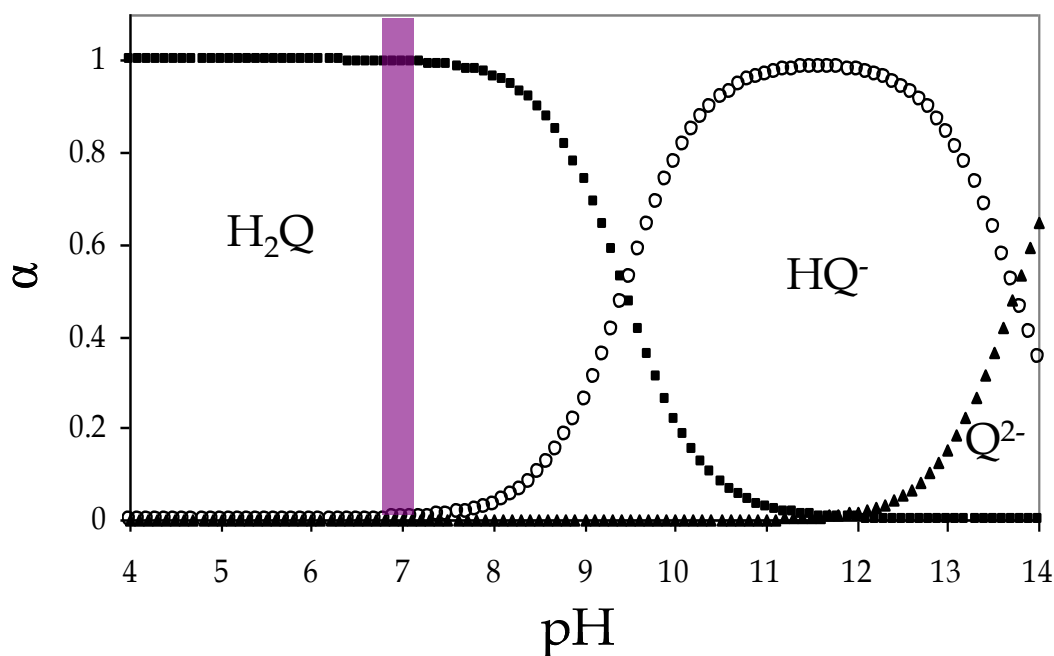


**Figura 3.10.** Gráfica de  $\Delta E_p$  vs log de la velocidad de barrido para el catecol en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7

A continuación se propone un posible mecanismo de oxidación de la hidroquinona en función de los datos mostrados anteriormente, que fueron obtenidos por voltamperometría cíclica en un medio amortiguado a pH 7, considerando las propiedades ácido-base del catecol.

Se sabe que el valor de  $pK_{a1}$  del catecol es 9.45 y su  $pK_{a2}$  es 13.74 [58], por tanto, en las condiciones experimentales establecidas se encuentra presente en solución la especie protonada  $H_2Q$  en un 99.65% (figura 3.11) y un 0.35 % de la especie  $HQ^-$ . El segundo valor de  $pK_a$  es mayor en comparación al correspondiente valor de  $pK_a$  de la *p*-hidroquinona, esto se debe a que existen interacciones de tipo puentes de hidrógeno en el anión  $OH^-$  del catecol, que proporciona un efecto estabilizador que dificulta la pérdida de

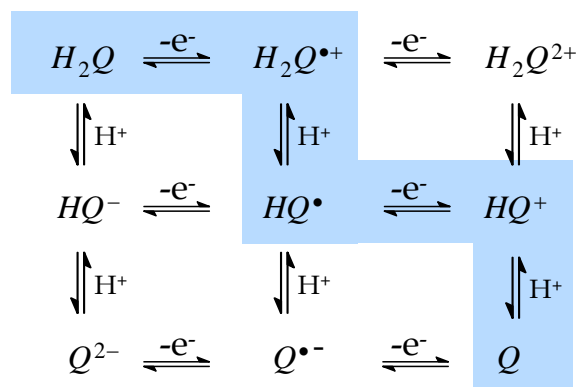
un segundo protón que sólo sería posible en presencia de una base fuerte para formar  $Q^{2-}$ . En este caso, ni el agua ni alguna especie básica de las sales de fosfato son bases lo suficiente fuertes como para lograr este efecto.



**Figura 3.11.** Diagrama de variación de la fracción molar de las especies de (■)  $H_2Q$ , (○)  $HQ^-$  y (▲)  $Q^{2-}$  asociadas al catecol en función del pH.

Siguiendo el esquema de reacciones mostrado en la figura 3.12,  $H_2Q$  pierde un electrón formando la especie radical catión  $H_2Q^{\bullet+}$  el cual es un ácido fuerte en medio acuoso ( $pK_a = -0.8$ , [59]), por lo tanto, sigue una reacción de desprotonación hasta formar el radical neutro  $HQ^{\bullet}$ . En seguida ocurre instantáneamente una segunda transferencia de carga dando lugar a la especie  $HQ^+$  que es una especie aún más ácida en comparación con el radical neutro. Por consiguiente se espera que inmediatamente se pierda un segundo protón formando la correspondiente quinona, Q. Este proceso de oxidación en medio

acuoso ocurre lo suficientemente rápido como para observar únicamente una onda de oxidación ( $I_a$ ) y una onda de reducción ( $I_c$ ) acorde con un mecanismo ECEC (Electroquímico-Químico-Electroquímico-Químico).



**Figura 3.12.** Esquema de reacciones de oxidación de hidroquinonas. La zona sombreada indica la ruta de oxidación propuesta para el catecol en medio prótico y pH 7.

Sin embargo, considerando la variación de  $i_{pc}/i_{pa}$  al aumentar la velocidad de barrido, se deduce que al cambiar el potencial de electrodo cada vez más rápido se da menos tiempo a que  $H_2Q^{\bullet+}$  pierda un protón, entonces habrá una menor cantidad de  $HQ^{\bullet}$  en la interfase. Enseguida es posible que ocurra una segunda transferencia de carga para generar  $H_2Q^{2+}$  o  $HQ^+$ . Esta combinación de reacciones dependientes de la transferencia de protones (o el valor de pH), provoca que la formación de  $Q$  sea más lenta. Por lo tanto, cuando se llega a un potencial suficiente para reducir a  $Q$  su disponibilidad en la superficie del electrodo es menor, produciendo un aumento de  $i_{pc}$  menor con respecto a  $i_{pa}$ , es decir,

$i_{pc} < i_{pa}$  esto deriva en un valor de cociente que se vuelve menor de la unidad a medida que se incrementa la velocidad de barrido.

Por otra parte, para poder explicar la diferencia que existe entre los valores de  $\Delta E_p$  empíricos del catecol y el valor teórico, se obtuvo antes el voltamperograma cíclico de ferrocianuro 1 mM en solución de fosfatos 0.25 M amortiguada a pH 7, ya que este compuesto se suele usar como un sistema de referencia en medios acuosos (no se presenta). Con los datos de VC se obtuvo un  $\Delta E_p$  de 62 mV a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Este dato nos indica que el correspondiente par redox intercambia un electrón de manera reversible como se establece en la ecuación E.1.14. Con esto se demuestra que **el aumento en los valores de  $\Delta E_p$**  no se debe a problemas de compensación de caída ohmica. Por lo tanto el único parámetro que afecta la diferencia de potencial es una constante heterogénea de transferencia de electrones y la presencia de reacciones químicas acopladas que pueden ser de transferencia de protones o bien reacciones de desproporción\*.

De lo anterior se deduce que la transferencia electrónica también puede llegar a controlar la velocidad de la reacción global. A bajas velocidades de barrido, **el valor de  $\Delta E_p$**  muestra un incremento aproximadamente lineal que se vuelve más pronunciado a altas velocidades, evidenciando que la reacción de transferencia de carga también participa en el control cinético de la reacción global redox del catecol.

---

\*Se considera desproporción como la reacción de dos especies en el mismo estado de oxidación que genera otras dos especies en distintos estados de oxidación. Lo anterior se distingue de la dismutación en que, para esta última, es una sola especie la que reacciona consigo misma para generar dos especies distintas.

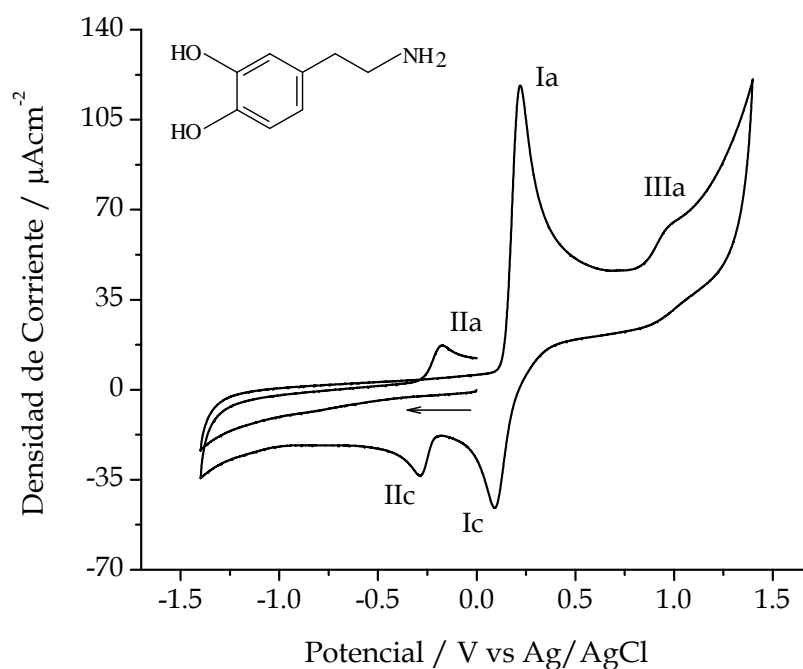
### 3.3. Comportamiento electroquímico de las catecolaminas en medio acuoso

Por otra parte, dado que las catecolaminas son compuestos fácilmente oxidables, primero se realizó un estudio de estabilidad a la luz en medio acuoso a pH 7 mediante espectroscopia de UV-visible que se presenta en el anexo A.4. Posteriormente se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos abarcando toda la ventana de potenciales (figuras 3.13, 3.16, 3.17, 3.18). En este caso la dirección del barrido de potencial se inició hacia potenciales catódicos, con la finalidad de comprobar que no hubiera especies oxidadas presentes en la solución desde el principio del experimento.

De acuerdo con estos resultados, el comportamiento electroquímico para las catecolaminas es más complejo porque además del grupo catecol, también es probable que el grupo funcional amino se oxide a un potencial anódico mayor como consecuencia de su menor densidad electrónica en comparación con los grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático. Aunque la discusión posterior se enfocará principalmente en el grupo catecol dada su importancia en reacciones bioquímicas.

En la figura 3.13 se muestra el voltamperograma correspondiente a la DA; después de la primera inversión de potencial se presenta una onda de oxidación  $I_a$  en 0.211 V; enseguida se aprecia otra onda ancha,  $III_a$ , de baja intensidad de corriente asociada a una segunda transferencia electrónica.

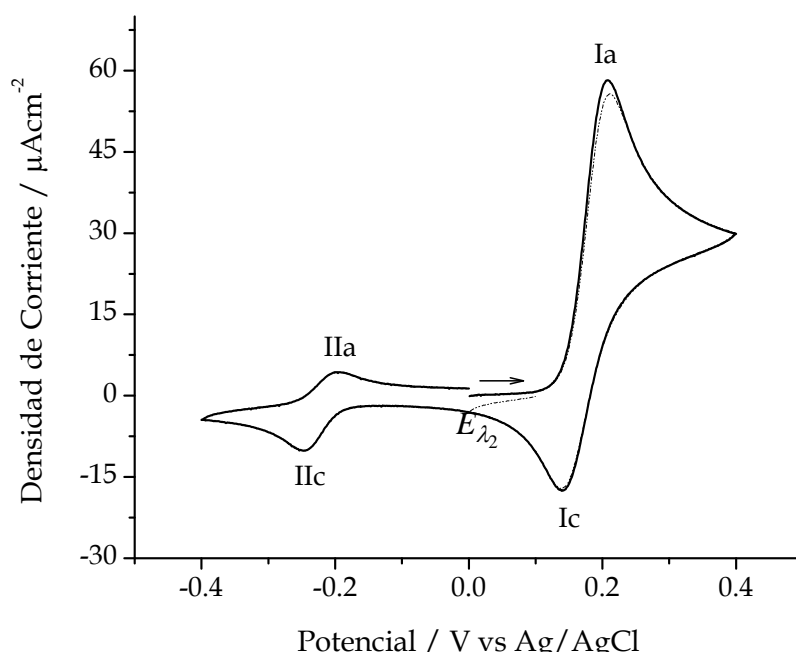
Cuando se vuelve a invertir el sentido del barrido en  $E_{\lambda_0}$ , se presentan dos ondas catódicas,  $I_c$  y  $II_c$ , correspondientes a la reducción de las especies oxidadas electrogeneradas anteriormente.



**Figura 3.13.** Voltamperograma cíclico típico de dopamina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.

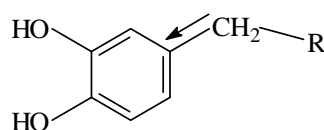
Para demostrar la relación de estas ondas se hicieron cortes con un potencial de inversión adecuado para cada uno de los compuestos utilizados, de tal manera que después de la primera onda anódica se invirtió el potencial de barrido en un valor de corriente nula.

En la figura 3.14 se presenta el corte correspondiente a la DA. Comparando el comportamiento de la DA con el catecol podemos observar las similitudes con respecto al sistema  $I_a/I_c$ , por lo tanto se puede asumir que el grupo electroactivo es el mismo, en este caso el catecol. Al mismo tiempo podemos observar el efecto que produce un cambio estructural sobre el potencial de la onda  $I_a$ .



**Figura 3.14.** Voltamperograma cíclico típico de dopamina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 20 mV/s.  $E_{\lambda} = 0.4V$

Por ejemplo, en el caso de la DA se tiene un desplazamiento del valor de  $E_{pa}$  hacia valores menos positivos respecto a la onda  $I_a$  del catecol (tabla 3.1), esto se debe a que el grupo metileno unido directamente al anillo aromático, le dona densidad electrónica por efecto inductivo, provocando que sea más fácil oxidar a la dopamina.



**Figura 3.15.** Representación de la donación de densidad electrónica del carbono hacia el anillo aromático presente en el catecol

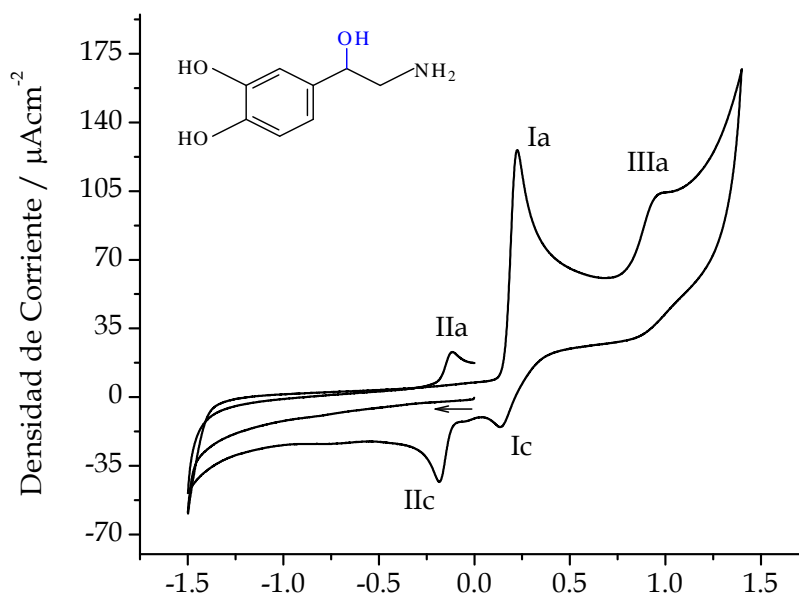
Así mismo, en el anterior VC (figura 3.14) se observa, al hacer el corte en  $E_{\lambda_2}$ , que la aparición de las ondas  $I_c$  y  $I_a$  es constante, esto indica que la especie que se oxida se reduce respectivamente en cada señal, aunque no es un sistema completamente reversible como se comprobó para el catecol en la sección anterior.

**Tabla 3.1.** Resultados obtenidos por voltamperometría cíclica para el sistema  $I_a/I_c$

Compuesto	Onda $I_a$		Onda $I_c$		$i_{pc}/i_{pa}$	$\Delta E_p$
	$E_{pa}$ (mV)	$i_{pa}$	$E_{pc}$ (mV)	$i_{pc}$		
Catecol	248	29.7	137	28.6	0.963	111
Dopamina	211	32.4	141	27.7	0.643	70
Noradrenalina	225	33.9	167	21.1	0.622	58
L-dopa	217	13.7	254	10.5	0.766	37
Adrenalina	281	41	*	*	*	*

\*Los valores de estas ondas no se lograron determinar porque la intensidad de corriente es pequeña o nula.





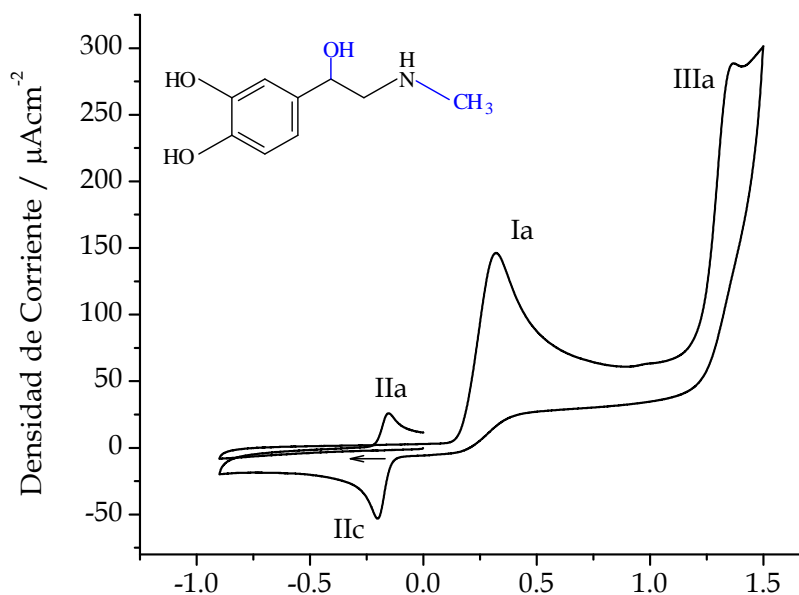
**Figura 3.16.** Voltamperograma cíclico típico de noradrenalina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.

De la misma manera, para la NAD (figura 3.16) la onda  $I_a$  asociada a la formación de la quinona aparece en 0.225 V, este valor es aún menos anódico que para la DA y el catecol. Esto indica que el grupo  $-\text{OH}$  unido al metileno adyacente al anillo aromático, también tiene un efecto inductivo sobre la cinética de transferencia de electrones, aunque no afecta el mecanismo. Además, si se consideran las reacciones de transferencia monoeléctrica también se encuentra un efecto estabilizador de los radicales formados.

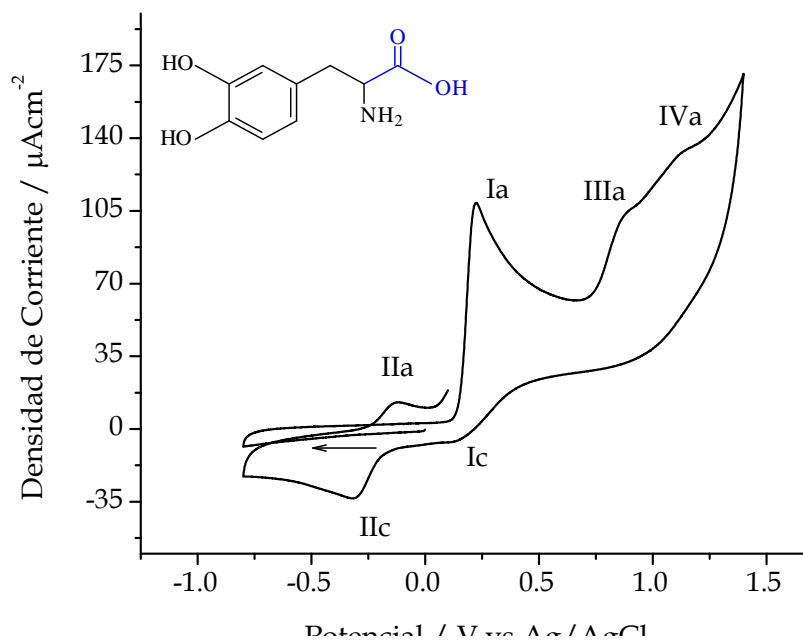
También en el voltamperograma de la NAD se observa el otro proceso de oxidación en la onda  $III_a$  que tentativamente se ha relacionado al grupo amino terminal de las catecolaminas estudiadas.

Ahora bien, se pudo comprobar el efecto de los sustituyentes sobre el átomo de nitrógeno en el voltamperograma de la AD (figura 3.17) donde se tiene una amina secundaria para la cual se esperaría un aumento de la basicidad por la donación de densidad electrónica por parte del metilo. Sin embargo, la onda III<sub>a</sub> demuestra el efecto contrario ya que tiene un corrimiento hacia potenciales más positivos. Por el otro lado la onda I<sub>a</sub> se encuentra en 0.281 V.

De tal modo que para las catecolaminas analizadas hasta el momento es posible observar tanto el sistema rédox I como el II, con ligeras diferencias en el potencial y en las intensidades de corriente debido a pequeños cambios en su estructura.



**Figura 3.17.** Voltamperograma cíclico típico de adrenalina 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.



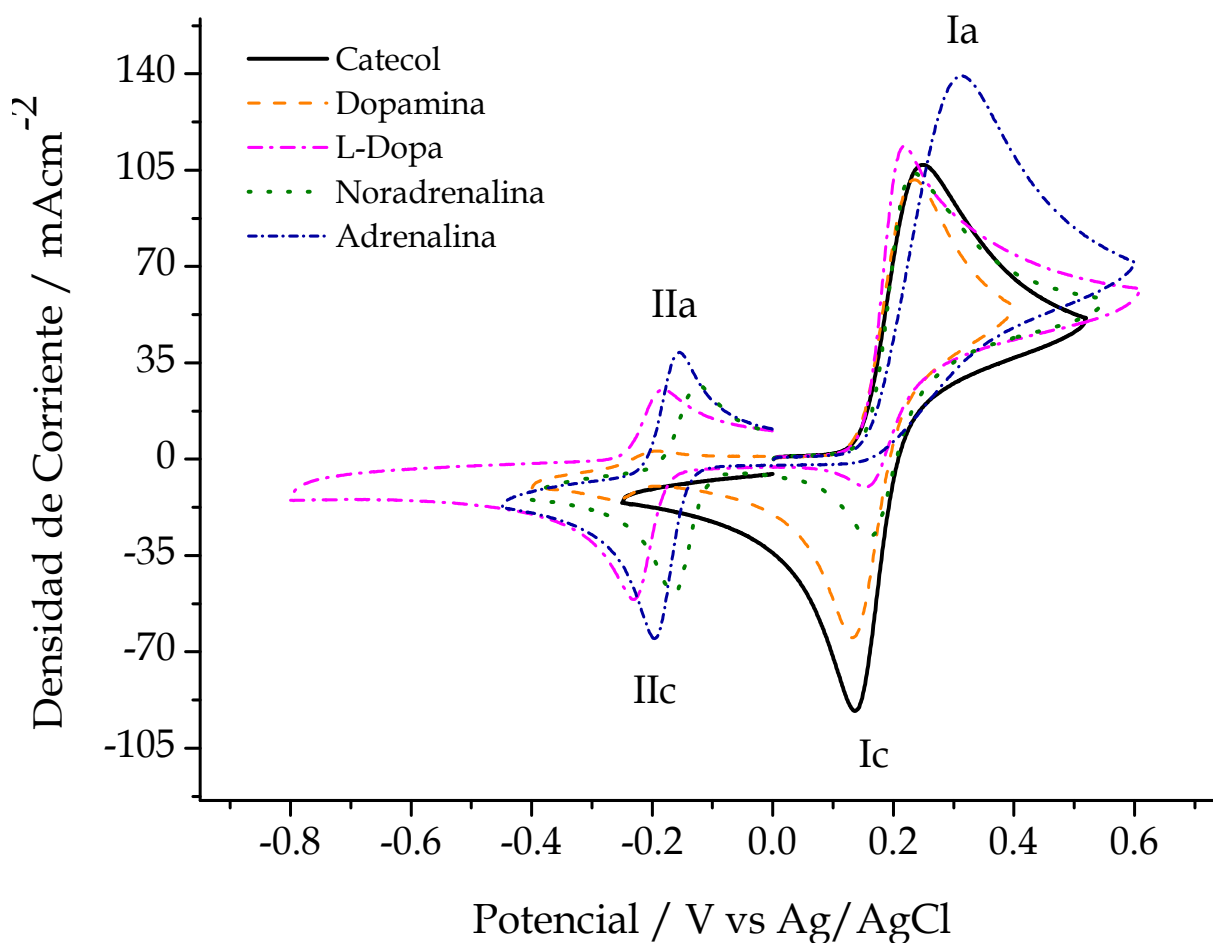
**Figura 3.18.** Voltamperograma cíclico típico de L-Dopa 1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s.

Por último, la L-Dopa (figura 3.18) también presenta un comportamiento similar en cuanto a los sistemas rédox I y II, pero a diferencia de las anteriores catecolaminas, se encuentra una onda anódica adicional IV<sub>a</sub>. En este caso, al hacer un corte en un potencial de inversión establecido a un valor de corriente nula después del primer proceso de oxidación, se mantiene el comportamiento asociado al grupo electroactivo catecol. Por lo tanto, esta nueva onda también debe estar asociada a la influencia del grupo -COOH en el mecanismo de electrooxidación de la amina.

De los resultados obtenidos hasta este punto se puede decir que tanto los efectos inductivos y de resonancia causados por los grupos sustituyentes del anillo así como los grupos unidos a la cadena alifática y a la amina, son los factores primordiales que determinan las características electrónicas de cada molécula que se manifiestan en su comportamiento electroquímico.

### 3.3.1. Efecto de las reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga

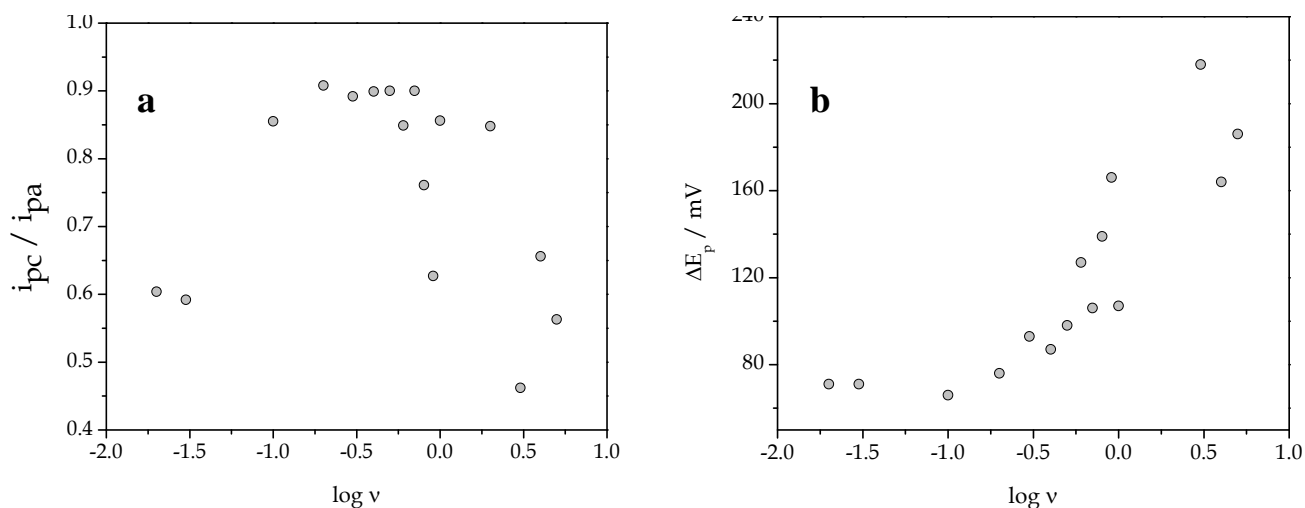
En la figura 3.19 se muestran los cortes de los voltamperogramas de catecolaminas donde se aprecia mejor que todos presentan, como una característica común, una primera onda de oxidación en un potencial similar al cual se oxida el catecol.



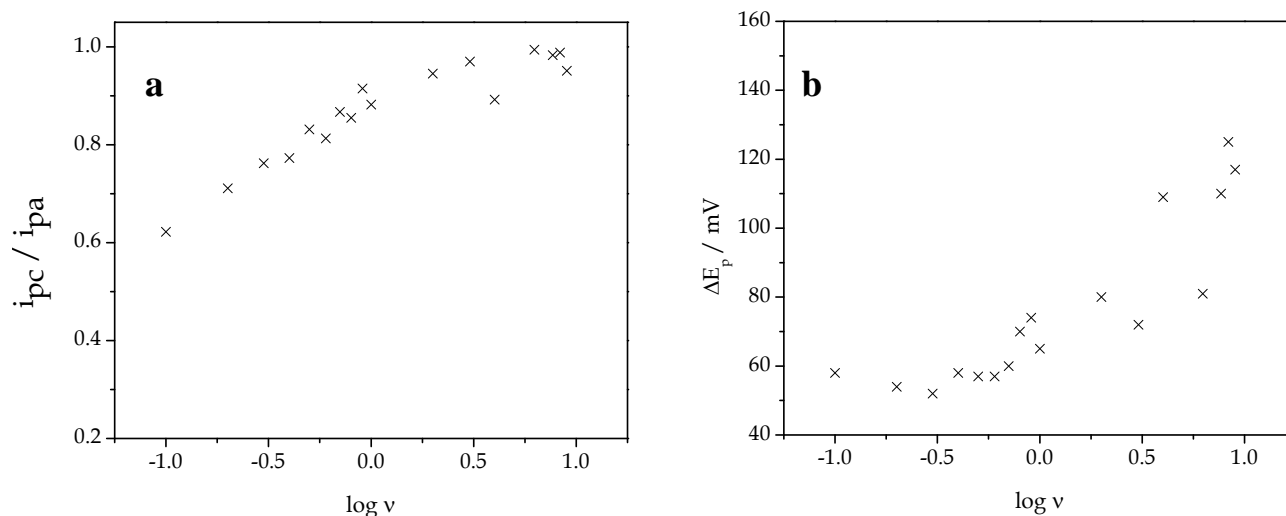
**Figura 3.19.** Comparación del comportamiento electroquímico de Catecol, DA, NAD, AD y L-Dopa 1 mM, en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Velocidad de barrido 100 mV/s

Al cambiar la dirección de barrido se presenta una onda de reducción donde es evidente la disminución de la intensidad de corriente conforme se tienen cambios en la estructura química entre las catecolaminas estudiadas. Como resultado se obtienen valores de  $i_{pc}/i_{pa}$  diferentes de la unidad (tabla 3.1).

Además, cuando se analizan las curvas de  $i_{pc}/i_{pa}$  y  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido, que se obtienen a partir de los datos del primer sistema rédox (I) se observa, en contraste con el catecol, que para la DA (figura 3.20b) y la NAD (figura 3.21b), la diferencia de potenciales de pico a bajas velocidades se mantiene en un valor casi constante y los valores comienzan a aumentar después de los 300 mV y 1 V respectivamente. Este comportamiento sugiere que la reacción de transferencia de electrones es irreversible ( $\Delta E_p$  mayor a 30 mV) y es más lenta en el caso de la DA.



**Figura 3.20.** Gráficas de a)  $i_{pc}/i_{pa}$  y b)  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox I de la DA



**Figura 3.21.** Gráficas de a)  $i_{pc}/i_{pa}$  y b)  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox I de la NAD

Dicha irreversibilidad también afecta la relación entre las corrientes de pico. Cuanto más se aleja el valor de la unidad, más irreversible es la reacción electroquímica. En primera instancia, se sabe que ésta tendencia resulta de la influencia de la velocidad de reacciones químicas homogéneas que es determinante en la cinética de la reacción.

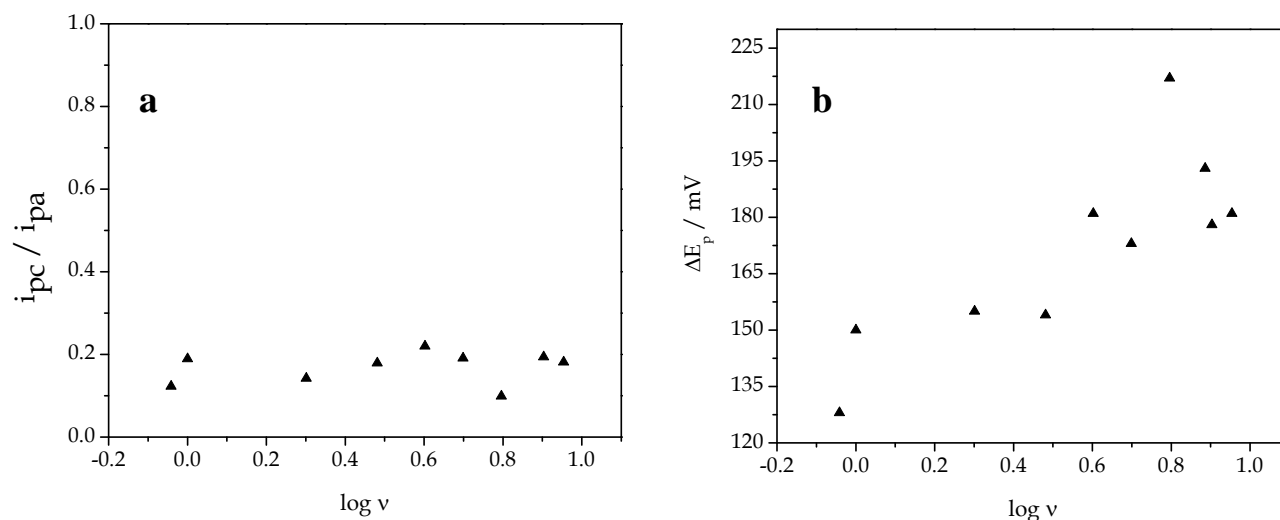
En el caso particular de la DA, la relación de corrientes (figura 3.20a) primero aumenta hasta un valor próximo a la unidad manteniéndose casi constante, dicho comportamiento se debe al desacoplamiento de las reacciones químicas homogéneas. Posteriormente, a partir de una velocidad de barrido de 800 mV/s, los valores comienzan a disminuir debido a que la transferencia electrónica heterogénea es relativamente lenta y la reacción en el electrodo deja de estar controlada por la difusión.

Mientras que en la NAD se observa un aumento lineal en el cociente de corrientes de pico (figura 3.21a), de la misma manera esto nos indica que a velocidades de barrido mayores a  $100 \text{ mVs}^{-1}$  se logran desacoplar poco a poco las reacciones químicas que poseen constantes de velocidad bajas. Aunque en el intervalo de velocidades analizado, la reacción electroquímica sigue un régimen difusional.

En este caso cuando la velocidad de barrido es baja se permite que la especie generada en la superficie del electrodo se difunda y participe en una reacción homogénea como en los equilibrios ácido-base. También se ha sugerido anteriormente que dadas las características de estas moléculas, se ciclan formando un derivado de indolina, que sería la especie responsable de la aparición del segundo sistema rédox que se analizara posteriormente.

Las figuras 3.22a y 3.22b muestran el comportamiento voltamperométrico de la AD. De este modo se hace evidente que la reacción de transferencia de electrones es completamente irreversible. A bajas velocidades no fue posible determinar la intensidad de corriente de la onda de reducción de la quinona, incluso a velocidades mayores de  $700 \text{ mV}$  este valor sigue siendo pequeño a diferencia de los datos obtenidos para los compuestos analizados previamente.

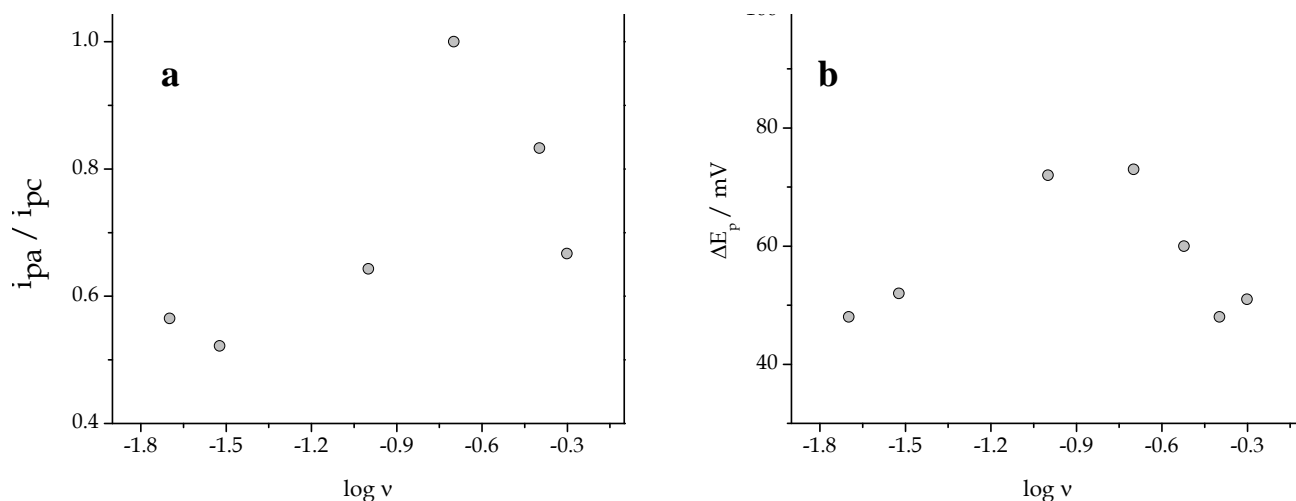




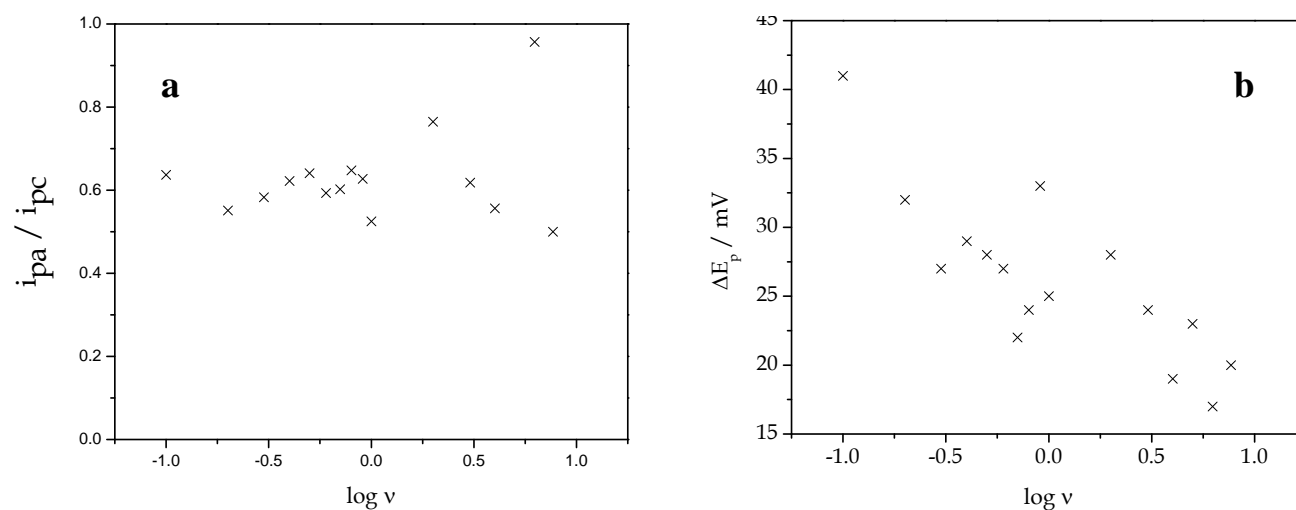
**Figura 3.22.** Gráficas de a)  $i_{pc}/i_{pa}$  y b)  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox I de la AD

Como se ha mencionado, en los voltamperogramas se observa adicionalmente un segundo sistema rédox con la aparición de otro par de ondas,  $II_c$  y  $II_a$ , que no están presentes en el voltamperograma asociado al catecol. Este comportamiento es más pronunciado en el caso de la adrenalina donde la primera onda de reducción desaparece completamente, mientras que la onda  $II_c$  aumenta en intensidad.

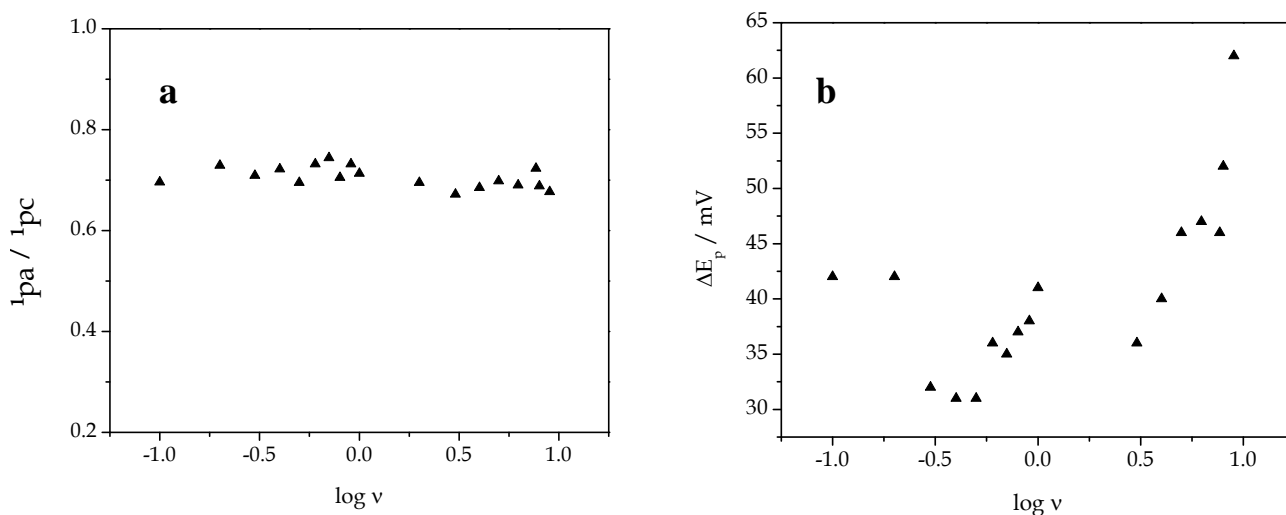
La relación entre ambos sistemas rédox se verifica si comparamos los datos del primer sistema con los correspondientes gráficos de  $i_{pa}/i_{pc}$  y  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el segundo proceso electroquímico (II) de estos compuestos, que se muestran en las siguientes figuras.



**Figura 3.23.** Gráficas de a)  $i_{pa}/i_{pc}$  y b)  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox II de la DA



**Figura 3.24.** Gráficas de a)  $i_{pa}/i_{pc}$  y b)  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox II de la NAD



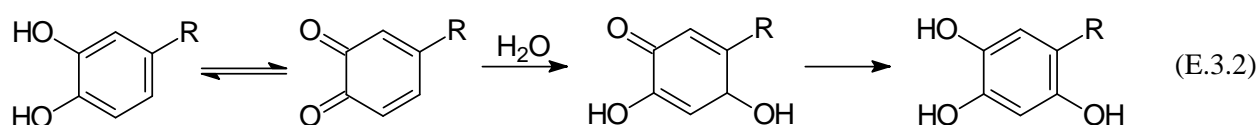
**Figura 3.25.** Gráficas de a)  $i_{pa}/i_{pc}$  y b)  $\Delta E_p$  en función del logaritmo de la velocidad de barrido para el sistema rédox II de la AD

Con la información mostrada en la tabla 3.2 podemos decir que la reacción de transferencia de electrones es rápida puesto que el valor de  $\Delta E_p$  es cercano a 30 mV, excepto para el caso de DA dado que el primer sistema rédox es más reversible a diferencia de las demás catecolaminas. Por lo tanto, de esta manera también se confirma que el proceso de la onda II<sub>c</sub> es dependiente de la reacción homogénea posterior a la formación de la quinona.

**Tabla 3.2.** Parámetros electroquímicos obtenidos por voltamperometría cíclica para el sistema IIa/IIc a una velocidad de barrido de 100 mV/s

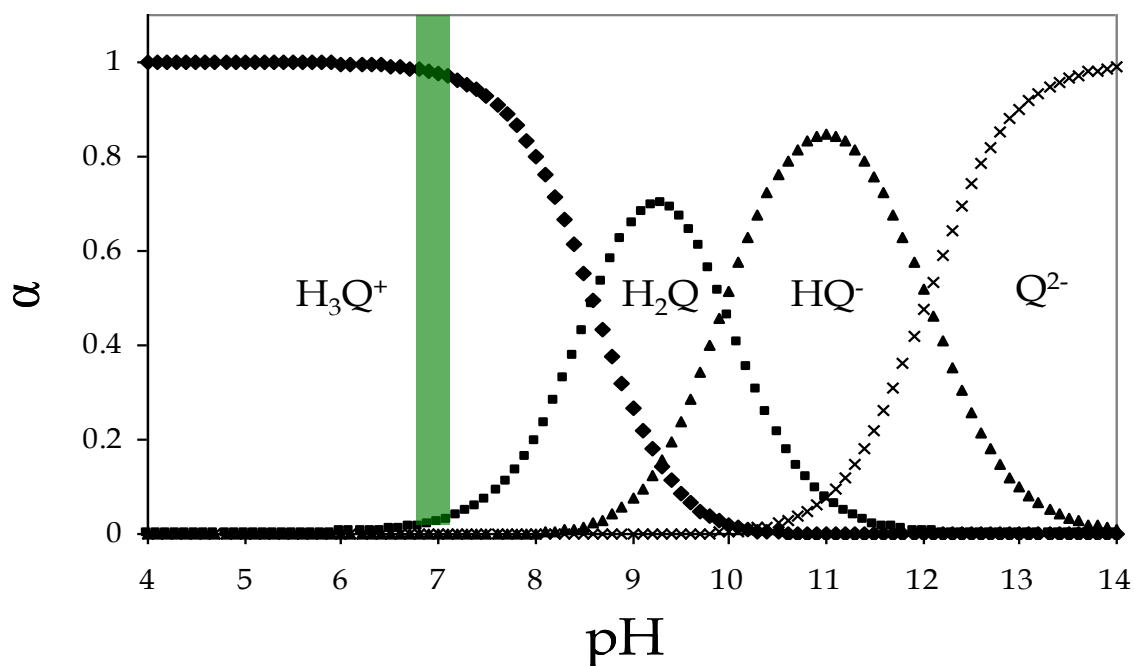
Compuesto	Onda II <sub>c</sub>		Onda II <sub>a</sub>		$\Delta E_p$ (V)	$i_{pa}/i_{pc}$
	$E_{pc}$ (V)	$i_{pc}$ ( $\mu A$ )	$E_{pa}$ (V)	$i_{pa}$ ( $\mu A$ )		
Dopamina	-0.263	1.4	-0.191	0.9	0.072	0.64
Noradrenalina	-0.165	12.4	-0.124	7.9	0.041	0.64
L-Dopa	-0.231	13.6	-0.183	6.65	0.048	0.49
Adrenalina	-0.197	17.1	-0.155	11.9	0.042	0.69

La quinona que se deriva del proceso de electrooxidación es una especie electrofílica susceptible de ataques nucleofílicos. En este caso, en el medio de trabajo abundan moléculas de agua que son capaces de reaccionar con el anillo de catecol en la posición 6 por adición-1,4 (tipo Michael) dando lugar a un compuesto hidroxilado. El producto de ésta reacción cuando se parte de DA será la 6-hidroxi-dopamina la cual presenta una alta citotoxicidad [60]. Sin embargo, se ha descrito en trabajos anteriores que la cinética de esta reacción es relativamente lenta [61].

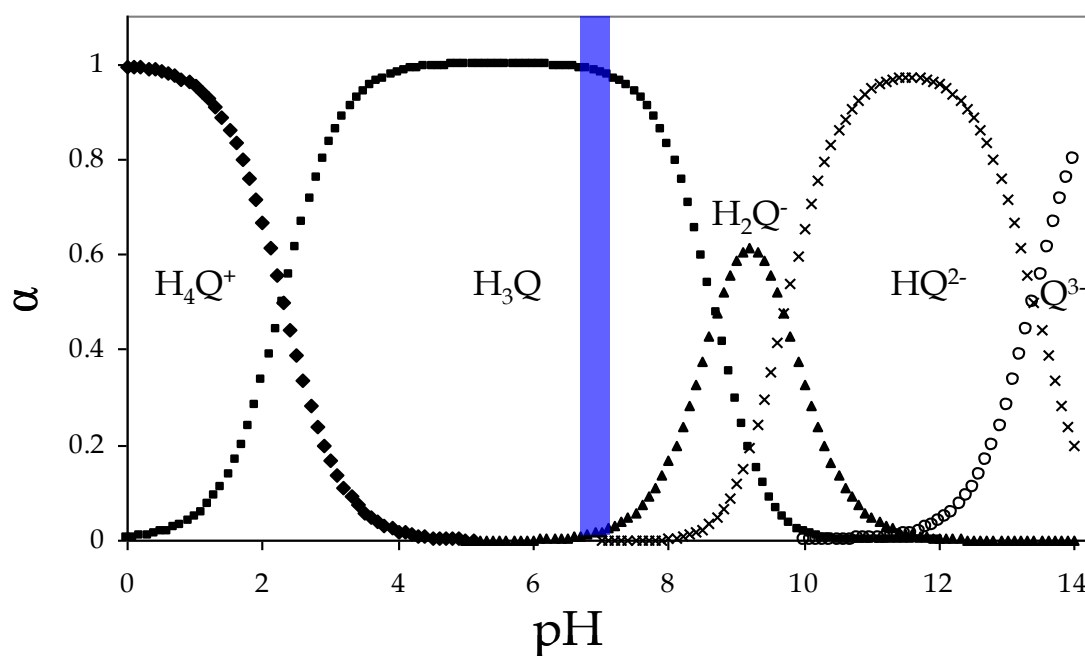


En realidad el grupo amino presente en las catecolaminas es un mejor nucleófilo que el agua, y además se encuentra en la misma molécula. En consecuencia, es más probable que ocurra una reacción de adición intramolecular para generar un compuesto denominado comúnmente como leucocromo (ver reacción E.3.5., especie **4a**).

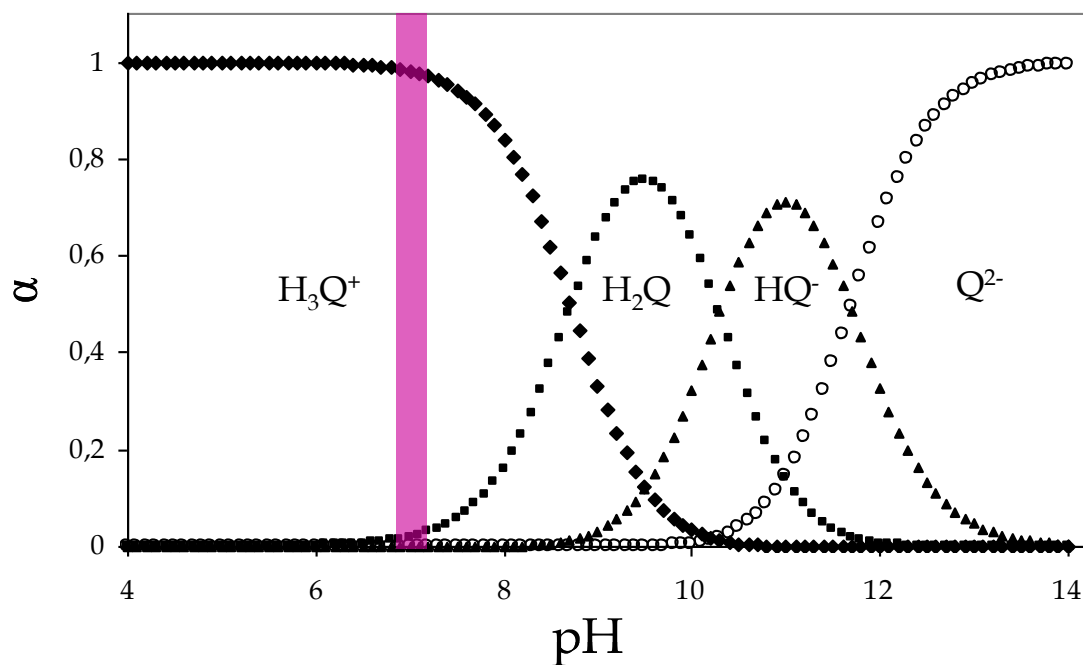
No obstante, con los diagramas de variación de especies en función del pH determinados para cada catecolamina, observamos que el grupo amino tanto de DA, L-Dopa, NAD y AD se encuentra protonado al pH establecido en el medio de reacción. De esta manera sabemos que de DA se tiene 97.6 % de  $H_3Q^+$  y 2.4 % de  $H_2Q$ . Mientras que la especie predominante de la L-Dopa es la  $H_3Q$  con 98.04 %, en la cual el grupo carboxilo se encuentra desprotonado y la amina forma una sal de amonio.



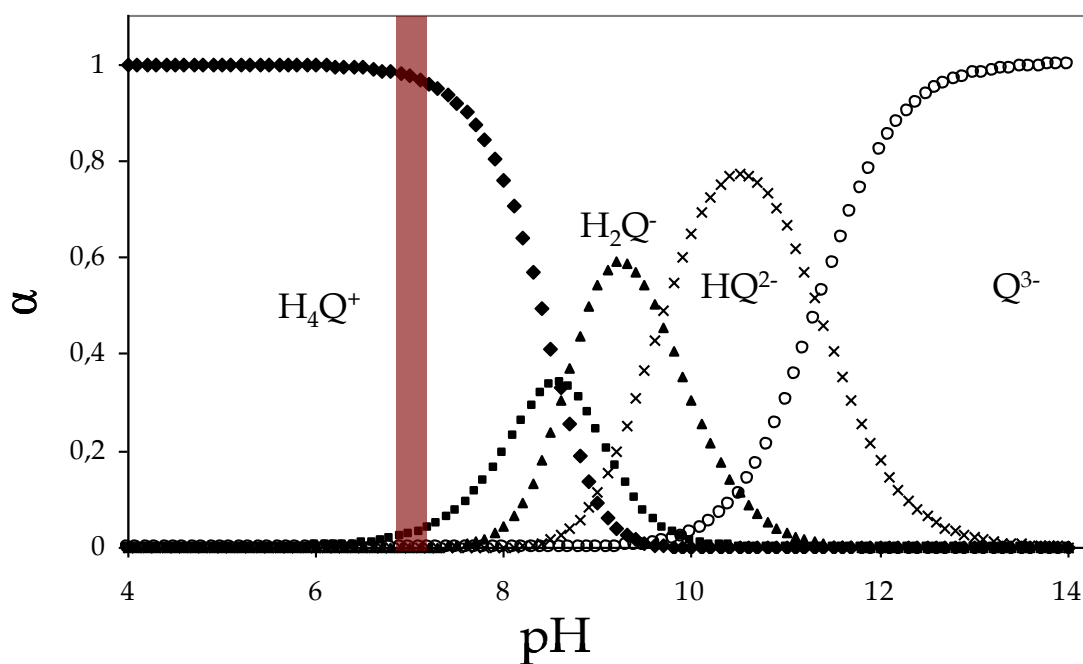
**Figura 3.26.** Diagrama de variación de la fracción molar de las especies ( $\blacklozenge$ )  $H_3Q^+$ , ( $\blacksquare$ )  $H_2Q$ , ( $\blacktriangle$ )  $HQ^-$  y ( $\times$ )  $Q^{2-}$  asociadas a la dopamina en función del pH.



**Figura 3.27.** Diagrama de variación de la fracción molar de las especies ( $\blacklozenge$ )  $H_4Q^+$ , ( $\blacksquare$ )  $H_3Q$ , ( $\blacktriangle$ )  $H_2Q^-$ , ( $\times$ )  $HQ^{2-}$  y ( $\circ$ )  $Q^{3-}$  asociadas a la L-Dopa en función del pH.

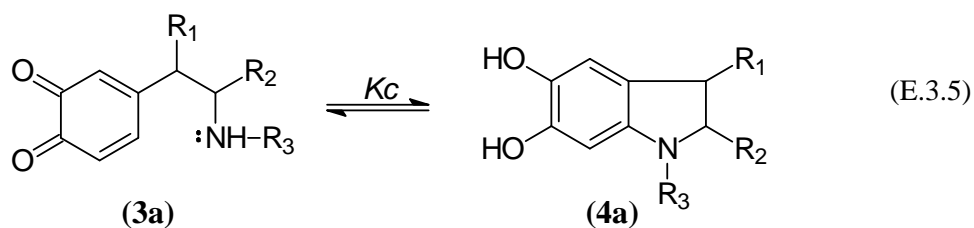
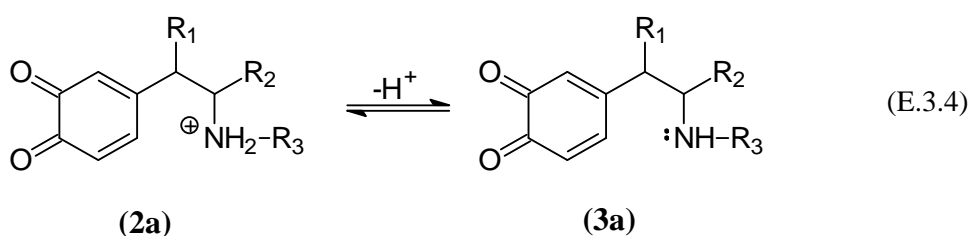
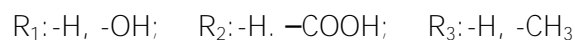
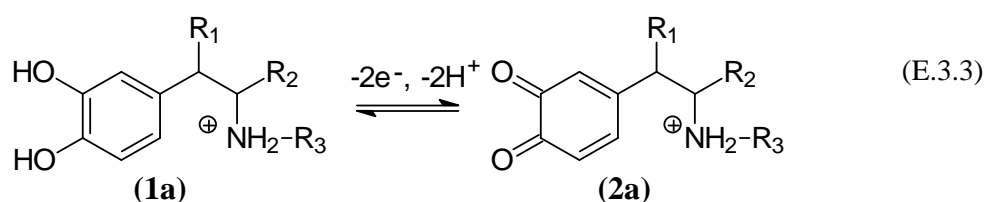


**Figura 3.28.** Diagrama de variación de la fracción molar de las especies (♦)H<sub>3</sub>Q<sup>+</sup>, (■) H<sub>2</sub>Q, (▲)HQ<sup>-</sup> y (○) Q<sup>2-</sup> asociadas a la noradrenalina en función del pH.



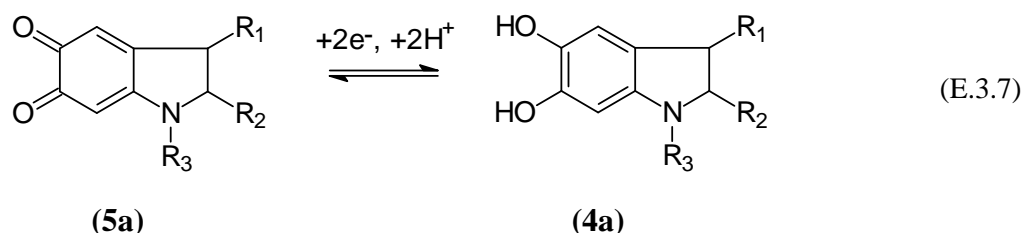
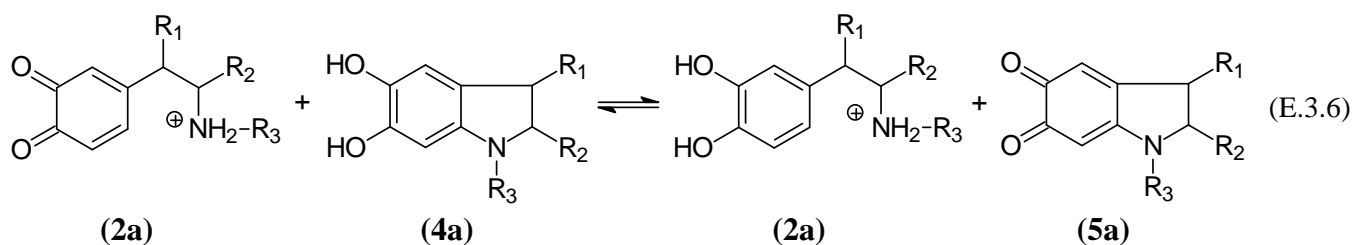
**Figura 3.29.** Diagrama de variación de la fracción molar de las especies (♦)H<sub>4</sub>Q<sup>+</sup>, (■) H<sub>3</sub>Q, (▲)H<sub>2</sub>Q<sup>-</sup>, (x) HQ<sup>2-</sup> y (○)Q<sup>3-</sup> asociadas a la adrenalina en función del pH.

En el caso de la NAD se tiene 98.13 y 1.87 % de  $H_3Q^+$  y  $H_2Q$  respectivamente. Por último, la AD se encuentra en una mayor proporción como  $H_3Q^+$  en un 97.44% y 2.5 % como  $H_2Q$ . De estos equilibrios ácido-base se dedujo que después de la reacción electroquímica de oxidación de las catecolaminas (E.3.3) tiene que ocurrir la pérdida de un protón unido al nitrógeno dejando así su par electrónico libre (**3a**) (E.3.4), lo cual favorece el mecanismo de adición-1,4 tipo Michael (E.3.5) para formar el leucocromo correspondiente (**4a**).



Como se puede observar en las reacciones anteriores, la reversibilidad de la reacción electroquímica depende de la magnitud de las constantes de velocidad de las reacciones homogéneas de transferencia de protones y la reacción de adición de la amina sobre el anillo. También es evidente que cuando la molécula se cicla se afecta la distribución electrónica afectando el mecanismo rédox. Es por ello que aparece un segundo sistema donde los derivados de 5,6-dihidroxiindolina tienen potenciales rédox distintos a las catecolaminas.

El leucocromo (**4a**) que se genera de la adición-1,4 tipo Michael ya está en un estado reducido. Entonces para poder explicar el segundo sistema rédox se ha propuesto que se lleve a cabo una reacción de desproporción (E.3.6) entre la quinona protonada (**2a**) y el leucocromo (**4a**) donde se regenera la catecolamina original (**1a**) y se forma el aminocromo (**5a**). Esta última especie es la que se reduce en el potencial de la onda II<sub>c</sub> y posteriormente se vuelve a oxidar al llegar al potencial de la onda II<sub>a</sub>.





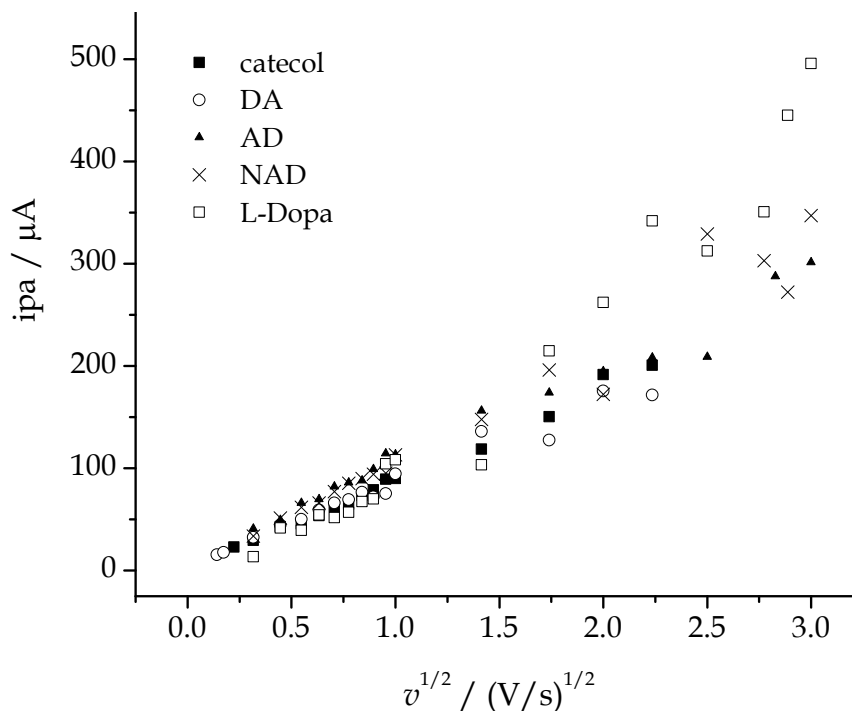
Es importante hacer notar que el proceso de reducción  $II_c$  también depende de la velocidad de las reacciones químicas acopladas a la transferencia de electrones en  $I_a$  como la ciclación intramolecular. Este control cinético se comprueba cuando se analiza el comportamiento de la onda  $II_c$  en función de la velocidad de barrido, en donde el sistema  $II_c/II_a$  de la DA se desacopla completamente a velocidades de barrido mayores de  $0.2 \text{ Vs}^{-1}$ . Por otro lado, para la adrenalina este sistema se mantiene hasta  $10 \text{ Vs}^{-1}$ .

De lo anterior se concluye que las velocidades de las reacciones químicas de AD son mayores que para los otros compuestos, en cambio la velocidad de ciclación de DA es menor. Estos resultados indican que es posible que la DA, en medios biológicos, reaccione preferentemente con moléculas que contengan azufre en su estructura como la cisteína, dado que es un nucleófilo más reactivo o con una nucleofilicidad más alta en comparación con el grupo amino.

Cabe mencionar, tal como se expuso en la sección 3.1, que en el plasma sanguíneo de ratas expuestas a estrés oxidativo [62], se ha encontrado un comportamiento similar al observado para las catecolaminas en la figura 3.19, que se asocia a la neurodegeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas, así como con una disminución de los niveles de dopamina en la sangre. La concentración de DA frecuentemente es medida por medio de una HPLC. Sin embargo es probable que se encuentre en el organismo en forma de quinonas de 5,6-dihidroxiindolina o derivados 5-S-cisteinilo, las cuales tienen potenciales rédox distintos a los que presenta la DA.

### 3.3.2. Análisis de los parámetros voltamperométricos de las catecolaminas

Para confirmar lo establecido en la sección anterior se realizó el análisis detallado de los parámetros electroquímicos medidos por VC. En general, las curvas de  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  (figura 3.30, 3.31, 3.32, 3.33) deben de mostrar una tendencia lineal en el intervalo de velocidades estudiadas cuando la transferencia de electrones es rápida y el proceso electroquímico es controlado por difusión. Además, si se trabaja en las mismas condiciones experimentales, es posible considerar la pendiente de esta recta como una medida indirecta del número de electrones involucrados en la reacción.



**Figura 3.30.** Gráficas de  $i_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  de la onda I presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas

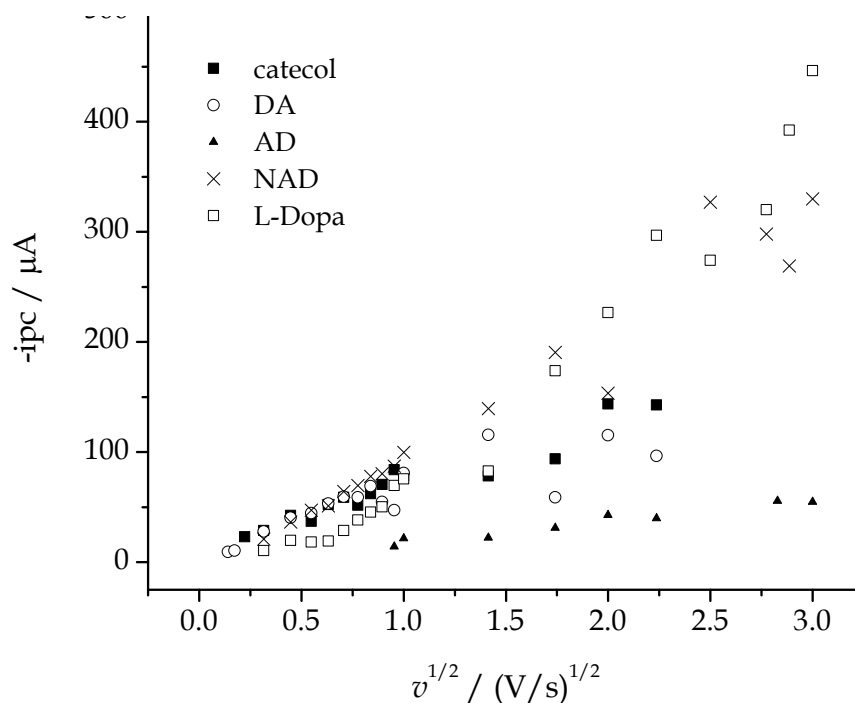
En la figura 3.30 se muestra la gráfica de  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  obtenida a partir de los valores de corriente de pico de la onda  $I_a$  donde ocurre la oxidación del grupo catecol. Aquí se puede observar que el aumento de corriente sigue un comportamiento aproximadamente lineal. Aunque, se calcularon las ecuaciones de las rectas asociadas a los datos obtenidos para cada catecolamina (tabla 3.3). Las pendientes de dichas rectas son similares lo que sugiere que existe el mismo número de electrones involucrados en el mecanismo de oxidación.

Una vez más se comprueba para la AD que las reacciones tanto de transferencia de electrones y de protones implicadas en su oxidación, son lo suficientemente rápidas para que la velocidad del proceso electroquímico únicamente esté determinado por la velocidad con que la especie se difunde desde el seno de la disolución hacia la superficie del electrodo, es por ello que el factor  $r$  es cercano a la unidad. Sin embargo, el valor de la ordenada al origen de esta recta también es el más alejado de cero, siendo esto un indicio de la presencia de reacciones químicas acopladas.

**Tabla 3.3.** Parámetros de las rectas ajustadas a los valores de  $i_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  de la onda  $I$

Compuesto	$m$ ( $\mu\text{A}/\text{Vs}^{-1/2}$ )	$b$ ( $\mu\text{A}$ )	$r$
Catecol	90.602	-1.273	0.996
Dopamina	77.711	8.318	0.986
Adrenalina	90.734	15.870	0.990
Noradrenalina	109.653	-1.959	0.977
L-Dopa	165.374	-61.635	0.979

Ahora bien, para la onda de reducción de las quinonas correspondientes las curvas de  $i_{pc}$  vs  $v^{1/2}$  muestran un comportamiento lineal sólo en el intervalo de velocidades de 100 a 1000 mV/s, con excepción de la L-dopa que muestra un comportamiento no lineal, lo cual se atribuye al efecto producido por el grupo  $-COO^-$  en la reacción de ciclación intramolecular.



**Figura 3.31.** Gráficas de  $-i_{pc}$  vs  $v^{1/2}$  de la onda I presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas

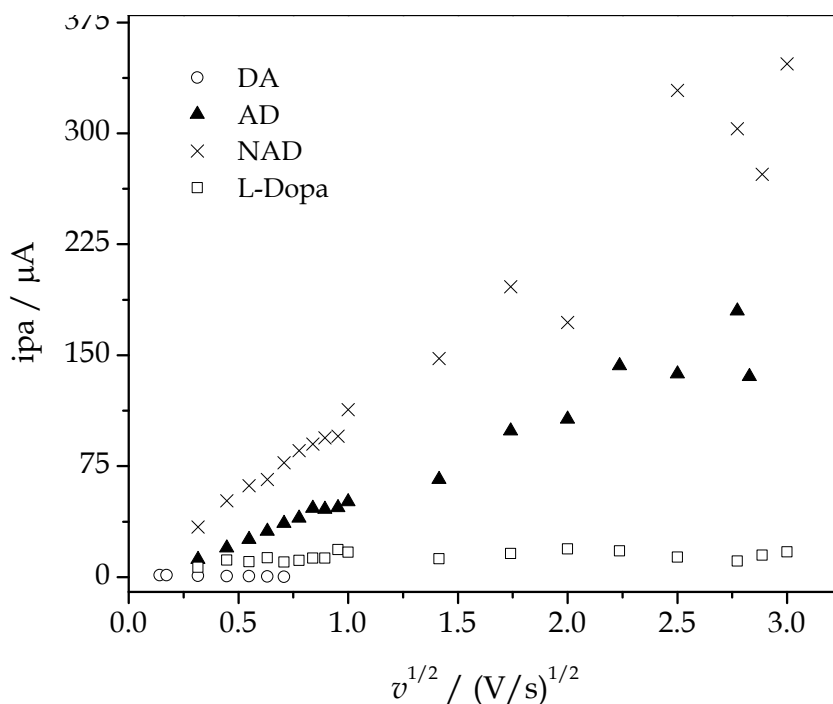
**Tabla 3.4.** Parámetros de las rectas ajustadas a los valores de  $-i_{pc}$  vs  $v^{1/2}$  de la onda I

Compuesto	$m (\mu A/Vs^{-1/2})$	$b (\mu A)$	$r$
Catecol	73.107	4.792	0.960
Dopamina	82.526	-0.632	0.994
Adrenalina	19.684	-2.107	0.975
Noradrenalina	107.793	-13.209	0.975
L-Dopa	a	a	a

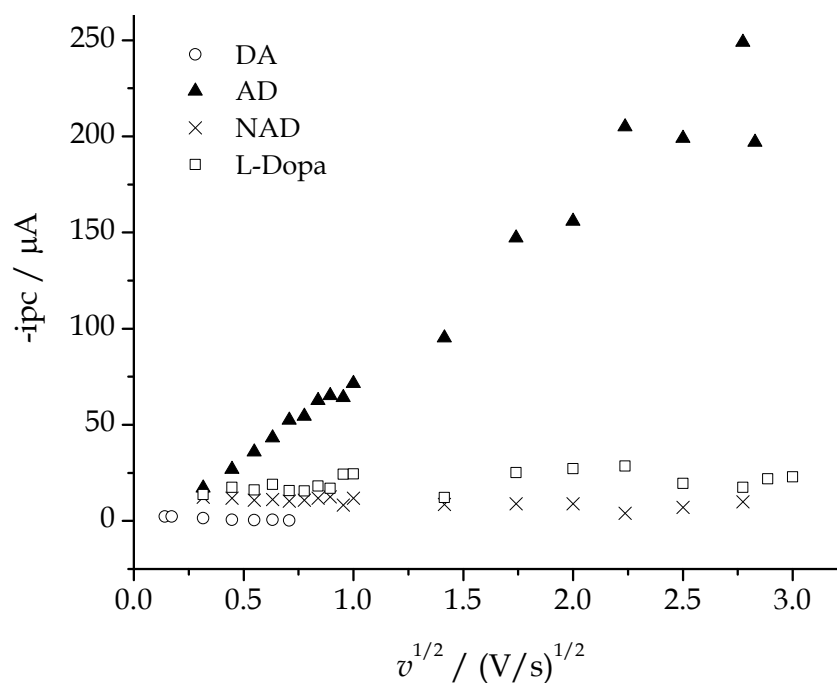
<sup>a</sup> No se asoció una recta a estos valores puesto que es evidente que no se comportan linealmente

A velocidades de barrido mayores de 1000 mV/s, las velocidades de las reacciones químicas acopladas tanto de transferencia de protones como de la ciclación intramolecular, afectan la rapidez de transferencia electrónica. Por lo tanto, el proceso electrodo deja de ser dependiente solamente de la difusión. Entre los valores de la tabla 3.4 se muestra una similitud de las pendientes para el catecol, la DA y la NAD.

También se determinaron las curvas de  $i_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  para el segundo sistema rédox. De esta manera se comprueba que la velocidad de la reacción de electrodo está dada por el control difusional a bajas velocidades. Posteriormente, ocurre una competencia entre las diversas reacciones químicas precedentes a la reducción del aminocromo.



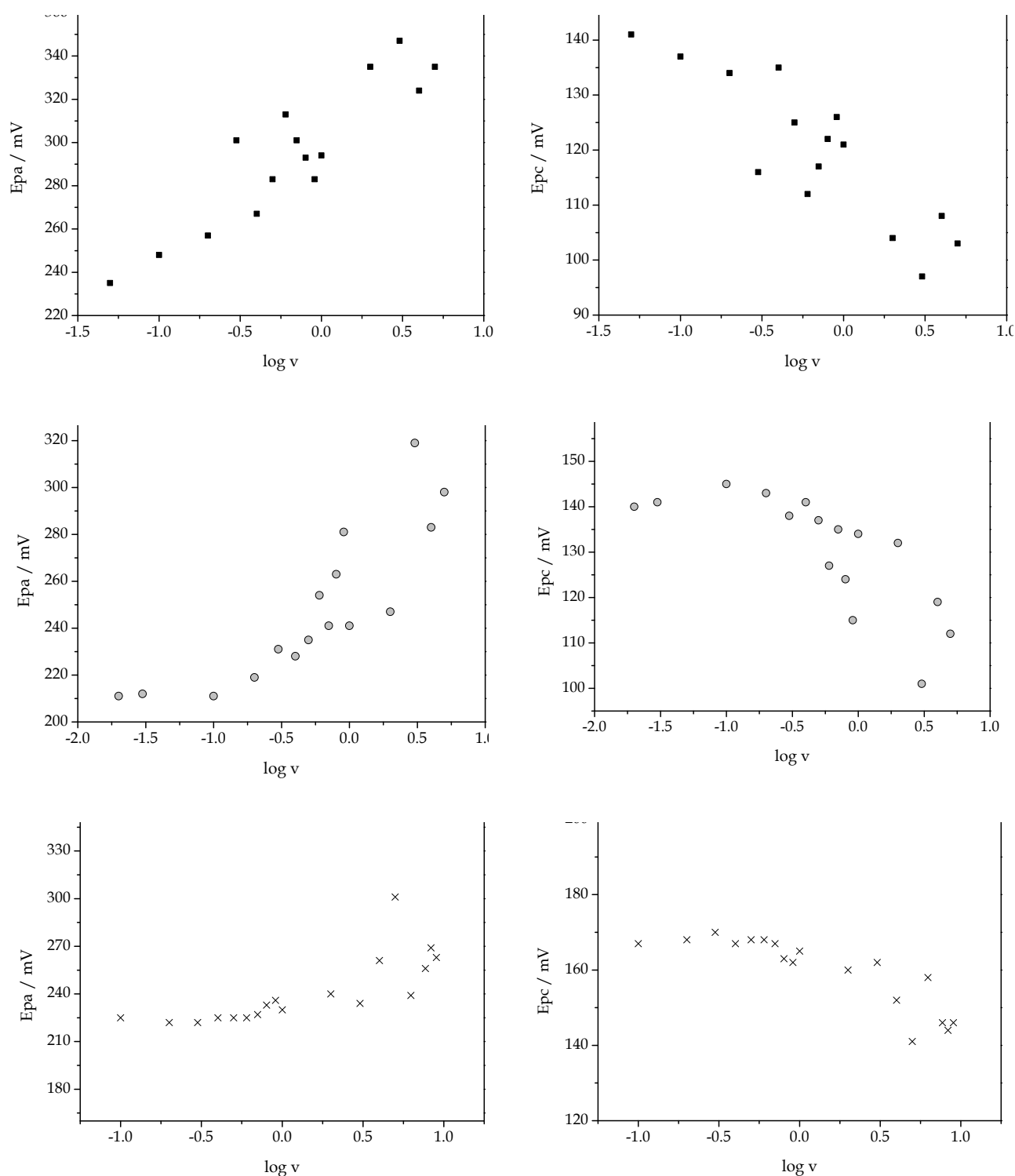
**Figura 3.32.** Gráficas de  $i_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  de la onda II presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas



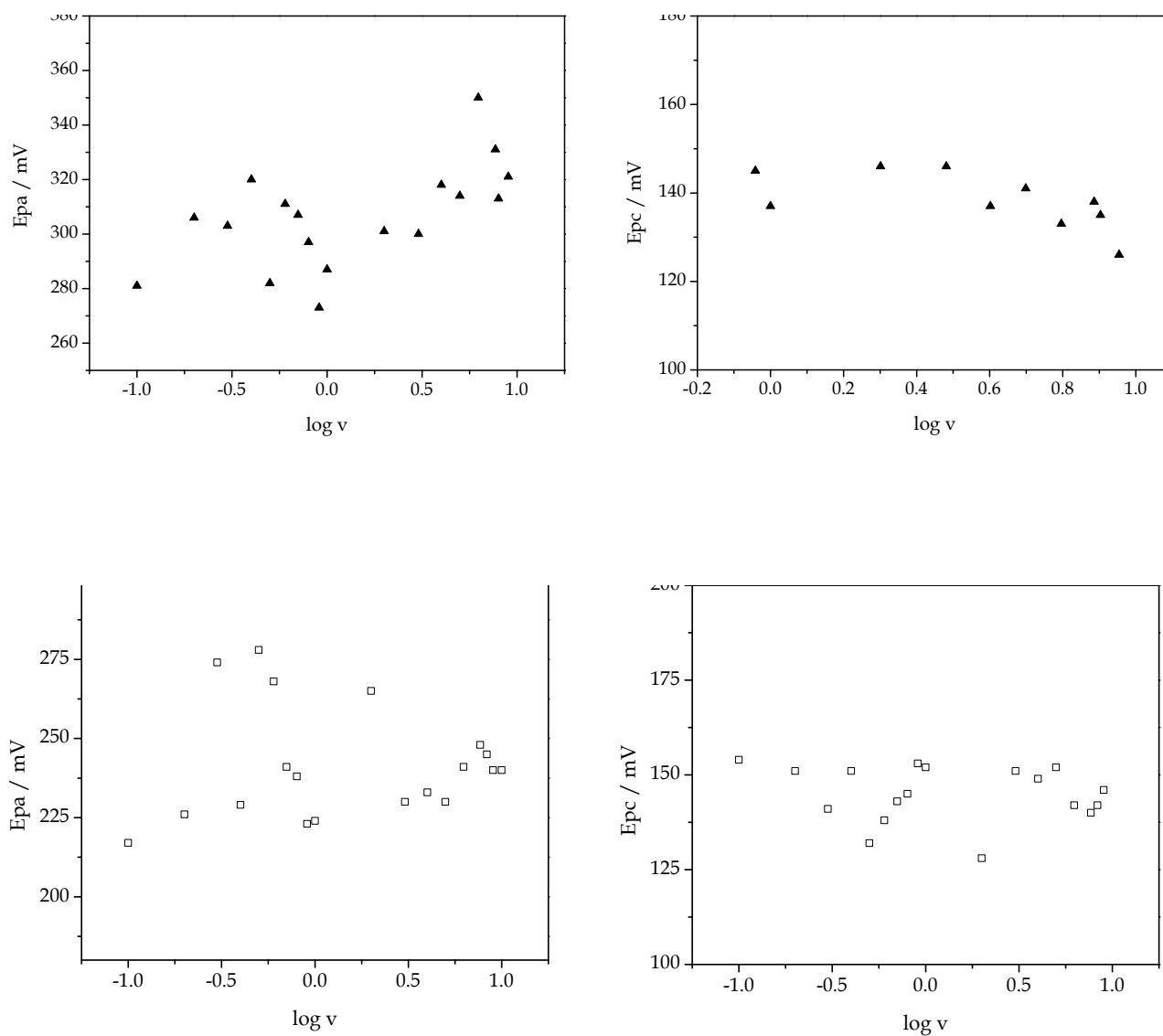
**Figura 3.33.** Gráficas de  $-i_{pc}$  vs  $v^{1/2}$  de la onda II presente en los voltamperogramas del catecol y las catecolaminas

En las figuras anteriores, se observan diferentes pendientes, puesto que la concentración de las especies que se reducen y oxidan a los potenciales del sistema II es dependiente principalmente de la velocidad de reacción de la adición 1,4 de Michael definida como  $K_c$ , y de la reacción de desprotonación previa a ésta.

Por otra parte, las curvas del potencial de pico como una función del logaritmo de la velocidad de barrido son rectas horizontales cuando se tienen sistemas donde la reacción de transferencia de carga es reversible. Estos valores son útiles para establecer el mecanismo de reacción global. De ello, se obtuvieron las gráficas para los dos sistemas oxido-reducción y se presentan en las figuras 3.34-3.37.

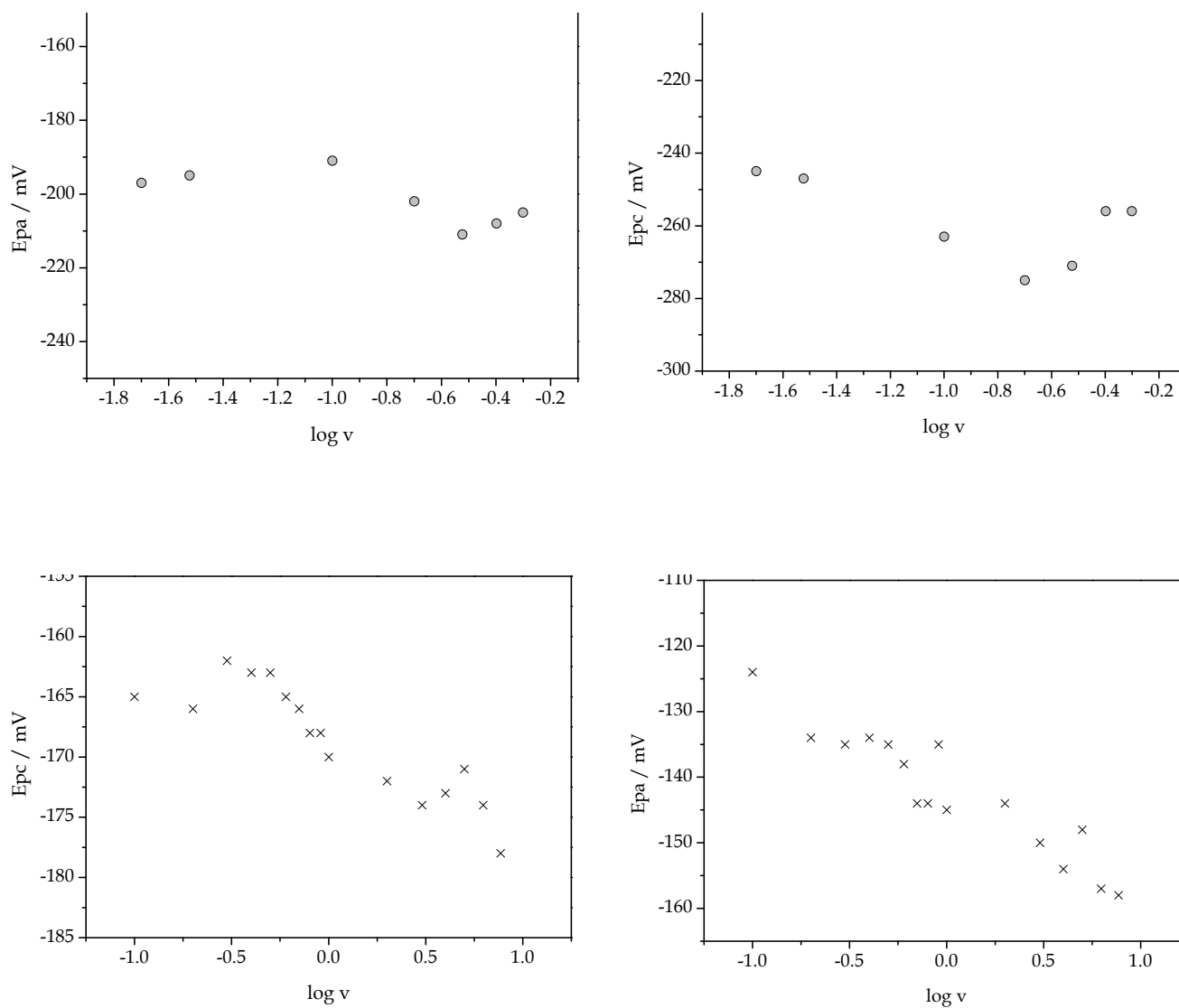


**Figura 3.34.** Gráficas de  $E_p$  vs  $\log v$  del sistema I presente en los voltamperogramas del (■) catecol, (●) DA y (x) NAD

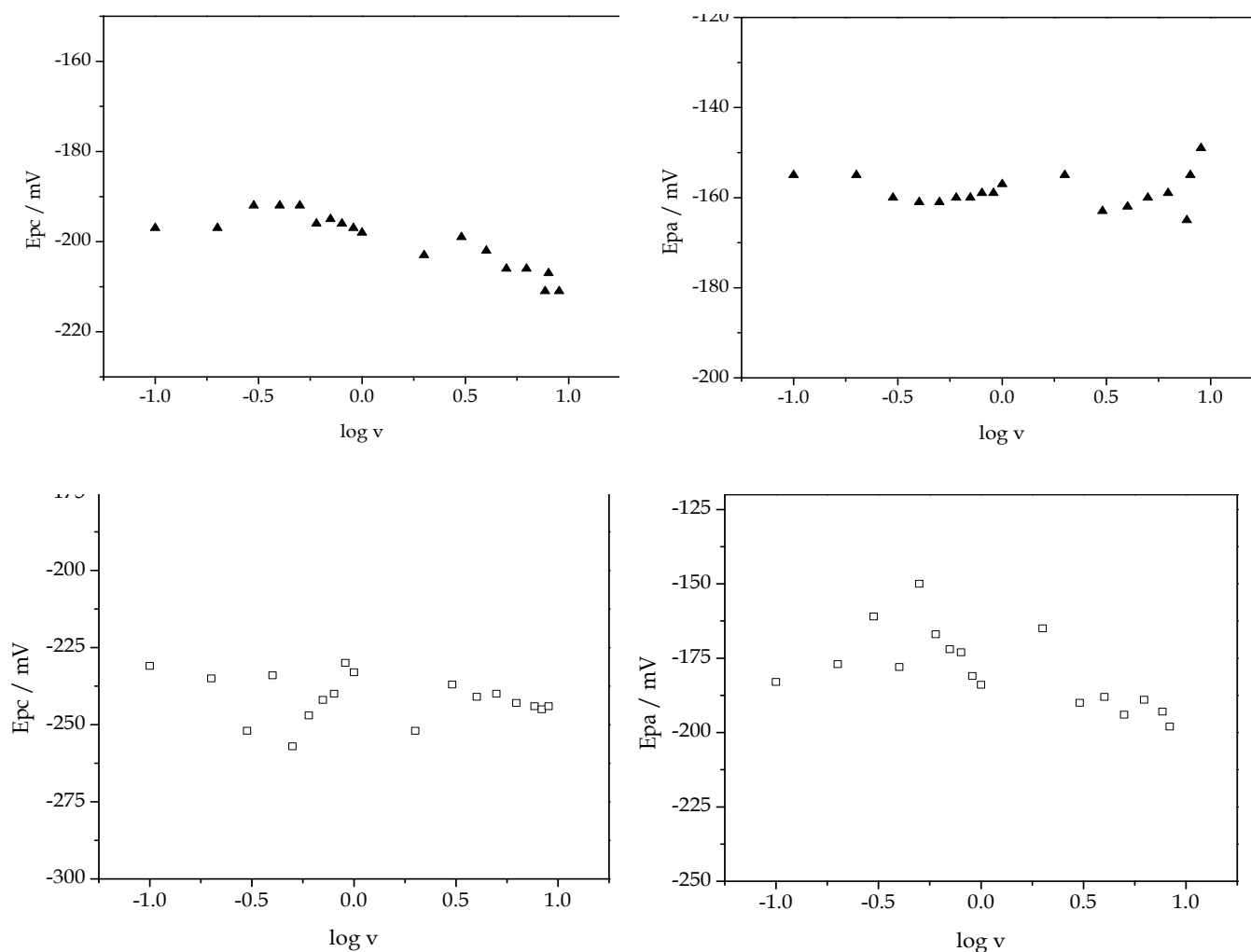


**Figura 3.35.** Gráficas de  $E_p$  vs  $\log v$  del sistema I presente en los voltamperogramas de (▲) AD y (□) L-Dopa





**Figura 3.36.** Gráficas de  $E_p$  vs  $\log v$  del sistema II presente en los voltamperogramas de (●) DA y (x) NAD



**Figura 3.37.** Gráficas de  $E_p$  vs  $\log v$  del sistema II presente en los voltamperogramas de ( $\blacktriangle$ ) AD y ( $\square$ ) L-Dopa

Con lo anterior, es evidente que durante las reacciones rédox de las catecolaminas se presentan reacciones químicas acopladas, pero no se puede diferenciar entre los procesos de ECEC y de desproporción porque ninguna de las dos reacciones es rápida, entonces el control cinético es el resultado de la competencia entre ambos.

Los resultados anteriores dan pauta a confirmar que la reacción electroquímica global tanto del catecol como la de las catecolaminas estudiadas, es dependiente de reacciones químicas acopladas, si bien estas pueden ser de intercambio de protones o de electrones en fase homogénea. Además se puede señalar que poseen constantes de velocidad bajas.

En contraste con el catecol, se encontraron más señales en los respectivos voltamperogramas de las catecolaminas, debido a que existen reacciones de transferencia de electrones que tienen diferencias energéticas entre ellas, causadas por el reacomodo electrónico que ocurre por el cambio estructural, resultado de la reacción de ciclación intramolecular.

Para validar la secuencia de reacciones propuesta anteriormente, se realizaron experimentos de espectroelectroquímica, resultados que se muestran en la siguiente sección y que permitieron detectar los cambios estructurales que experimentan las catecolaminas después de aplicar un potencial de oxidación.

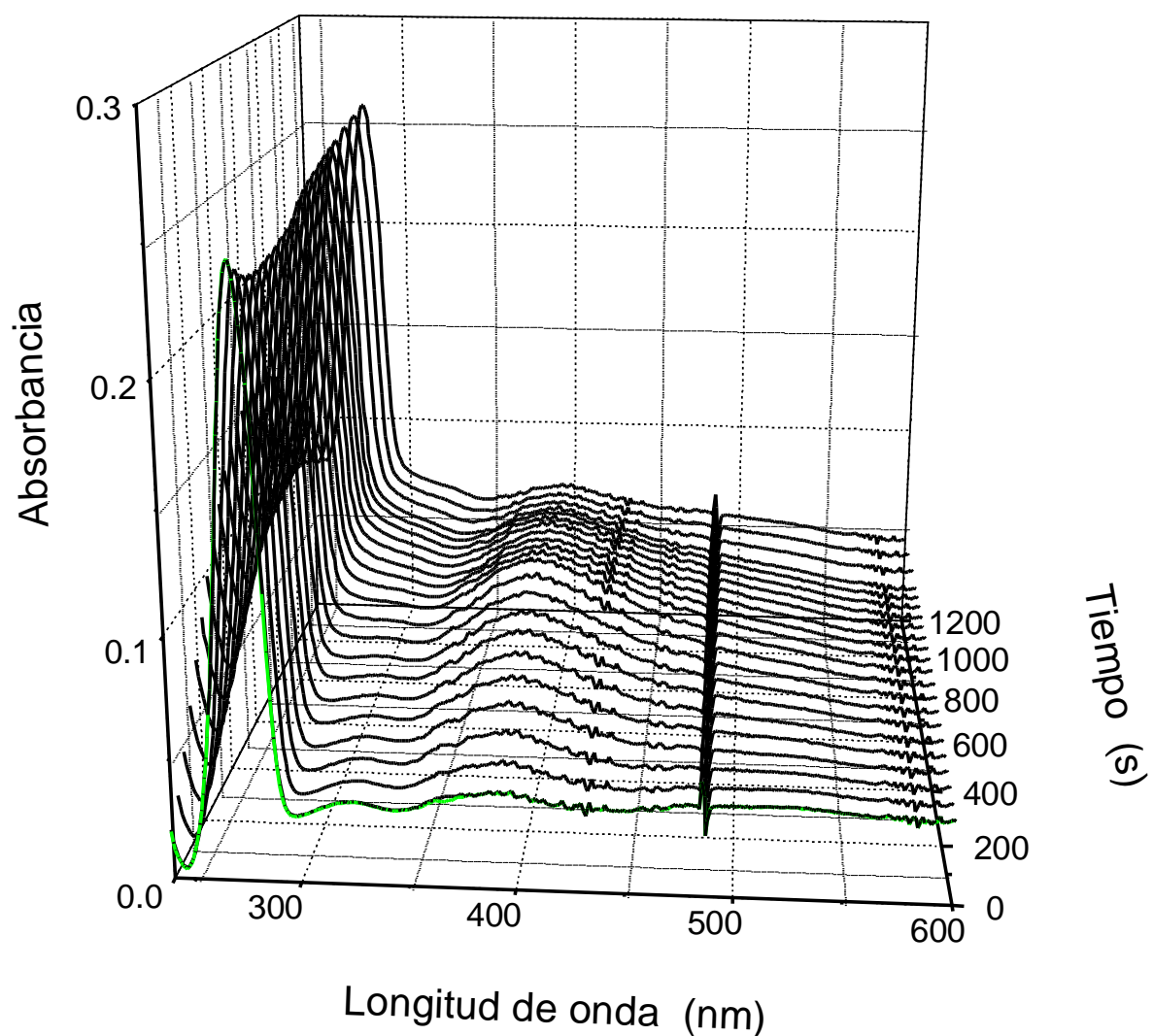
### 3.4. Espectroelectroquímica UV-visible aplicada en el estudio de la oxidación electroquímica de catecolaminas

Finalmente, se estudió la oxidación de las catecolaminas y la posibilidad de formar compuestos derivados de la 5,6-dihidroxiindolina, por medio de experimentos de espectroelectroquímica UV-vis. Para llevar a cabo esto se utilizó una celda de 1mm de paso óptico que no tiene las dimensiones que caracterizan a los métodos de capa fina. Por ello se sabe que la reacción sigue un régimen de difusión semi-infinito, descrito por la ecuación de Cottrell (E.1.16).

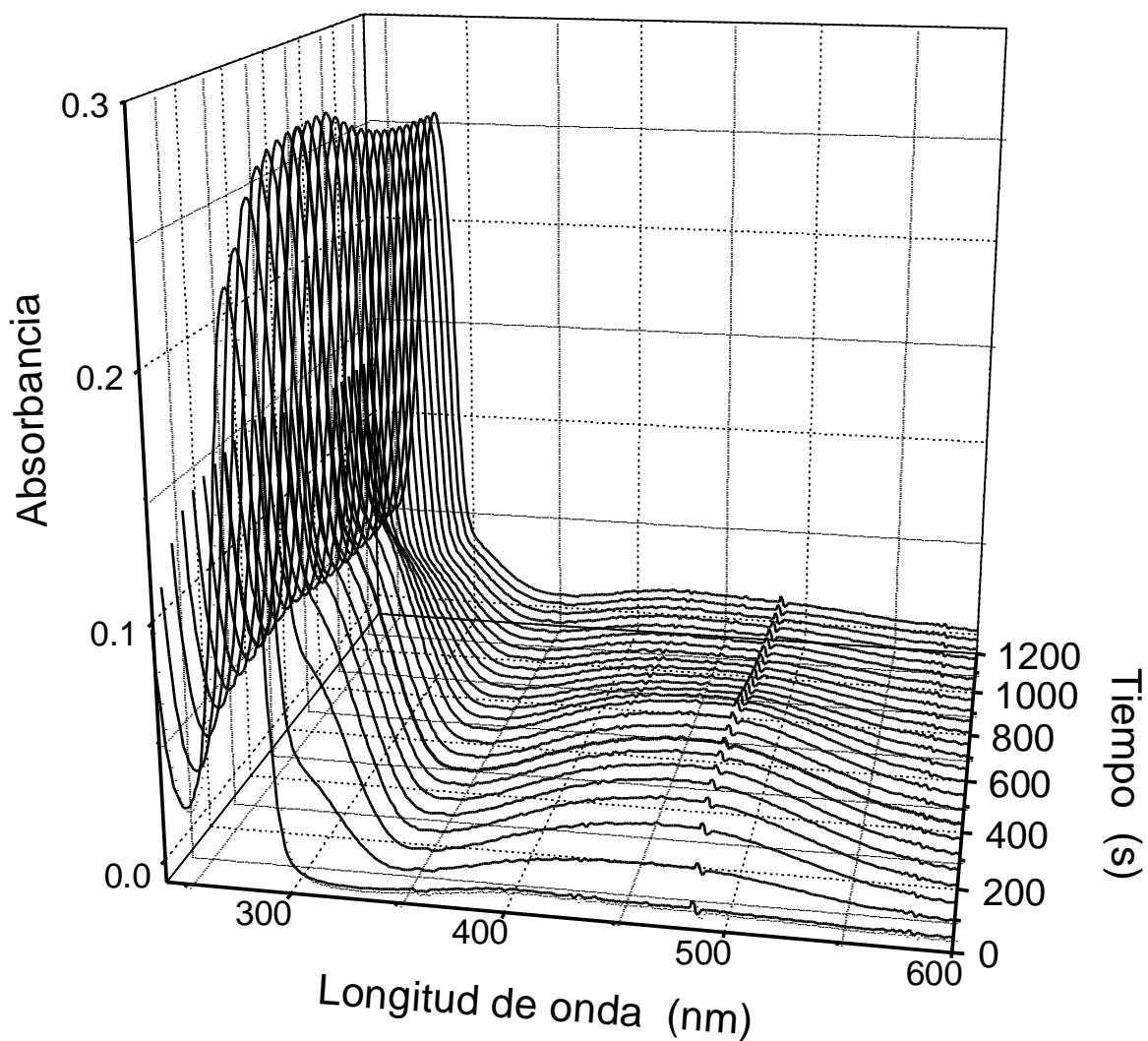
Para lograr hacer una macroelectrólisis en estas condiciones, se aplicó un pulso de potencial en valores lo suficientemente positivos para agotar toda la especie electroactiva en la superficie del electrodo. Generalmente se considera un potencial a 120 mV después del potencial de pico.

Al mismo tiempo en el que se efectúa la electrólisis se comienzan a obtener los espectros de absorción en el intervalo de 190 a 1100 nm cada dos segundos. Para todos los compuestos se observa la aparición de una banda de absorción con  $\lambda_{\text{máx}}$  a valores cercanos de 450 nm, la cual se asocia a una transición  $n \rightarrow \pi^*$ , característica de los grupos carbonilos de las quinonas [64]. Por otro lado, se observó la presencia de una banda en aproximadamente 300 nm que se ha relacionado con las transiciones electrónicas de heterociclos del tipo indolina. Esta banda no se observa en el caso del catecol (figura 3.38) en donde sólo existe la posibilidad de formar la  $\sigma$ -quinona

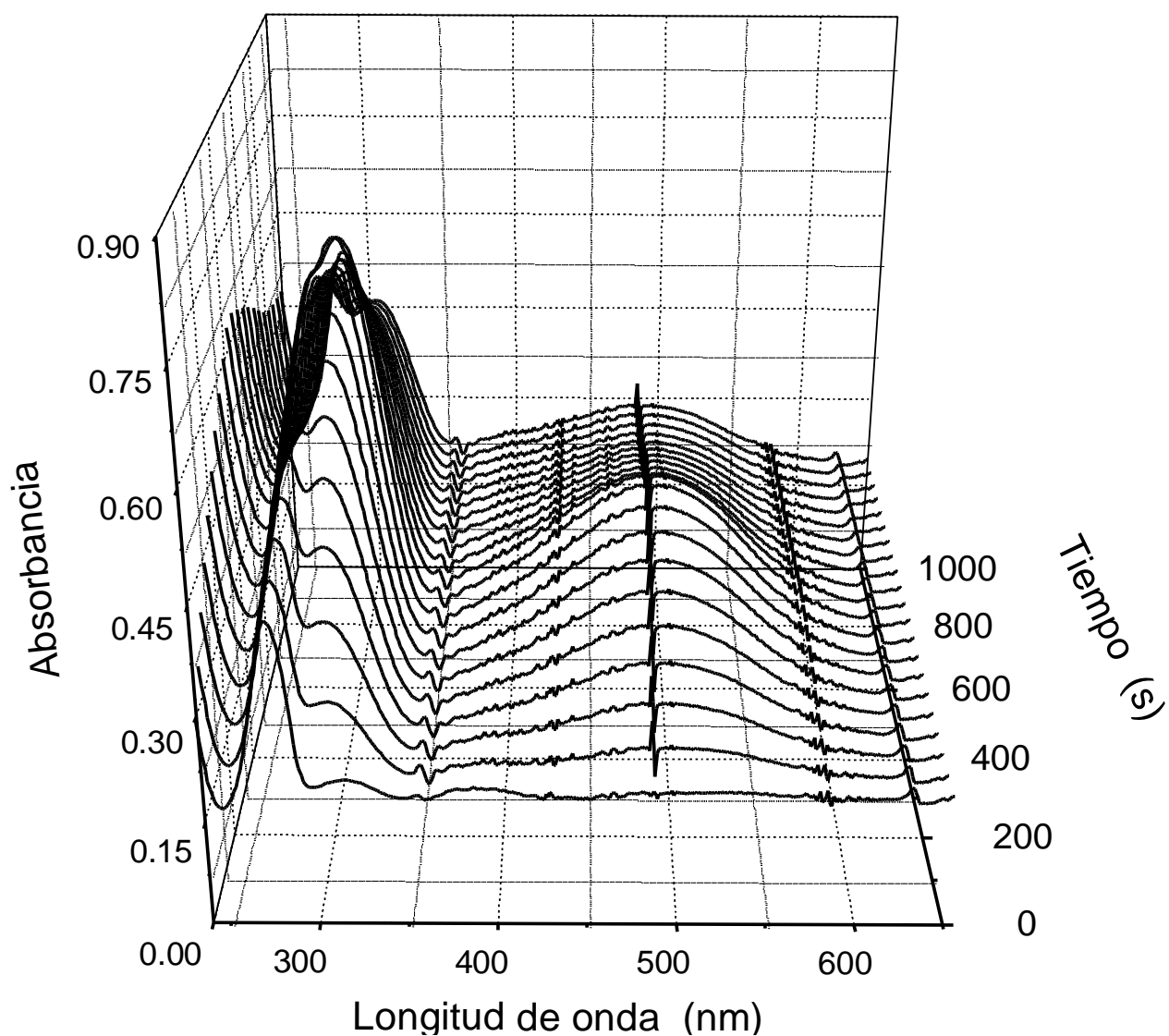
correspondiente, mientras que para la dopamina (DA) (figura 3.39) esta absorción sí está presente pero es sensiblemente menos intensa que para el caso de la adrenalina (AD) (figura 3.40), lo cual concuerda con los resultados electroquímicos.



**Figura 3.38.** Espectros de absorción de catecol 0.1 mM obtenidos en amortiguador de fosfatos pH 7.1. Electrólisis a potencial controlado (0.43V) en malla de Pt, electrodo de fibra de carbono como auxiliar y Ag/AgCl como referencia.



**Figura 3.39.** Espectros de absorción de dopamina 0.1 mM obtenidos en amortiguador de fosfatos pH 7.1. Electrólisis a potencial controlado (0.38 V) en malla de Pt, electrodo de fibra de carbono como auxiliar y Ag/AgCl como referencia.



**Figura 3.40.** Espectros de absorción de adrenalina 0.1 mM obtenidos en amortiguador de fosfatos pH 7.1. Electrólisis a potencial controlado (0.45 V) en malla de Pt, electrodo de fibra de carbono como auxiliar y Ag/AgCl como referencia.

# CONCLUSIONES





## VI. Conclusiones

Con el análisis voltamperométrico del plasma sanguíneo de ratas expuestas a ozono, se confirma la existencia de una relación entre la cantidad de especies oxidadas y el tiempo de exposición, el cual se sabe provoca un estado de estrés oxidativo que produce una degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas.

También fue posible determinar las especies  $H_2Q/Q$  tanto de DA como de L-dopa, que se adicionaron a bajas concentraciones al plasma sanguíneo de ratas sin exposición a ozono. Además, se observó que los potenciales de óxido-reducción de estas catecolaminas están dentro del intervalo de potenciales de las ondas que se encontraron para el plasma en condiciones oxidativas. Sin embargo, en las zonas de potencial anódico y catódico no se pueden diferenciar las señales de L-Dopa y DA dado sus semejanzas estructurales.

Por otra parte, se encontró que el AA en plasma tiene un potencial de pico anódico distinto al de las catecolaminas, esto significa que es posible detectarlas en coexistencia. No obstante, el AA sí puede llegar a ser un interferente en la determinación, en el caso de que se encuentre en mayor concentración respecto a la DA y L-dopa.

Estos resultados condujeron a ampliar el estudio de las catecolaminas en un medio menos complejo que el plasma. En este caso se realizaron experimentos en medio acuoso amortiguado a pH 7. Con ello, se estableció que el grupo catecol y la amina son

electroactivos en la ventana de potenciales permitida en las condiciones experimentales empleadas.

En especial, se centró el interés en el grupo catecol debido a su importancia biológica y la facilidad con que se oxida para formar *o*-quinonas, comprobando con VC que esta reacción ocurre mediante el intercambio de dos electrones y dos protones de manera irreversible para el 1,2-dihidroxibenceno así como para las catecolaminas. Además, la cinética de la reacción electroquímica global está controlada en conjunto por la velocidad de las reacciones heterogéneas y homogéneas dado que son reacciones lentas.

Entre las reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga, se encuentran los equilibrios ácido-base, que se establecen por cambios en la basicidad de átomos de oxígeno cuando pierden o ganan electrones, o bien existe la posibilidad de que ocurran reacciones de desproporción entre especies generadas como intermediarios del las reacciones de electrodo. También, se demostró que todas las catecolaminas aquí analizadas tienen la capacidad de formar derivados de 5,6-dihidroxiindolina mediante la reacción de adición-1,4 (tipo Michael intramolecular). Dicha reacción afecta la distribución electrónica en cada molécula, por lo tanto la energía de los electrones se ve modificada. Esto se ve reflejado en VC por la aparición de un segundo sistema rédox, donde también ocurre un intercambio de dos electrones y dos protones, que a su vez es dependiente de las reacciones involucradas en el primer sistema.

Es importante hacer notar que la estructura química de las catecolaminas define las características principales de la reacción de ciclación intramolecular. Por una parte, se tiene el efecto de donación electrónica del grupo R unido al anillo aromático y el -OH presente en la NAD. Mientras que por otro lado, la amina secundaria en la AD parece tener una mayor influencia sobre la velocidad de ciclación intramolecular, debido al cambio de basicidad provocado por la electrodonación del grupo metilo hacia el átomo de nitrógeno.

Las bandas de absorción observadas en los espectros son características de los intermediarios de oxidación que son las *o*-quinonas y de las especies que resultan de la adición intramolecular propuesta.

De lo anterior se puede indicar que las catecolaminas de partida se oxidan con mayor facilidad en el orden DA > L-dopa > NAD > Catecol > AD. Así mismo, la quinona de la adrenalina manifiesta la reacción de adición con una velocidad mayor, seguida por la correspondiente velocidad de reacción de la L-Dopa, noradrenalina y dopamina. Por lo tanto, el orden de estabilidad de las quinonas electrogeneradas es inverso a la velocidad con que se pueden formar los aminocromos.

Se piensa que la quinona de la dopamina es la especie más tóxica en comparación con las de otras catecolaminas, ya que la velocidad de oxidación es mayor, mientras que la rapidez de su ciclación es menor, permitiendo que la quinona participe en reacciones nucleofílicas con las macromoléculas presentes en las células.

Dado que los aminocromos formados después de la oxidación de las catecolaminas, tienen potenciales de reducción distintos se ha pensado que se debe de dar mayor importancia a la búsqueda de métodos electroanalíticos adecuados para su determinación. Otra de las razones que se ha mencionado anteriormente y que apoya esta propuesta es que en el plasma de ratas se encontró que el AA no presenta una señal detectable por VC en el intervalo de potenciales establecido. Un sistema de detección que se base en la reducción de los aminocromos será de gran utilidad ya que su presencia se puede llegar a relacionar con el daño celular en enfermedades como el Parkinson.

## VII. Perspectivas

Con base en los resultados mostrados en esta tesis se propone:

- ❖ Continuar el análisis del comportamiento electroquímico de las catecolaminas en plasma sanguíneo pero usando una técnica de pulsos que ofrezca una mayor resolución entre las señales observadas en VC.
- ❖ Ampliar el estudio electroquímico en medios acuosos y no acuosos de las catecolaminas utilizando otras técnicas como la cronamperometría, que proporcionará un mayor detalle de la cinética de reacción. Además de comprobar el mecanismo propuesto con métodos de simulación a partir de los datos electroquímicos presentados.
- ❖ Al mismo tiempo, se sugiere diseñar un electrodo modificado aprovechando las características principales de los aminocromos y detectarlos a potenciales catódicos donde el ácido ascórbico no es una especie interferente. Para ello también podría ser de utilidad considerar sus propiedades ácido-base.

Por último es importante mencionar que para proponer en un futuro algún método de detección no se debe olvidar que éstos deben ser accesibles, con el fin de hacer un diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson de una manera sencilla, aunque esto puede representar el mayor reto.

# ANEXOS



### **A.1. Estrés oxidativo y radicales libres**

El estrés oxidativo (EOx) está caracterizado por la sobreproducción de especies de alto potencial oxidante, que por su alta reactividad provocan alteraciones en la estructura de biomoléculas tales como las proteínas, los lípidos [65] y los ácidos nucleicos [66]. Además es propio del EOx el que los organismos vivos sean incapaces de eliminar eficientemente dichas especies oxidantes, las que se acumulan desencadenando la muerte celular.

El concepto de estrés oxidativo se introdujo por primera vez como una hipótesis para explicar los mecanismos moleculares implicados en el proceso normal de envejecimiento. El amplio interés que ha cobrado este tema surge a partir del aumento en la expectativa de vida de las personas, y las enfermedades asociadas a la pérdida neuronal que ocurren durante la senescencia.

El EOx es una modificación de la teoría original de los radicales libres (RL) que fue propuesta por Rebeca Gerschman y Harman en los inicios de la década de 1950-1960, en un momento en que se conocía relativamente poco sobre los sitios celulares de generación de los radicales libres y sus subsecuentes reacciones moleculares [67].

La teoría de RL por sí sola no es idónea para dar una idea global que explique el proceso de senescencia que conduce a la muerte, dado que concibe al envejecimiento como un fenómeno aleatorio donde se producen incidental e incontrolablemente RL derivados del oxígeno [68]. No obstante, se sabe que durante el envejecimiento se produce una secuencia característica, progresiva, irreversible e incluso predecible, de cambios en todos los niveles de organización biológica que no pueden ser explicados a través de mecanismos azarosos [69].

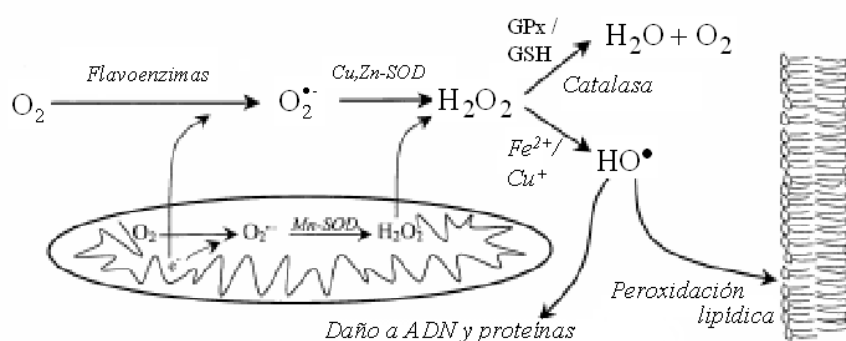
Por otra parte, **el EOx es un desequilibrio entre las especies reactivas del oxígeno (ERO's),** especies reactivas de nitrógeno (ERN) y las defensas antioxidantes, que además está influenciado por factores genéticos y ambientales. Sin embargo, el EOx no solamente está asociado con el proceso de envejecimiento, también se ha establecido que existe un aumento de radicales libres relacionado con fumadores y con el consumo excesivo de alcohol [70].

Ciertamente, la idea central del EOx se basa en la interacción de los organismos aerobios con el oxígeno. Se ha establecido que este elemento desempeña una doble función, porque por una parte es necesario para la vida pero en algunas ocasiones también produce un efecto tóxico.



El oxígeno participa principalmente en el proceso de respiración celular que se realiza dentro de las mitocondrias, donde se obtiene energía libre del proceso de transferencia de electrones del NADH y del FADH<sub>2</sub> al O<sub>2</sub>, a través de centros rédox unidos a proteínas. Esta secuencia de reacciones está acoplada a la fosforilación oxidativa que resulta en la síntesis de ATP (trifosfato de adenosina). El ATP que es una molécula esencial en el metabolismo por su capacidad de transmitir cantidades relativamente grandes de energía libre, dado que la hidrólisis de sus enlaces anhídrido fosfato son reacciones exergónicas (liberan energía) que pueden a su vez acoplarse con indistintos tipos de reacciones endergónicas que requieren energía para llevarse a cabo [71].

Durante la reducción del O<sub>2</sub> en la mitocondria (figura A.1) se forman especies reactivas **(ERO's) que incluyen radicales libres** (anión superóxido, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>; radical hidroxilo, HO<sup>•</sup>) y moléculas como el peróxido de hidrógeno. **La producción de ERO's puede o no estar** mediada por enzimas. Sí se adiciona un electrón a la molécula de oxígeno, este debe de entrar en un orbital  $\pi^*$  originando el radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con una reactividad comparativamente baja [72]. Este radical carece de la capacidad para penetrar las membranas lipídicas, por ello queda confinado al lugar en donde se produce. Aunque puede ser formado fuera de la mitocondria vía la actividad de flavoenzimas [73], se sabe que este radical tiene funciones relevantes dentro de las células como un indicador en la comunicación celular y muestra la capacidad de regular algunas funciones como la apoptosis [74].



**Figura A.1.** Formación de especies reactivas del oxígeno en la mitocondria [73]

En seguida, el  $O_2^{\bullet-}$  dismuta espontáneamente en medio acuoso para formar  $H_2O_2$  y oxígeno molecular, esta reacción puede estar acelerada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) [75]. El  $H_2O_2$  no es un radical libre, pero es muy importante por su capacidad de penetrar las membranas biológicas y difundirse hasta el citoplasma. Una vez que sale de la mitocondria, se vuelve un intermediario en la producción de otras especies aún más reactivas. Por ejemplo, al oxidar metales de transición como  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  (reacción de Fenton) se origina el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), altamente reactivo [76]. Otra función importante del peróxido de hidrógeno consiste en ser un mensajero en la comunicación intracelular [77].

En contraste, en altas concentraciones, las ERO's generadas pueden ser mediadores importantes en el daño de estructuras celulares. La mitocondria, tiene una función importante en los procesos de envejecimiento, no sólo por el hecho de producir ERO's sino

porque también es susceptible a ser atacada por estas especies [78]. Se ha encontrado daño sobre la membrana interna, así como a los componentes de la CTE o al ADN mitocondrial, lo cual incrementa a su vez la producción de ERO's y consecuentemente las alteraciones a dichas estructuras. La disfunción de la membrana incrementa su permeabilidad a los iones y al agua. La acumulación de estas sustancias causa un hinchamiento de la célula, activación de proteasas, y el comienzo de la muerte celular. En particular, el superóxido y el  $H_2O_2$  no reaccionan con el ADN pero forman el **HO•** que reacciona con casi todo tipo de moléculas, como desoxirribosas, purinas, pirimidinas [79], fosfolípidos, ácidos orgánicos y carbohidratos [80].

Así, la función fisiológica normal depende de un balance entre **ERO's y los sistemas antioxidantes** como mecanismos de adaptación [81], que en organismos aerobios se han desarrollado durante milenios [82]. Cuando las células se encuentran en condiciones de estrés oxidativo, pueden adaptarse si comienzan a sintetizar mayores cantidades de antioxidantes, los cuales se clasifican en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos (tabla A.1). Los principales sistemas enzimáticos incluyen a la catalasa (CAT), a la superóxido dismutasa (SOD) y a la glutatión peroxidasa (GPx), que son esenciales en la protección contra las especies oxidantes indeseables. Mientras que los antioxidantes enzimáticos consisten en una serie de vitaminas y otras moléculas de bajo peso.

**Tabla A.1. Principales sistemas antioxidantes que regulan la concentración de ERO's en el organismo**

<i>Sistemas no enzimáticos</i>			
<b>Antioxidante</b>	<b>Estructura</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>
Vitamina C	Ácido ascórbico	Intra y extracelular	Atrapa $\text{HO}^\bullet$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$
Glutati3n	$\gamma$ -Glu-Cys-Gly	Intracelular	Es sustrato de la glutati3n peroxidasa (GSH-Px) en el ciclo r3dox, reacciona con $\text{HO}^\bullet$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ , as3 como con radicales libres org3nicos.
3cido 3rico	purina		Atrapa $\text{HO}^\bullet$ , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\text{ROO}^\bullet$ , se une a metales de transici3n
Vitamina E	$\alpha$ -tocoferol	Membranas, fluidos extracelulares	Interrumpe la lipoperoxidaci3n en la fase de propagaci3n. Se produce un radical tocoferilo que es estable, y reacciona con la vitamina C para regenerarse.
$\beta$ -caroteno	Precursor de la vitamina A	Membranas	Atrapa $\text{O}_2^{\bullet-}$ , reacciona con radicales peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ )
<i>Sistemas enzim3ticos</i>			
<b>Enzima</b>	<b>Cofactor</b>	<b>Localizaci3n</b>	<b>Funci3n</b>
SOD	Mn (en mitocondria) y Cu y Zn (citosol)	Mitocondria y citosol	Convierte el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en $\text{H}_2\text{O}_2$
GPx	GPx cofactor selenio	Citosol	Transforma $\text{H}_2\text{O}_2$ en dos mol3culas de agua y dos mol3culas de glutati3n reducido (GSH) formando entre ellas un enlace disulfuro (GSSH). Se regenera por la acci3n de la glutati3n reductasa.
CAT		Peroxisomas	Destruye el $\text{H}_2\text{O}_2$ por dismutaci3n

Las alteraciones causadas por el estrés oxidativo, pueden ser factores importantes en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington, entre otras. Esto se debe, en primer lugar a que el cerebro contiene una gran cantidad de ácidos grasos poli-insaturados que son altamente susceptibles a la peroxidación lipídica; además, es especialmente vulnerable al ataque de las especies reactivas debido a su alto consumo de  $O_2$  para producir energía; finalmente, el cerebro es relativamente deficiente de sistemas antioxidantes con una baja actividad de la glutatión peroxidasa y catalasa en comparación con otros órganos [83]. Por lo tanto, si los organismos vivos se encuentran bajo condiciones de estrés oxidativo se puede causar un daño neuronal importante.

Experimentalmente, el estrés oxidativo se puede inducir con toxinas capaces de generar especies reactivas, o bien, abatiendo las defensas antioxidantes. Se ha demostrado que el  $O_3$  inhalado, dependiendo de la dosis, produce un aumento en los radicales libres, los cuales al no ser eliminados por las defensas antioxidantes pulmonares conllevan a la formación secundaria de especies reactivas del oxígeno (ERO's) y especies reactivas del nitrógeno (ERN) en el organismo; como se sabe, estas especies viajan a través del flujo sanguíneo hasta el sistema nervioso central, y al no haber una respuesta apropiada por parte de los sistemas antioxidantes endógenos, conducen al estrés oxidativo.

De la misma manera, las catecolaminas presentes en el sistema nervioso son una fuente de producción de radicales libres. Por ejemplo, el paso catalizado por la monoamino oxidasa (MAO) durante el catabolismo de la DA, la serotonina y la noradrenalina produce  $H_2O_2$ .

La pérdida del equilibrio óxido-reducción provoca la oxidación de la dopamina en presencia de metales de transición, con formación del radical superóxido, del peróxido de hidrógeno, del radical hidroxilo y del peroxinitrito. Las quinonas de DA pueden reaccionar con la cisteína y producir residuos de cisteinilo, estos residuos son capaces de inhibir la función de muchas proteínas y provocar una disminución de ATP por bloqueo de la cadena respiratoria. Sin embargo, los mecanismos en la producción de quinonas y su contribución al daño celular aún son desconocidos.

## **A.2. Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento de progresión lenta que se caracteriza por una pérdida selectiva de neuronas que contienen dopamina (dopaminérgicas), la cual se ha asociado al estrés oxidativo. Aunque la causa de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas aún es desconocida, se han propuesto diversos mecanismos para explicar esta degeneración. Sin embargo, sólo algunos de estos estudios han descrito por qué la muerte celular es específica y progresiva únicamente en las neuronas de DA [84].

El neurotransmisor dopamina (DA) está presente en terminaciones neuronales que están distribuidas a través de todo el cerebro, sin embargo la mayor cantidad de neuronas dopaminérgicas están confinadas en áreas específicas del cerebro [85]. La mayoría de las neuronas están localizadas a la mitad del cerebro en una zona cercana a la base, formando dos grupos que se conocen como sistemas nigroestriatal y mesolímbico. En particular, se ha reportado que normalmente existe un decremento de las neuronas dopaminérgicas en el sistema nigroestriatal del 7% por década, que sucede entre los 10 y 80 años [86], esto significa que a los 80 años de edad, aproximadamente el 50% de estas neuronas han muerto. Mientras que la enfermedad de Parkinson es el resultado de la pérdida de un 70-80% de neuronas dopaminérgicas en el sistema nigroestriatal [87].

Entre los principales factores que se han relacionado con la degeneración de neuronas de DA se encuentran: **i)** la existencia de DA libre que se oxida a aminocromo como una consecuencia de la sobreproducción de DA, inhibición y/o baja expresión de los transportadores de catecolaminas en las vesículas sinápticas e inhibición y/o baja expresión de MAO [88]; **ii)** el aumento de hierro que favorece la oxidación de la dopamina [89]; **iii)** condiciones de estrés oxidativo [90], que incluyen un **aumento de ERO's y** un decremento de las defensas antioxidantes [91], también se han relacionado con la patogénesis y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, al observar un aumento significativo en la cantidad de productos derivados de la peroxidación de lípidos en el cerebro de pacientes con esta enfermedad [92].

La disfunción de las mitocondrias, la cual es considerada una de las causas más importantes en la muerte de neuronas de DA en la EP, conlleva a la generación de **especies reactivas del oxígeno (ERO's) que puede resultar en la muerte celular. Esto se ha comprobado por la disminución de la actividad de los complejos III y I de la cadena de transporte de electrones, que se ha encontrado en el cerebro de pacientes con EP [93]. Sin embargo, las ERO's son producidas no sólo en las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas sino en todo tipo de células. Por lo tanto, la generación de ERO's no explica el daño selectivo provocado en las neuronas de personas con EP.**



Por otra parte, una fuente de estrés oxidativo (EOx), única para las neuronas dopaminérgicas, es la presencia de dopamina por si misma. Esto es porque el anillo de catecol se oxida formando quinonas de DA y especies reactivas de oxígeno (ERO's) tales como el superóxido y  $H_2O_2$  en una reacción que ocurre espontáneamente (autooxidación), la cual es catalizada por los metales de transición o por las enzimas. Estos productos de oxidación alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial, y por lo tanto inducen los mecanismos de apoptosis. Además, las quinonas de DA son deficientes de electrones por lo que pueden reaccionar con nucleófilos celulares tales como los grupos sulfhidrilos presentes en la cisteína libre, el glutatión (GSH) y residuos de la cisteína en las proteínas [15].

Las neuronas dopaminérgicas tienen mecanismos para prevenir la oxidación de la dopamina y consisten en:

1. La incorporación de la dopamina en vesículas que por tener un bajo valor de pH interno, estabilizan la estructura de catecol, confiriéndole resistencia a la oxidación ya que los protones están fuertemente unidos a los átomos de oxígeno en la molécula.
2. Otro mecanismo, es el metabolismo de la DA realizado por la monoamino oxidasa (MAO), que controla la concentración de DA libre oxidándola para formar aminocromos, que posteriormente se polimerizan dando lugar a una estructura denominada neuromelanina (ver posible estructura en [92]). Sin embargo, los aminocromos por otra parte pueden conjugarse con GSH, y ser reducidos vía la transferencia de uno o dos

electrones mediante una reacción catalizada por la quinona reductasa, evitando así la **formación de ERO's** [88].

Finalmente, existe una controversia en el empleo de L-Dopa en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, con el cual se presenta una mejoría en los síntomas. Sin embargo, también se tiene evidencia de su posible toxicidad [94]. Actualmente se emplean otros medicamentos alternativos como los agonistas de DA e inhibidores de enzimas que metabolizan la DA, con el fin de mejorar la calidad de vida de las personas con EP. Las investigaciones con respecto a los mecanismos de neurodegeneración continúan realizándose, con el objetivo de detener el proceso acelerado de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, pero para ello, también es importante desarrollar un método para hacer un diagnóstico temprano de la enfermedad.

### A.3. Calibración de espectrofotómetro Agilent

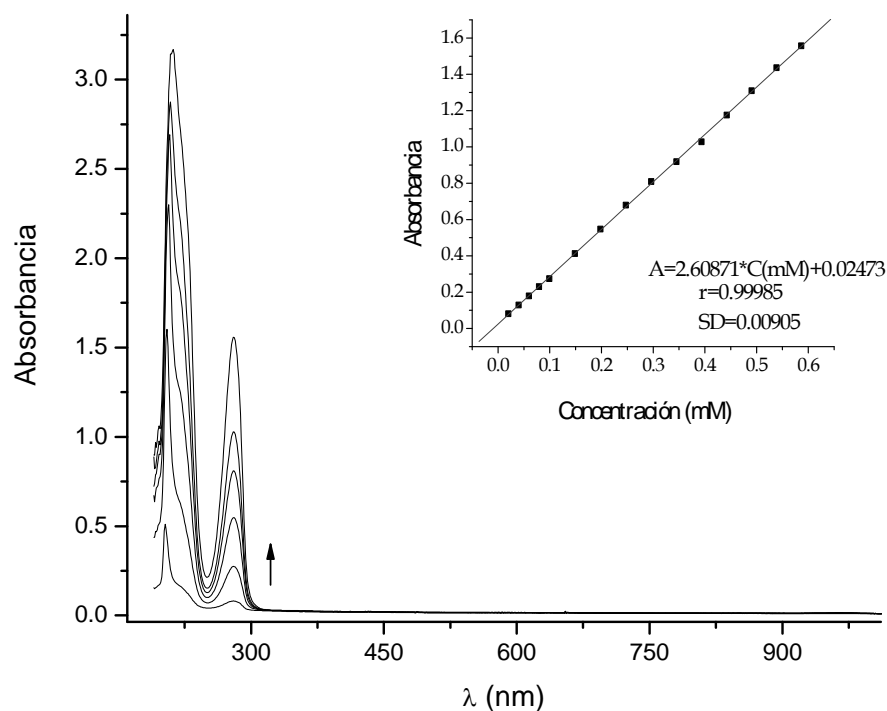
Los espectros de absorción en la región UV-visible de DA, L-Dopa, NAD, AD y catecol presentan tres absorciones máximas que se asocian al sistema  $\pi$  del anillo aromático (tabla A.2). Además, en las figuras A.2 y A.3 se muestran los espectros de absorción y las curvas de calibración obtenidas para concentraciones crecientes de DA y L-Dopa. Con base en lo anterior se puede concluir que para todos los compuestos se tiene una variación lineal de la absorbancia en  $\lambda_3$ , en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 1 mM.

**Tabla A.2.** Longitudes de onda de absorción máxima de derivados de benceno.

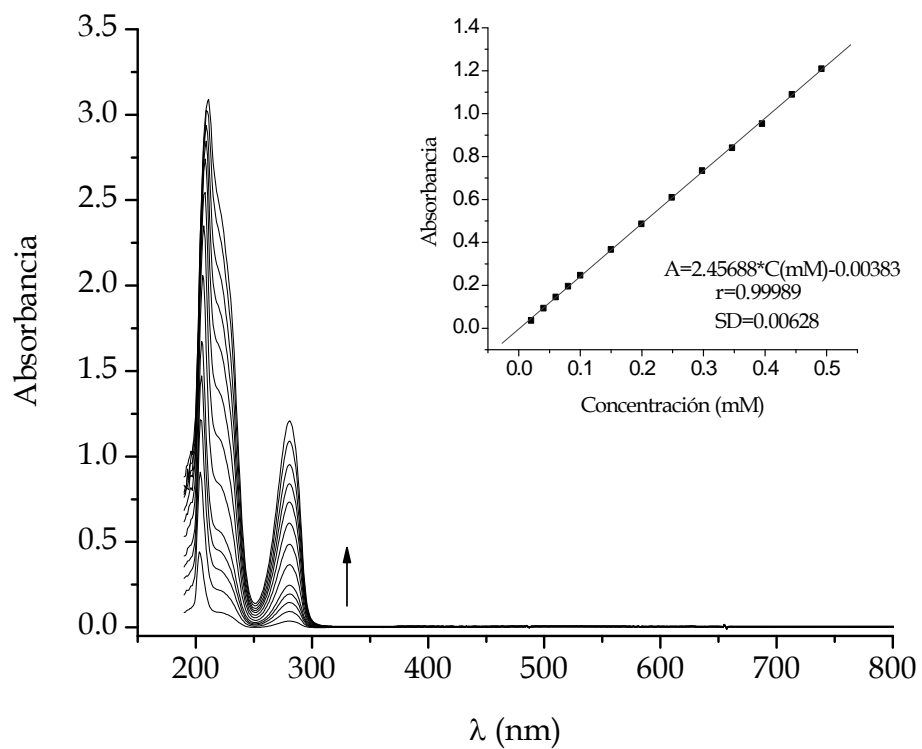
Compuesto	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	$\lambda_4$
Benceno*	184	203.5	254	-
Fenol <sub>agua</sub> *	-	210.5	270	-
Catecol*	-	214	275.5	-
Catecol	203	213	276	-
DA	204	218	280	-
L-Dopa	208	220	281	-
6-OHDA	205	-	277	483

\* Valores de  $\lambda$  informados en la literatura [95, 64]

Además, la 6-OHDA tiene una banda de absorción máxima en 483 nm la cual está relacionada a una transición  $n \rightarrow \pi^*$  que es característica de los grupos carbonilo de las quinonas. Aunque para este compuesto se tienen evidencias de que se oxida con facilidad, formando la *orto*-quinona que en solución presenta un color rosa característico, y después ocurre un cambio de color a anaranjado, que indica una modificación en la distribución de los electrones debido a la formación de la *para*-quinona que es más estable [96].



**Figura A.2.** Espectros de absorción UV-vis de DA en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7. El inserto muestra la curva de calibración asociada



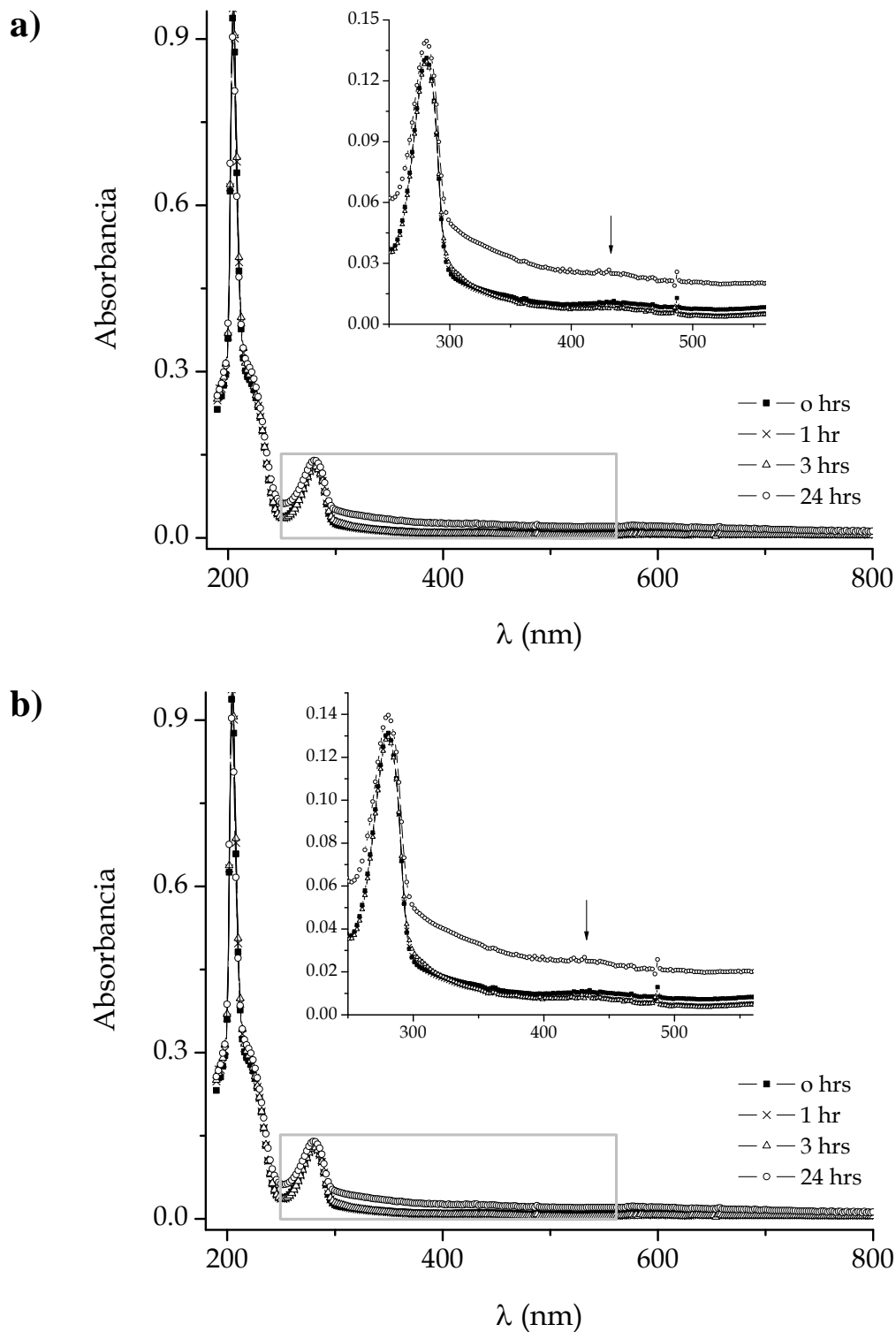
**Figura A.3.** Espectros de absorción UV-vis de L-Dopa en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7. El inserto muestra la curva de calibración asociada

#### **A.4. Determinación de la estabilidad de las catecolaminas en medio acuoso a pH 7 por espectroscopia UV-vis**

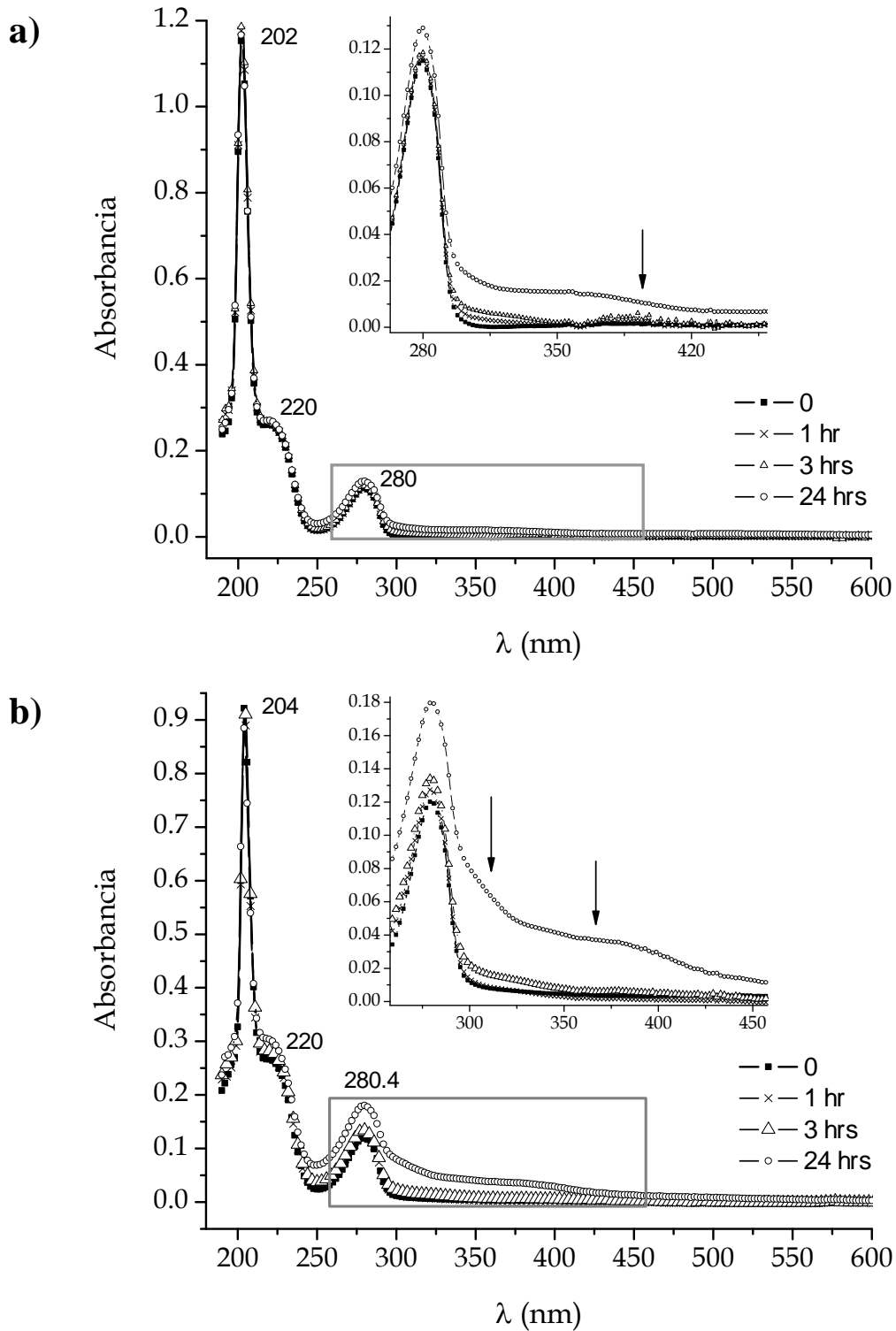
Para determinar la estabilidad que presentan los compuestos que se utilizaron en esta investigación, se analizó el comportamiento espectroscópico de soluciones de analito en medio acuoso amortiguado a pH 7, que se mantuvieron con y sin exposición a la luz. También se desplazó el oxígeno del medio con un flujo de N<sub>2</sub> dado que son compuestos que se oxidan con facilidad.

Posteriormente, se obtuvieron los espectros de absorción de cada catecolamina a diferentes tiempos para observar el efecto de la exposición a luz sobre su estabilidad. En primer lugar, los espectros de la serie de soluciones sin exposición a la luz no muestran cambios visibles dentro de un intervalo de 24 horas, sin embargo la pequeña fracción de quinona que se genera y no es detectable con espectrofotometría UV-vis, parece ser que comienza a polimerizar después que ha transcurrido dicho intervalo de tiempo. Por ello, se suspendió la adquisición de espectros.

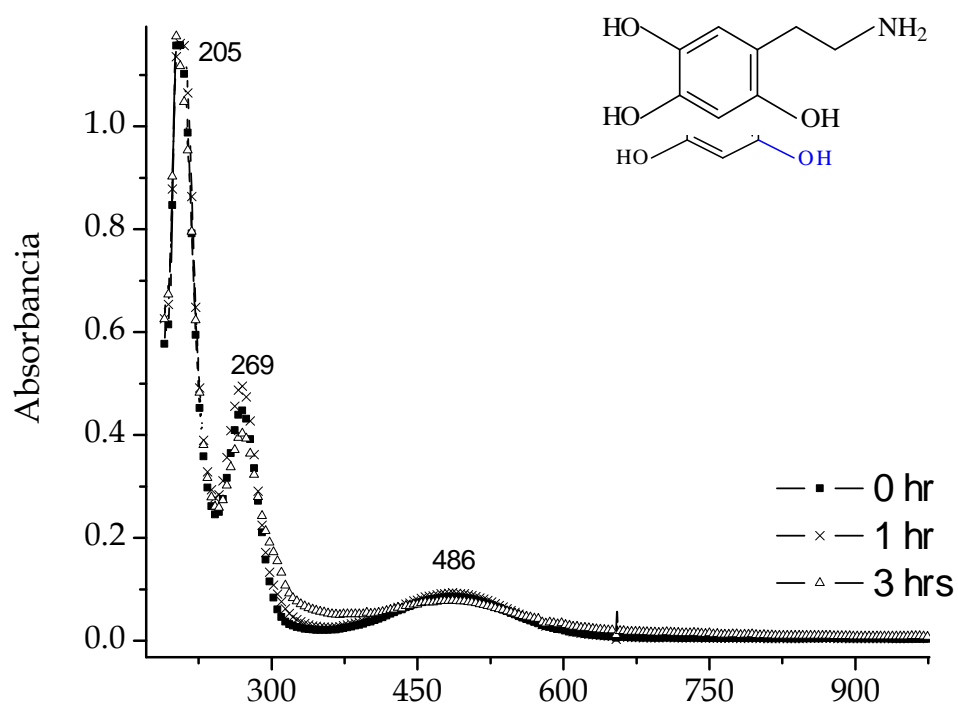
Por otra parte, los espectros obtenidos de la serie de soluciones que se mantuvieron expuestas a la luz, se muestran en las figuras A.4, A.5 y A.6 donde se observan bandas de absorción de baja intensidad asociadas a los compuestos oxidados. Por ello, las soluciones que se utilizaron en esta investigación se prepararon justo antes de cada experimento y se protegieron de la luz.



**Figura A.4.** Análisis espectrofotométrico de a) DA y b) L-Dopa 0.05 mM en buffer 0.1 M de fosfatos a pH 7.07, en función del tiempo y con exposición a luz. El inserto muestra una ampliación de la sección marcada en el recuadro



**Figura A.5.** Análisis espectrofotométrico de a) NAD y b) AD 0.05 mM en buffer 0.1 M de fosfatos a pH 7.07, en función del tiempo y con exposición a la luz. El inserto muestra una ampliación de la sección marcada en el recuadro.



**Figura A.6.** Análisis espectrofotométrico de 6-hidroxi dopamina 0.05 mM en buffer 0.1 M de fosfatos a pH 7.07, en función del tiempo y con exposición a luz.



---

**VIII. Referencias**

1. Pereyra M.N., Rugerio V.C., Angoa P.M., Borgonio P.G., Rivas A.S. Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **2006**, 31, 114-123
2. Miyazaki I., Asanuma M., Diaz C.F.J., Fukuda M., Kitaichi K., Miyoshi K., Ogawa N. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone formation-related molecules. *The FASEB Journal*, **2006**, 1-22
3. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **1964**, 239, 2910-2917.
5. Ganong, William F., *Fisiología médica*. 15 ed. El Manual Moderno. México, D.F. **1996**. Capítulo 4.
6. Monteiro H.P., Winterbourn C.C., 6-Hydroxydopamine releases iron from ferritin and promotes ferritin-dependent lipid peroxidation. *Biological Pharmacology*, **1989**, 38, 4177-4182..
7. Packer L., Prilipko L., Christen Y. *Free Radicals in the Brain, Aging, Neurological and Mental Disorders*, Springer Verlag. Berlin **1992**, pp. 21
8. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3a ed., Oxford University Press, Londres **1999**, pp. 8-28
9. Stokes A.H., Hastings T.G., Vrana K.E., Cytotoxic and Genotoxic Potential of Dopamine, *Journal of Neuroscience Research*, **1999**, 55, 659-665
10. Kato T., Ito S., Fujita K. Tyrosinasa-catalyzed binding of 3,4-dihydroxyphenylalanine with proteins through the sulfhydryl group. *Biochimica of Biophysica Acta*, **1986**, 881, 415-421
11. Fornstedt B., Rosengren E., Carlsson A. Occurrence and distribution of 5-cysteinyll derivatives of dopamine, DOPA and DOPAC in the brains of eight mammalian species. *Neuropharmacology*, **1986**, 25, 451-454.
12. Hastings T.G., Zigmond M.J. Identification of catechol-protein conjugates in neostriatal slices incubated with [<sup>3</sup>H] dopamine: impact of ascorbic acid and glutathione. *Journal of Neurochemistry*, **1994**, 63, 1126-1132.

- 
13. Berman S. B., Zigmond M. J. Hastings T.G. Modification of dopamine transporter function: effect of reactive oxygen species and dopamine. *Journal of Neurochemistry*, **1996**, 67, 593-600.
14. Yimei X., Stokes A.H. Roskoski R., Vrana K.E. Dopamine, in the Presence of Tyrosinase, Covalently Modifies and Inactivates Tyrosine Hydroxylase, *Journal of Neuroscience Research*, **1998**, 54, 691-697
15. Berman S.B, Hastings T.G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, **1999**, 73, 1127
16. Moldeus P., Nordenskjold M., Bolcsfoldi G., Eiche A., Haglund U., Lambert B., Genetic toxicity of dopamine. *Mutation Research*, **1983**, 124, 9-24
17. Adams R..N., Probing Brain Chemistry with Electroanalytical. *Analytical Chemistry*, **1976**, 48, 1128-1138
18. a) Wightman R.M., May A.C. Michael A.C., Detection of Dopamine Dynamics, *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 769A; b) Khan A.S., Invasive consequences of using micro-electrodes and microdialysis probes in the brain. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 503-508; c) Wilson G.S., Gifford R., Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 20, 2388-2403
19. a) Zetterstrom T., Sharp T., Marsden C.A., Ungerstedt J., In Vivo Measurement of Dopamine and Its Metabolites by Intracerebral Dialysis: Changes After d-Amphetamine. *Journal of Neurochemistry*, **1983**, 41, 1769; b) Baur J.E., Kristensen E.W., May L.J., Wiedemann D.J., Wightman R.M., Fast-Scan Voltammetry of Biogenic Amines, *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 1268-1272
20. Sopchack D., Miller B., Determination of the Second-Order Rate Constant for the Reduction of Dopamine Quinone with Ascorbic Acid, *Journal of Physical Chemistry A*, **2000**, 104, 7545-7548
21. Guan P.J, Xiang Q.L., Ping M.G., Novel choline and acetylcholine modified glassy carbon electrodes for simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2004**, 569, 135-142
22. Lane R. F., Hubbard A. T. Differential double pulse voltammetry at chemically modified platinum electrodes for *in vivo* determination of catecholamines. *Analytical Chemistry*, **1976**, 48, 1287
-

- 
23. a) Pihel K., Walker Q.D., Wightman R.M., Overoxidized Polypyrrole-Coated Carbon Fiber Microelectrodes for Dopamine Measurements with Fast-Scan Cyclic Voltammetry, *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 2084-2089; b) Bath B.D., Michael D.J., Trafton B.J., Joseph J.D., Runnels P.L., Travis E.R., R.M. Wightman, Subsecond Adsorption and Desorption of Dopamine at Carbon-Fiber Microelectrodes, *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 5994; c) Bath B.D., Martin H.B., Wightman R.M., Anderson M.R., Dopamine Adsorption at Surface Modified Carbon-Fiber Electrodes, *Langmuir*, **2001**, 17, 7032-7039; d) Venton B.J., Troyer K.P. Wightman R.M., Response Times of Carbon Fiber Microelectrodes to Dynamic Changes in Catecholamine Concentration, *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 539-546.
24. Young T.E., Babbitt B.W., Electrochemical Study of the Oxidation of  $\alpha$ -Methyldopamine,  $\alpha$ -Methyladrenaline, and dopamine, *Journal of Organic Chemistry*, **1983**, 48, 562-570
25. Fang X., Menguan G., Lin W., Guoyue S., Zhang W., Litong J., Jiye J., Sensitive determination of dopamine on poly(aminobenzoic acid) modified electrode and the application toward an experimental Parkinson animal model, *Talanta*, **2001**, 55, 329-336
26. Lei Z., Yu G.S., Covalent Modification of Glassy Carbon Electrodes with  $\beta$ -Alanine for Voltammetric Separation of Dopamine and Ascorbic Acid. *Analytical Sciences*, **2001**, 17, 939-943
27. Rubianes M.D., Rivas G.A., Highly selective dopamine quantification using a glassy carbon electrode modified with a melanin-type polymer, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 440, 99-108
28. Gao Z., Yap D., Zhang Y., Voltammetric Determination of Dopamine in a Mixture of Dopamine and Ascorbic Acid at a Deactivated Polythiophene Film Modified Electrode, *Analytical Sciences*, **1998**, 14, 1059-1961
29. Ting L., Meixian L., Qianyuan L., Electroanalysis of Dopamine at a gold electrode modified with N-acetylcysteine self-assembled monolayer, *Talanta*, **2004**, 63, 1053-1059
30. Aguilar R., Dávila M.M., Elizalde M.P., Mattusch J., Wennrich R., Capability of a carbon-polyvinylchloride composite electrode for the detection of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta*, **2004**, 49, 851-859
31. 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, *Electrochemical and Solid-State Letters*, **1999**, 2, 49-51
-

- 
32. Rice M.E., Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain, *Trends in Neurosciences*, **2000**, 23, 209–216
33. Protiva R.R., Takeyoshi O., Takeo O., Simultaneous electroanalysis of dopamine and ascorbic acid using poly(N,N-dimethylaniline)-modified electrodes, *Bioelectrochemistry*, **2003**, 59, 11-19.
34. Gerhardt G.A., Oke A.F., Nagy G., Moghaddam B., Adams R.N., Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS Electrochemistry, *Brain Research*, **1984**, 290, 390-395
35. Rice M.E., Oke A.F., Bradberry C.W., Adams, R.N., Simultaneous voltammetric and chemical monitoring of dopamine release in situ. *Brain Research*, **1985**, 340, 151
36. a) Mo J., Ogorevc B., Simultaneous Measurement of Dopamine and Ascorbate at their Physiological Levels Using Voltammetric Microprobe Based on Overoxidized Poly(1,2-phenylenediamine)-Coated Carbon Fiber, *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 1196; b) Doménech A., García H., Doménech C.M.T., Galletero M.S., 2,4,6-Triphenylpyrylium Ion Encapsulated into Zeolite Y as a Selective Electrode for the Electrochemical Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid, *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 562.
37. Carvalho A. J. F., Ferreira M., Valgo D.T., Oliveira Jr., Faria R.M., Synthesis of Poly(styrene-co-methyl methacrylate)-Based Ionomers and Their Langmuir and Langmuir-Blodgett (LB) Film Formation, *Journal of Physical Chemistry B*, **2004**, 108, 7033-7039
38. Lian X., Yuqing L., Ping Y., Lei S., Lanqun M., Laccase-catalyzed oxidation and intramolecular cyclization of dopamine: A new method for selective determination of dopamine with laccase/carbon nanotube-based electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta*, **2006**, 52, 4144-4152
39. Baeza A., *Tácticas y estrategias en electroquímica orgánica*. Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM.
40. Mabbott G.A., An Introduction to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60, 697-701
41. Bard A.J., Faulkner L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley and Sons, New York, **1980**. Cap. 1. Introduction and Overview of Electrode Processes, pp. 14-21

- 
42. Maloy, J.T., Factors affecting the shape of current-potential curves. *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60, 285-289
43. Kissinger P.T., Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60, 702
44. Christensen P.A., Hamnett A., *Techniques and Mechanisms in Electrochemistry*, Blackie Academic & Professional, Gran Bretaña, **1994**.
45. Willard H.H., *Métodos instrumentales de análisis*, Compañía Editorial Continental, México, **1981**.
46. Skoog D.A., Leary J.J., *Análisis Instrumental*, 4a ed., McGraw-Hill, España, **1994**. Capítulo 8.
47. Harris D.C., *Análisis Químico Cuantitativo*, 2ª ed. Reverté, España, **2001**, Cap. 19
48. Heineman W.R., Spectroelectrochemistry: The Combination of Optical and Electrochemical Techniques, *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60, 305-307.
49. Bard A.J., Faulkner L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Jhon Wiley and Sons, New York, **1980**. Capítulo 14, Spectrometric and Photochemical Experiments.
50. Uchimiya M., Stone A.T., Redox reactions between iron and quinones: Thermodynamic constraints. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2006**, 70, 1388.
51. Sánchez R.A., Corona A.S., Alarcón A.G., Rojas H.A., Ramírez S.M., Romero R.M. A., Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants. *Spectrochimica Acta Part A*, **2003**, 59, 3193-3203.
52. Moffat, A. C., et al., eds., Clarke's Isolation and Identification of Drugs, 2nd ed., The Pharmaceutical Press London **1986**, p. 702
53. Corona A.S., Alarcón A.G., Rojas H.A., Romero R.M.A., Ramírez S.M.T., Study on the stability of adrenalina and on the determination of its acidity constants. *Spectrochimica Acta Part A*, **2005**, 61, 305-311
54. Corona A.S., Rojas H.A., Romero R.M.A., Palomar P.M., Ramírez S.M.T., Study on the stability of noradrenalina and on the determination of its acidity constants. *Spectrochimica Acta Part A*, **2005**, 61, 3139-3144
-

- 
55. Bautista M.J.A., González I., Aguilar M.M., Influence of acidity level in acetonitrile on Hammett–Zuman type correlations on the reduction of  $\alpha$ -hydroxyquinones. *Electrochimica Acta*, **2003**, 48, 4239–4244
56. Nematollahi D., Tammari E., Sharifi S., Kazemib M, Mechanistic study of the oxidation of catechol in the presence of secondary amines by digital simulation of cyclic voltammograms. *Electrochimica Acta*, **2004**, 49, 591–595
57. Bard A.J., *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements: Organic Section*. Vol XII, Marcel Dekker, EUA, **1978**. pp. 198-202
58. Uchimiya M, Stone A.T., Redox reactions between iron and quinones: Thermodynamic constraints. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2006**, 70, 1388
59. Dixon T. William, Murphy David, Determination of the Acidity Constants of some Phenol Radical Cations by means of Electron Spin Resonance. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans*, **1976**, 72, 1221-1229
60. Napolitano Alessandra, Crescenzi Orlando, Pezzella Alessandro, Prota Giuseppe, Generation of the Neurotoxin 6-Hydroxydopamine by Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Oxidation of Dopamine. *Journal of Medicine Chemistry*, **1995**, 38, 917-922
61. Tse D.C.S., McCreery R.L., Adams, R.N., Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *Journal of Medicine Chemistry*, **1976**, 19, 37-40
62. Santiago L.D., Bautista M.J.A., Reyes H.C.I., Aguilar M.M., Rivas A., Effects of oxidative stress on dopamine oxidates metabolites and progressive damage in substantia nigra in rats exposed chronically to ozone. En proceso de revisión para su publicación.
64. A. I. Scott. *Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products*, 3a ed, Inglaterra, **1975**.
65. Hamilton R.J.; Kalu C., Prisk E., Padley F.B., Pierce H., Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*, **1997**, 60, 193-199
66. Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **1982**, 47, 412–426
67. Sohal R.S. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clinical Experimental Research*. **1993**, 5,3-17
-

- 
68. Medveded Z. An attempt at a rational classification of the theories of aging. *Biological Reviews*, **1990**, 65, 357-398
69. Rodríguez C. Karina, Céspedes M. Ela. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, **1999**, 18, 67-76
70. Kopáni Martin, Celec Peter, Danišovič Luboš, Michalka Peter, Biró Csaba, Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*, **2006**, 364, 61-66
71. Voet D. *Bioquímica*. Editorial Omega, España, **1992**.
72. Halliwell B, Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3a ed., Oxford University Press, Londres **1999**, Capítulo 2: The chemistry of free radicals and related reactive species, pp 36
73. Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *Journal of Biological Chemistry*, **1989**, 264, 9880-9884.
74. Thannickal Victor J., Fanburg Barry, Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal Physiological Lung Cellular and Molecular Physiology*, **2000**, 279, L1005-L1028
75. Nordberg Jonas, J. Arnér Elias S., Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and Mammalian Thioredoxin Systems. *Free Radical Biology and Medicine*, **2001**, 31, 1287-1312.
76. Knak Jensen Svend J., Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Tetrahedron)*, **2003**, 387-392
77. Rhee S. G., Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental and Molecular Medicine*, **1999**, 31, 53-59.
78. Mariani E., Polidori M.C., Cherubini A., Mecocci P., Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B*, **2005**, 827, 65-75
79. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, **1993**, 262, 689-695
-

- 
80. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry*, **1984**, 219, 1-14.
81. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3a ed., Oxford University Press, Londres **1999**, Capítulo 4: Oxidative stress, adaptation, damage, repair and death, pp. 246
82. Lud C.,J., Brannock C., Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems, *Neurochemistry*, **1998**, 32, 117-131
83. Kedar N.P., Can We Prevent Parkinson's and Alzheimer's Disease?. *Journal of Postgraduate Medicine*, **2003**, 49, 236.
84. Ogawa N., Asanuma M., Miyazaki I., Diaz C.F., Mioyoshi K., L-Dopa treatment from the viewpoint of neuroprotection: Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, **2005**, 252, IV/23-VI/31
85. Mackay A.V., Yates C.M., Wright A., Hamilton P., Davies P., Regional distribution of monoamines and their metabolites in the human brain. *Journal of Neurochemistry*, **1978**, 30, 841-848.
86. McGeer P.L., McGeer E.G., Suzuki J.S., Aging and extrapyramidal function, *Neurology*, **1977**, 34, 33
87. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Birmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F., Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of Neurology Sciences*, **1973**, 20, 415
88. Graumann R., Paris I., Martínez A.P., Rumanque P., Pérez P.C., Cardenas S.P., Marin P., Díaz G.F., Cavides R., Cavides P., Segura A.J., Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. *Polish Journal of Pharmacology*, **2002**, 54, 573-579
89. Youdim M.B.H., Iron in the brain: implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Mount Sinai Journal of Medicine*, **1988**, 55, 97-101
90. Halliwell B., Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, **1992**, 59, 1609-1623.
-



- 
91. a) Reiderer P., Sofic E., Rausch W.D., Schmidt B., Reynolds G.P., Jellinger K., Youdim M.B.H. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in Parkinsonian brains. *Journal of Neurochemistry*, **1989**, 52, 515–520; b) Spencer J.P.E, Jenner P., Halliwell B. Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease. *Neuro Report*, **1995**, 6, 1480–1484.
92. Méndez Á.E., Soto O.R., Dopamine: A double-edged sword for the human brain. *Recent Research Developments in Life Science*, **2004**, 2, 217-246
93. a) Bindoff L.A., Birch M.M., Carlidge N.E.F., Parker J.R., Turnbull D.M., Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet*, **1989**, ii: 49; b) Mizuno Y, Ohata S, Tanaka M., Takamiya S., Suzuki K., Sato T., Oya H., Ozawa T., Kagawa Y., Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemistry Biophysics Res Commun*, **1989**, 163, 1450-1455; c) Schapira A.H., Cooper J.M., Dexter D., Clark J.B., Jenner P., Marsden C.D., Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, **1990**, 54, 823-827
94. Kostrzewa R.M., Kostrzewa J.P., Brus R., Neuroprotective and neurotoxic roles of levodopa (L-DOPA) in neurodegenerative disorders relating to Parkinson's Disease. *Amino Acids*, **2002**, 23, 57-63
95. Rao, C.N.R. *Ultraviolet and visible spectroscopy: Chemical Applications*. 3a ed., Butterworths, EUA, **1964**. 49, 61-90
96. Graham D.G. Oxidative Pathways for Catecholamines in the Genesis of Neuromelanin and Cytotoxic Quinones. *Molecular Pharmacology*, **1978**, 14, 633-643