



Universidad Autónoma Metropolitana

*Unidad Iztapalapa*

**“Desarrollo de Métodos de Cuantificación de Dopamina (DA),  
Azometina-H (Az-H) y Ácido Ascórbico (AA) basados en  
Sistemas Supramoleculares DA/AA/Az-H con  $\beta$ -Ciclodextrina  
( $\beta$ -CD) y Dodecil sulfato de sodio (SDS)”**

TESIS QUE PRESENTA:

**Q. GEORGINA ALARCÓN ÁNGELES**

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS (QUÍMICA)**

**ASESORES:**

**DRA. MARÍA TERESA RAMÍREZ SILVA  
DR. ARBEN MERKOÇI HYKA**

AREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA.

**Julio 2008**



## **Agradecimientos.**

*Agradezco de manera especial a los Sinodales:*

Dr. Mario Alberto Romero Romo

Dr. Alberto Rojas Hernández

Dr. Nikola Batina

Dr. Arben Merkoçi Hyka

Dr. Carlos Galán Vidal

*Por el tiempo dedicado a la revisión de esta Tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.*

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado a través del proyecto 82932 a MTRS, la beca mixta y de doctorado 184930 para GAA .**

A mi asesora Maria Teresa Ramírez Silva, por su dedicación a este proyecto,  
por todas las enseñanzas de la ciencia y de la vida, su confianza y amistad  
mi admiración y gratitud.

A mi asesor Arben Merkoçi por su valioso tiempo y dedicación,  
por enseñarme  
otra parte de la ciencia y de la vida, mi respeto y gratitud.

Mi gratitud al Dr. Manuel Palomar Pardavé, a la Dra. Giselle Rosquete Pina por sus aportaciones para enriquecer esta Tesis y a la Dra. Laura Galicia por todas sus enseñanzas, al Dr Rubén Arroyo por todo el conocimiento transmitido, Dra Silvia Corona Avendaño por todos sus conocimientos apoyo para hacer posible esta Tesis.

Agradezco al Área de Química Analítica del Departamento de Química de la UAM-I por permitir la realización de mi doctorado y al grupo de Ingeniería de Materiales del Departamento de Materiales de la UAM Azcapotzalco por prestarme sus instalaciones para la realización de parte de mi trabajo experimental.

El Grup de Sensors i Biosensors Departament de Química y al Institut Català de Nanotecnologia (ICN) de la Universitat Autònoma de Barcelona, por permitirme realizar mi estancia de investigación

Al Proyecto: ALFA II BioSenIntg  
Clave: II-0486-FCFA-FCD-FI,  
por el apoyo financiero

A todos los que conforman y conformaron el Área de Química Analítica, de la UAM-I: Angel Cobos, Arturo Giaan, Bere, Dafne, Damaris , David, Gaby Roa, Gaby Valdés, Isis, Karla, Mago, Manuel, Pastora, Landy Paty Diagramas, Pedro, Ruslán, Silvia y Vicky por los momentos compartidos.

El Grup de Sensors i Biosensors Departament de Química y al Institut Català de Nanotecnologia (ICN) de la Universitat Autònoma de Barcelona: Adriano, Alfredo, Ana, Briza, Marisa, Sandra, Sergy, Tere, por su ayuda y amistad gracias.

Agradezco a mis padres:  
Macario Alarcón Cárdenas y Paula Ángeles Pérez,  
por darme la vida, el amor,  
la confianza y el apoyo incondicional.

A las mejores amigas que Dios me regalo:  
Fany, Estela, Luz Ma y Pily.

A los amigos perdidos y ganados en este camino,  
especialmente a Silvita por su gran ayuda y amistad,  
a ti José por brindarme tu amistad incondicional,  
y llenar mis días de alegría.  
A Cynthia y a Tina por la compañía,  
Y por su amistad sincera.

A Carlos Palomar, por tener siempre un  
comentario para hacerme reír.

A Fernando Sánchez por llenar mi vida de luz y esperanza.  
A la vida y a Dios por permitirme llegar a este día.





---

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Índice</b>	<i>vii</i>
<b>Índice Figuras</b>	<i>xvii</i>
<b>Índice Tablas</b>	<i>xxxi</i>
<b>Índice Esquemas</b>	<i>xxxv</i>
<b>Índice de Abreviaturas</b>	<i>xxxvii</i>
<b>Resumen</b>	<i>xliii</i>
<b>Abstract</b>	<i>xlvi</i>
<b>Capítulo 1: Introducción General</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2: Hipótesis y Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 3. Estabilidad de la dopamina y determinación de sus constantes de acidez</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Introducción</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Determinación de las constantes de acidez de la DA por titulación espectroscópica.</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Estudio de la estabilidad de la DA</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Estudio de la estabilidad de la DA a pH 3.0</b>	<b>20</b>
<b>3.4.1. Sistema expuesto a la luz</b>	<b>20</b>
<b>3.4.2. Sistema no expuesto a la luz</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Estudio de estabilidad de la DA a pH 9.0</b>	<b>22</b>

---

<b>3.5.1. Sistema expuesto a la luz</b>	<b>22</b>
<b>3.5.2. Sistema no expuesto a la luz</b>	<b>22</b>
<b>3.6 Estudio de estabilidad de la DA a pH 12.0</b>	<b>24</b>
<b>3.6.1. Sistema expuesto a la luz</b>	<b>24</b>
<b>3.6.2. Sistema no expuesto a la luz</b>	<b>25</b>
<b>3.7. Determinación de las constantes de acidez     de la DA por análisis punto por punto</b>	<b>26</b>
<b>3.8. Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>Capítulo 4. Mecanismo de desprotonación de la DA</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Introducción.</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Método Teórico</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Método Experimental</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Estudio Teórico de la DA</b>	<b>37</b>
<b>4.4.1 Confórmeros de la DA N-protonada</b>	<b>37</b>
<b>4.4.2 Estudio teórico del orden de desprotonación         de la DA N-protonada</b>	<b>40</b>
<b>4.4.3 Afinidad protónica (AP) y estabilidad relativa         de isómeros</b>	<b>41</b>
<b>4.4.4 Carga Atómica de Mulliken y distancias de         enlace interatómicas</b>	<b>43</b>
<b>4.4.5 Densidad de superficie del orbital molecular         desocupado más bajo LUMO</b>	<b>45</b>

---

<b>4.5 Estudio Experimental RMN</b>	<b>47</b>
<b>4.6. Conclusiones</b>	<b>50</b>
<b>Capítulo 5. Efecto del SDS en el comportamiento electroquímico de la DA</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Introducción</b>	<b>51</b>
<b>5.2. Método Experimental</b>	<b>52</b>
<b>5.2.1. Reactivos</b>	<b>52</b>
<b>5.2.2. Instrumentación</b>	<b>52</b>
<b>5.2.3. Procedimiento</b>	<b>53</b>
<b>5.3. Resultados y discusión.</b>	<b>54</b>
<b>5.3.1. Procesos de oxidación y reducción de DA en ausencia de SDS.</b>	<b>54</b>
<b>5.3.2. Proceso de oxidación y reducción de DA en presencia de SDS.</b>	<b>61</b>
<b>5.3.2.1 Electroactividad del SDS</b>	<b>62</b>
<b>5.3.2.2 Efecto del [SDS] sobre el comportamiento voltamperométrico de DA</b>	<b>64</b>
<b>5.3.2.3 Estudio cromatográfico.</b>	<b>70</b>
<b>5.4 Conclusiones</b>	<b>71</b>

---

<b>Capítulo 6. Determinación electroquímica de la DA usando SDS</b>	<b>73</b>
<b>6.1 Introducción</b>	<b>73</b>
<b>6.2. Método Experimental</b>	<b>75</b>
<b>6.2.1. Metodología</b>	<b>75</b>
<b>6.2.2. Instrumentación</b>	<b>75</b>
<b>6.2.3. Procedimiento</b>	<b>75</b>
<b>6.3 Caracterización Electroquímica de la DA y AA usando EPC</b>	<b>76</b>
<b>6.3.1. Sin SDS en solución</b>	<b>76</b>
<b>6.3.2. Influencia del pH</b>	<b>77</b>
<b>6.3.3. Con SDS en solución</b>	<b>78</b>
<b>6.4. Determinación de DA en un producto farmacéutico</b>	<b>81</b>
<b>6.5 Conclusiones</b>	<b>82</b>
<b>Capítulo 7. Estudio electroquímico de la DA sobre un electrodo de carbón vítreo (ECV)</b>	<b>83</b>
<b>7.1 Introducción</b>	<b>83</b>
<b>7.2. Estudio electroquímico DA en electrodo de ECV</b>	<b>84</b>
<b>7.2.1. Comportamiento Voltamperométrico, pH 7.4 y 3.4</b>	<b>84</b>
<b>7.2.2 Cuantificación amperométrica de DA con ECV</b>	<b>88</b>
<b>7.2.3. Estudio de la interferencia DA con AA</b>	<b>89</b>
<b>7.3 Electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT/<math>\beta</math>-CD.</b>	<b>91</b>

---

---

7.3.1. Caracterización de los materiales por SEM	91
7.3.2 Estudio de voltamperometría cíclica de los electrodos modificados con nanotubos de carbón	93
7.3.3 Cuantificación amperométrica de DA con ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD	96
7.3.4. Interferencia de DA con AA utilizando el ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD	98
7.4. Conclusiones.	99
<b>Capítulo 8. Caracterización de EPC modificados con <math>\beta</math>-CD y MWCNT</b>	<b>101</b>
8.1 Introducción	101
8.2. Método experimental	102
8.2.1. Reactivos.	102
8.2.2 Instrumentación.	103
8.2.3 Fabricación de los electrodos de trabajo.	103
8.2.3.1 EPC modificado con MWCNT	103
8.2.3.2 EPC modificado con poly- $\beta$ -CD.	104
8.2.3.3 EPC modificado con MWCNT y $\beta$ -CD	104
8.2.3.4 EPC modificado con MWCNT, $\beta$ -CD y poly- $\beta$ -CD	104
8.3. Resultados y discusión	104

---

<b>8.3.1 Comportamiento electroquímico de la DA y AA sobre el EPC</b>	<b>104</b>
<b>8.3.1.1 Estudio de DA por VC</b>	<b>104</b>
<b>8.3.1.2. Estudio de DA por VDP</b>	<b>106</b>
<b>8.3.1.3 Estudio AA por VC</b>	<b>107</b>
<b>8.3.1.4. Estudio de AA por VPD</b>	<b>107</b>
<b>8.3.1.5. Determinación de la DA en presencia de AA.</b>	<b>108</b>
<b>8.3.2 Comportamiento electroquímico de la DA y AA sobre EPC /MWCNT</b>	<b>110</b>
<b>8.3.2.1 Estudio de DA por VC.</b>	<b>110</b>
<b>8.3.2.2 Estudio de DA en presencia de AA por VPD</b>	<b>111</b>
<b>8.3.3 Comportamiento electroquímico de DA y AA sobre un EPC /poly-β-CD</b>	<b>112</b>
<b>8.3.3.1 Estudio de DA usando VC.</b>	<b>112</b>
<b>8.3.3.2 Estudio de DA por VDP</b>	<b>115</b>
<b>8.3.3.3 Estudio de AA por VDP</b>	<b>116</b>
<b>8.3.3.4 Oxidación de DA en presencia de AA</b>	<b>117</b>
<b>8.3.3.4.1. Determinación de DA</b>	<b>119</b>
<b>8.3.4 Comportamiento electroquímico de DA y AA sobre un EPC/MWCNT/β-CD</b>	<b>120</b>

---

8.3.4.1 Estudio de DA por VC	120
8.3.4.2. Estudio de DA por VDP	121
8.3.4.3. Estudio de AA por VC	122
8.3.4.4. Estudio de AA por VDP	123
8.3.4.5 Estudio de DA en presencia de AA	124
8.3.5 Comportamiento electroquímico de DA y AA sobre un EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD	126
8.3.5.1 Modificación del electrodo EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD	126
8.3.5.2 Comportamiento electroquímico de DA utilizando un EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD	127
8.3.5.3 Estudio de la DA utilizando un EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD	128
8.3.5.4 Estudio VDP de la DA con AA utilizando un EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD	129
8.3.6 Determinación y recobro de DA en fármacos	131
8.3.7. Conclusiones	132
<b>Capítulo 9. Interacción de DA y AA con <math>\beta</math>-CD</b>	<b>135</b>
9.1. Introducción	135
9.2. Método Experimental	136

---

<b>9.3 Determinación de las constantes de acidez del AA</b>	<b>137</b>
<b>9.4 Determinación de la constante de inclusión de AA-<math>\beta</math>-CD</b>	<b>138</b>
<b>9.4.1. Determinación espectrofotométrica UV/Vis</b>	<b>138</b>
<b>9.4.2 Determinación por VC</b>	<b>141</b>
<b>9.5 Determinación de la constante de inclusión DA-<math>\beta</math>-CD</b>	<b>143</b>
<b>9.6 Conclusiones.</b>	<b>145</b>

<b>Capítulo 10.DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ DE Az-H MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS</b>	<b>147</b>
<b>10.1 Introducción</b>	<b>147</b>
<b>10.2. Estudio de estabilidad de Az-H</b>	<b>148</b>
<b>10.2.1. Estudio de estabilidad de la Az-H a pH 1.5</b>	<b>149</b>
<b>10.2.2 Estudio de estabilidad de la Az-H a pH 11.5</b>	<b>152</b>
<b>10.2.3 Titulación ácido base</b>	<b>155</b>
<b>10.3 Estudio de estabilidad de Az-H en medio amortiguado</b>	<b>157</b>
<b>10.3.1 Estudio de estabilidad de la Az-H</b>	
<b>a pH 1.5 en medio amortiguado</b>	<b>160</b>
<b>10.3.2 Estudio de estabilidad de la Az-H</b>	
<b>a pH 11.5 básico en medio amortiguado</b>	<b>161</b>
<b>10.3.3 Titulación de Az-H en medio amortiguado</b>	<b>162</b>
<b>10.3.4 Cálculo de Constantes de Acidez de</b>	



---

<b>Az-H en medio amortiguado</b>	<b>164</b>
<b>10.4 Análisis punto por punto</b>	<b>165</b>
<b>10.4.1 Cálculo de Constantes de Acidez de Azo-H</b>	<b>167</b>
<b>10.5 Conclusiones</b>	<b>171</b>
 <b>Capítulo 11. Uso de MWCNT para el estudio de</b>	
<b>Az-H por VC</b>	<b>175</b>
<b>11.1. Introducción</b>	<b>175</b>
<b>11.2. Método Experimental</b>	<b>176</b>
<b>11.2.1 Reactivos y Equipo</b>	<b>176</b>
<b>11.2.3. Preparación de la película MWCNT/<math>\beta</math>-CD</b>	<b>176</b>
<b>11.3. Resultados y discusión</b>	<b>177</b>
<b>11.3.1 Perfil de la membrana de MWCNT/<math>\beta</math>-CD en acetato de amonio (pH 7).</b>	<b>177</b>
<b>11.3.2 Comportamiento de Az-H por VC</b>	<b>177</b>
<b>11.3.3 Comparación de la respuesta electroquímica de Az-H con el electrodo de pasta sin modificar y modificado con MWCNT/<math>\beta</math>-CD</b>	<b>178</b>
<b>11.4. Conclusiones</b>	<b>181</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>183</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>187</b>

---

---

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>189</b>
<b>APENDICE A</b>	<b>201</b>
<b>APENDICE B</b>	<b>205</b>
<b>APENDICE C</b>	<b>209</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Figura 1.1.</b> Estructura molecular de dopamina	6
<b>Figura 1.2.</b> Mecanismo de reacción propuesto por Palumbo y col. [1.27]	7
<b>Figura 1.3.</b> Mecanismo de reacción propuesto por Doménech, García [1.28]	7
<b>Figura 1.4.</b> Estructura molecular del ácido ascórbico	9
<b>Figura 1.5.</b> Síntesis de la Azometina-H	10
 <b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Figura 3.1.</b> Espectros de absorción , a diferentes valores de pH en medio de fosfatos a partir de una titulación espectrofotométrica a) DA $1.25 \times 10^{-4}$ M titulación al equilibrio b) DA $2.8 \times 10^{-4}$ M controlando el tiempo de muestreo	17
<b>Figura 3.2.</b> Comportamiento espectrofotométrico de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M, solución expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 3.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.	20
<b>Figura 3.3.</b> Comportamiento espectrofotométrico de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M, solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 3.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno	21
<b>Figura 3.4.</b> Comportamiento espectrofotométrico de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M solución expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 9.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.	22
<b>Figura 3.5.</b> Comportamiento espectrofotométrico de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M, solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 9.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.	23
<b>Figura 3.6.</b> Comportamiento espectrofotométrico de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 12.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.	24
<b>Figura 3.7.</b> Comportamiento espectrofotométrico de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 12.0 a) sistema con	

oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.	25
<b>Figura 3.8.</b> Espectros de absorción de una solución de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M, a diferentes valores de pH, en medio de fosfatos, usando el método de análisis punto por punto	27
<b>Figura 3.9.</b> Simulación de los espectros experimentales a partir de las constantes de acidez calculadas, para diferentes valores de pH.	29
<b>Figura 3.10.</b> Diagrama de distribución de especies de DA en función del Ph	29
 <b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Figura 4.1</b> DZP de las especies de DA construido a partir de los valores de pKa obtenidos a partir del análisis punto por punto.	32
<b>Figura 4.2.</b> Representación esquemática y asignación de números a los átomos de la molécula de $H_3DA^+$ . Ángulos diedros $\phi_1$ y $\phi_2$ .	32
<b>Figura 4.3.</b> DFT (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) geometrías optimizadas obtenidas a partir del rotámero más estable de la DA ángulos diedros $\phi_1$ y $\phi_2$ .	38
<b>Figura 4.4.</b> Geometría mínima energía (B3LYP/6-311+G(d,p)/ PCM) de la DA N-protonada ( <i>anti</i> ).	40
<b>Figura 4.5.</b> Especies involucradas durante la desprotonación de la dopamina N-protonada ( $H_3DA^+$ ).	40
<b>Figura 4.6.</b> Densidad de superficie del LUMO (AM1) para la $H_3DA^+$ (a), $H_2DA-I$ (b) y $HDA^-I$ (c). Valor de Isodensidad 0.05 a.u.	45
<b>Figura 4.7.</b> Especies de DA involucradas en la desprotonación. Se muestran las estructuras moleculares con la geometría de mínima energía.	46
<b>Figura 4.8.</b> Espectro RMN $^{13}C$ de dopamina en $D_2O$ a pH 5.1.	47
<b>Figura 4.9.</b> Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a las especies $H_3DA^+$ : (◆) teórico (TMS-B3LYP/6-311+G(d,p) - GIAO) (●) experimentales.	49
<b>Figura 4.10.</b> Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos de las diferentes especies de $H_2DA$ , experimental (○) y teóricos TMS-B3LYP/6-311+G(d,p) -GIAO) (* $H_2DA-I$ , (□) $H_2DA-II$ y (▲) $H_2DA-III$	49

## CAPÍTULO 5

- Figura 5.1.** Voltamperogramas cíclicos CPE /NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10) para dos diferentes concentraciones de DA: 0 (—) y  $2.5 \times 10^{-4}$  M (---). En ambos casos el barrido de potencial se inició en el potencial de corriente nula en sentido positivo a velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . 55
- Figura 5.2.** Familia de VCs en el sistema EPC / NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M a diferentes valores de velocidad de barrido. 57
- Figura 5.3.** Variación del corriente de pico anódico,  $i_{pa}$ , en función de (a)  $v^{1/2}$  y (b)  $v$  en el sistema EPC / NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M. los círculos corresponde a los datos experimentales, mientras que la línea al ajuste 58
- Figura 5.4.** Relación entre el potencial del pico  $E_p$ , anódico (○) y catódico (●), y la velocidad de barrido  $\ln v$ , obtenidos de los VCs en la figura 5.2. Las líneas son el resultado del ajuste lineal. 59
- Figura 5.5.** Variación experimental de las corrientes de pico en función de variación  $E_p - E^0$  (puntos) para cada proceso anódico (a) y catódico (b). Las líneas corresponden al ajuste lineal de los datos experimentales  
(a)  $\ln i_{pa} = 18.12(E_{pa} - E^0) - 14.66$  y (b)  $\ln i_{pc} = 18.97(E_{pc} - E^0) - 15.6$ . 61
- Figura 5.6.** Variación de la tensión interfacial (○) con el logaritmo de la concentración del surfactante en el sistema Hg / NaCl<sub>(aq)</sub> 0.1 M, SDS<sub>(aq)</sub>  $x$  M. 62
- Figura 5.7.** VC del sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10) con diferentes concentraciones de SDS (a) 0.075, (b) 0.5 y (c) 5 mM a velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . 63
- Figura 5.8.** VC en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, para diferentes concentraciones de DA: 0 (—) y  $2.5 \times 10^{-4}$  M (—). En ambos casos la velocidad de barrido fue de  $40 \text{ mV s}^{-1}$ . 63
- Figura 5.9.** VC in el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M con diferentes concentraciones de SDS indicadas en la figura en mM en todos los caos la velocidad de barrido fue  $40 \text{ mV s}^{-1}$ . 64
- Figura 5.10.** VC experimentales en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M, registrados a diferentes velocidades de barrido. 65
- Figura 5.11.** Variación de  $i_{pa}$  como función de  $v$  en el sistema  $2.5 \times 10^{-4}$  M DA con

- SDS 5 mM. Los triángulos corresponden a los datos experimentales mientras que la línea punteada corresponde al ajuste lineal. 66
- Figura 5.12.** Comparación experimental de CV (○) obtenidos en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M a velocidad de barrido de  $40 \text{ mV s}^{-1}$ , ver figura 5.10, VC teórico (línea discontinua) generados mediante el ajuste no lineal ecuación (5.15). El inserto muestra la comparación de comportamiento anódico de los VC a diferentes velocidades de barrido, los mejores parámetros obtenidos del ajuste se reportan en la tabla 5.4. 70
- Figura 5.13.** Cromatogramas experimentales obtenidos de una solución de DA  $1 \times 10^{-4}$  M con diferentes [SDS] después de aplicar diferentes potenciales de oxidación, dependiendo de la concentración de SDS para producir la misma densidad de corriente para cada solución, durante 5 min usando diferentes detectores (a) espectrofotométrico, a longitud de onda constante ( $\lambda = 480 \text{ nm}$ ) y (b) Electroquímico a potencial constante ( $E = 315 \text{ mV}$ ). 71
- CAPÍTULO 6**
- Figura 6.1** DPV obtenidos con los sistemas (°) EPC/ NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM (pH 3.0) y (—) EPC/NaCl 0.1 M, AA 0.28mM (pH 3.0) 76
- Figura 6.2.** Comparación de DPV obtenidos con el sistema EPC/NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM y AA 0.28 mM, at pH 3 (—) con el DPV (o) obtenido de la suma de las señales de las especies individuales correspondiente a figura 6.1. 76
- Figura. 6.3.** DPV obtenidos del sistema (a) EPC/NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM y (b) EPC/ NaCl 0.1M, AA 0.10 mM a diferentes pH. Velocidad de barrido  $50 \text{ mVs}^{-1}$ . Curva de la corriente de pico de DA (a) de AA (b) vs. pH. 77
- Figura 6.4.** Comparación de DPV obtenidos con el sistema EPC/ NaCl 0.1M, SDS 3 mM a pH 3 con diferentes especies electroactivas (o) DA 0.10 mM y (—)AA 0.28mM. Velocidad de barrido  $20 \text{ mVs}^{-1}$ . 79
- Figura 6.5.** Comparación de DPV obtenidos con el sistema EPC/NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM y AA 0.28 mM y 3 mM SDS at pH 3.0 (—), DPV (o) obtenido de la suma de las señales de las especies individuales correspondiente a figura 6.4. la línea marcada con S es la señal del

surfactante solo.	80
<b>Figura 6.6.</b> (a) DPV obtenidos con el sistema EPC/NaCl 0.1 M, AA 0.8 mM, SDS 3 mM, con diferentes [DA]: (0) 0 mM, (1) 0.02 mM, (2) 0.03 mM, (3) 0.05 mM, (4) 0.07 mM, (5) 0.1 mM, (6) 0.12 mM, (7) 0.16 mM, (8) 0.2mM y (9) 0.24 mM. A velocidad de barrido de 50mVs <sup>-1</sup> .	80
<b>Figura 6.7</b> Variación de $i_{DA}$ en función de la [DA] obtenida de los DPV correspondientes a la figura 6.7	81
 <b>CAPÍTULO 7</b>	
<b>Figura 7.1.</b> Voltamperogramas cíclicos de 0.2 mM de DA en 0.01 M solución amortiguadora de fosfatos a) pH=3.4 y b) 7.4, ECV, pretratamiento con 10 barridos sobre el blanco y adicionando DA	85
<b>Figura 7.2.</b> Diagrama de Pourbaix para la especie de H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup>	86
<b>Figura 7.3.</b> Voltamperogramas cíclicos típicos de DA 0.1 mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a) pH 3.4 y b) 7.4 a diferentes velocidades de barrido: 0: a=0.01,b=0.02,c=0.04, d=0.06,e= 0.08, y f=0.1V, Electrodo de trabajo: ECV. Los gráficos en los recuadros muestran la relación funcional de la corriente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.	87
<b>Figura 7.4.</b> Voltamperogramas hidrodinámicos de 0.1 mM de DA con ECV a) pH = 3.4 y b) pH=7.4 en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mM.	88
<b>Figura 7.5.</b> Curva de Calibración obtenida por amperometría con ECV a) pH = 3.4 el potencial aplicado 0.5 V y b) pH = 7 con potencial aplicado de 0.3 V para adiciones sucesivas de 0.01 mM DA, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M.	89
<b>Figura 7.6.</b> Voltamperogramas cíclicos de DA (1x10 <sup>-4</sup> M), AA (8x10 <sup>-4</sup> M), Mezcla de DA+AA a concentración de 1x10 <sup>-4</sup> M (M/M = 1/8) en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH = 7.4 usando un electrodo: ECV	90
<b>Figura 7.7.</b> Esquema de la preparación del electrodo modificado con MWCNT/β-CD.	91
<b>Figura. 7.8.</b> Imágenes SEM de A) MWCNT, B) β-CD y C) MWCNT/β-CD.	92
<b>Figura 7.9.</b> Esquema del electrodo modificado con MWCNT/□□CD, y reacción de	

oxidación de la DA.	93
<b>Figura 7.10.</b> Voltamperometría cíclica de 0.1 mM de DA a) pH 3.4 y b) pH 7.4 en solución amortiguadora fosfatos 0.01 M, velocidad de barrido 0.1 Vs <sup>-1</sup> . Electrodo de trabajo: ECV/MWNT/β-CD.	93
<b>Figura 7.11.</b> Voltamperogramas cíclicos de DA 0.1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a) pH 3.4 y b) 7.4 a diferentes velocidades de barrido: a=0.01,b=0.02,c=0.04, d=0.06,e= 0.08, y f=0.1 V,.Electrodo de trabajo: ECV/MWCNT/β-CD.	95
<b>Figura 7.12.</b> Voltamperogramas hidrodinámicos de 0.1 mM de DA con ECV MWCNT/□-CD a) pH 3.4 y b) pH 7.4 en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mM.	96
<b>Figura 7.13.</b> Curva de Calibración obtenida por amperometría con ECV/MWCNT/β-CD a) pH 3.4 el potencial aplicado 0.5 V y b) pH 7 con potencial aplicado de 0.3 V para adiciones sucesivas de 0.01 mM DA, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M	97
<b>Figura 7.14.</b> a) Voltamperogramas cíclicos de AA (8x10 <sup>-4</sup> M) con diferentes concentraciones de DA en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH 7.4 usando un electrodo: ECV/MWCNT /β-CD, b) Curva de calibración para el <i>i</i> <sub>PDA</sub> de los VC del inciso a.	98

## CAPÍTULO 8

<b>Figura 8.1</b> VCs típicos obtenidos de un sistema EPC/ DA0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 a velocidad de barrido de 100 mV s <sup>-1</sup> . b) influencia de la velocidad de barrido (a) 20 (b) 40 (c) 60 (d)100 (e) 400 (f) 600 (g) 800 (h) 1000 mV s <sup>-1</sup> . El inserto muestra la variación de la densidad corriente, <i>j</i> <sub>ap</sub> , como función de <i>v</i> <sup>1/2</sup> , los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea, $j_{ap}(\text{Am}^{-2}) = (0.028 \pm 0.002) \text{Am}^{-2}\text{mV}^{1/2}\text{s}^{-1/2} v^{1/2} + (0.021 \pm 0.003) \text{Am}^{-2}$ , es el resultado del ajuste lineal.	105
<b>Figura 8.2.</b> a) Curvas de voltamperometría diferencial de pulso (VDP) obtenido del sistema EPC/ DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 con diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.01 (c) 0.02 (d) 0.03 (e) 0.04 (f) 0.05 (g) 0.06 (h) 0.07 (i) 0.08 (j) 0.09 (k) 0.10	



- mM. b) Variación de  $j_{ap}$ , los VDPs. Como función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal 106
- Figura 8.3** VCs obtenidos de un sistema EPC/ AA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 a diferentes velocidades de barrido (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 80 (g) 100  $mV s^{-1}$ . El inserto muestra la variación de la densidad corriente,  $j_{ap}$ , como función de  $v^{1/2}$ , los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea,  $j_{ap} (Am^{-2}) = (0.288 \pm 0.003) Am^{-2} mV^{-1/2} s^{-1/2} v^{1/2} + (0.13 \pm 0.02) Am^{-2}$ , es el resultado del ajuste lineal 107
- Figura 8.4** a) Curvas VDPs obtenido del sistema EPC/ 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 con diferentes [AA]: (a) 0, (b) 0.02 (c) 0.04 (d) 0.06 (e) 0.08 (f) 0.10 (g) 0.12 (h) 0.14 (i) 0.16 (j) 0.10 mM. b) Variación de  $j_{ap}$ , los VDPs como función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal 108
- Figura 8.5.** a) Curvas experimentales por VDP obtenidas en el sistema EPC/ NaCl 0.1 mM, AA 0.1 M, a pH 3.0 a diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.03 (c) 0.12 (d) 0.20 (e) 0.30 (f) 0.40 (g) 0.50 mM, a velocidad de barrido de 20  $mVs^{-1}$ . b) VDP sin la contribución de AA. El inserto muestra la variación de  $j_{ap}$  como una función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal 109
- Figura 8.6.** CVs obtenidos en el sistema EPC/MWCNT/ NaCl 0.1 M (pH 3.0) con diferente [DA], línea punteada 0 y línea continua 0.1 mM. La velocidad de barrido fue de 100  $mVs^{-1}$  110
- Figura 8.7.** a) Comparación de los VCs en el sistema EPC/MWCNT/ DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0) con diferentes [AA]: (●) 0 y (-) 1 mM. La velocidad de barrido fue de 100  $mVs^{-1}$ . b) El correspondiente VDP de los sistemas (a); obtenidos a velocidad de barrido de 20  $mVs^{-1}$  111
- Figura 8.8** a) CVs obtenidas en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0, a diferentes velocidades de barrido de potencial:

- (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 60  $\text{mVs}^{-1}$ . b) variación de la densidad de corriente de pico ( $j_p$ ), en función de  $\nu$ , los círculos corresponden a los datos experimentales (○) para el pico anódico y (●) para el pico catódico. Las líneas son el resultado de del ajuste lineal 113
- Figura 8.9.** a). presenta una comparación entre los datos experimentales en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 a velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  su correspondiente VC teórico generado a partir de un ajuste no lineal con la ecuación 5.15 del capítulo 5, b)ajustes de VC a diferentes velocidades 114
- Figura 8.10.** a) Curvas VDPs obtenidas del sistema EPC/poly-- $\beta$ -CD/NaCl 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 con diferentes [DA]: (a) 0.01, (b) 0.02 (c) 0.03 (d) 0.04 (e) 0.05 (f) 0.06 (g) 0.07 (h) 0.08 (i) 0.09 (j) 0.10 mM b) Variación de  $j_{ap}$ , como función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal 116
- Figura 8.11** a) VCs obtenidas en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/AA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0, a diferentes velocidades de: (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 60 (g) 80 (h) 90 (i)  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . b) variación de la densidad de corriente de pico ( $j_p$ ), en función de  $\nu$ , los círculos corresponde a los datos experimentales (○) para el pico anódico y (●) para el pico catódico. Las líneas son el resultado de del ajuste lineal 117
- Figura 8.12.** VDP en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ NaCl 0.1 M, AA 1.8 mM, DA 0.03 mM a pH 3.0, velocidad de barrida de  $50 \text{ mVs}^{-1}$  y amplitud 0.5 118
- Figura 8.13.** a) Gráfico de los primeros 20 ciclos consecutivos de VCs obtenidos durante la polimerización de  $\beta$ -CD sobre la superficie de EPC a partir de una solución de 0.01 M  $\beta$ -CD en  $\text{HClO}_4$  1 M. b) la respuesta electroquímica de la membrana obtenida con diferente número de ciclos voltamperométricos: (a) 10, (b) 20 y (c) 30, sumergida en una solución acuosa de  $\text{HClO}_4$  1 M. En todos los casos la velocidad de barrido de potencial aplicada fue de  $100 \text{ mVs}^{-1}$  118
- Figura 8.14.** a) Familia de VDPs del sistema EPC/poly- $\beta$ -CD (después de aplicar

10 ciclos voltamperométricos) / AA 1 mM, NaCl 0.1M (pH = 3.0) con diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.02, (c) 0.03, (d) 0.05, (e) 0.10, (f)0.17, (g) 0.25, (h) 0.33, (i) 0.41 (j) 0.49 mM. En todos los VDPs la velocidad de barrido de potencial fue de 20 mVs<sup>-1</sup> y amplitud 0.5. b) Variación de  $j_p^{DA}$  en función de [DA] obtenida de las curvas mostradas en (a) La línea corresponde a el ajuste lineal de los datos experimentales (●)

119

**Figura 8.15.** VCs obtenidos en el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0) a diferentes velocidades de barrido: (a) 10 (b) 20 (c) 40 (d) 60 (e) 80 (f)100 mVs<sup>-1</sup>. El inserto muestra la variación de  $j_{ap}$ , en función de  $v^{1/2}$ , los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea:  $j \text{ (Am}^{-2}\text{)} = (0.086 \pm 0.001) \text{ Am}^{-2}\text{mV}^{-1/2} \text{ s}^{-1} v^{1/2} + (0.063 \pm 0.007) \text{ Am}^{-2}$  con  $r^2 = 0.9881$ , es el resultado del ajuste lineal

121

**Figura 8.16.** VDPs del sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/NaCl 0.1 M (pH 3.0) a velocidad de barrido de potencial de 20 mVs<sup>-1</sup> y amplitud 0.5, con diferentes [DA]: (a) 0.02 (b) 0.03 (c) 0.04 (d) 0.06 (e) 0.08 (f) 0.1 mM. b) Variación de  $j_p^{DA}$  en función de [DA] obtenida de las curvas mostradas en (a) La línea corresponde a el ajuste lineal de los datos experimentales (o)

122

**Figura 8.17.** VCs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/AA 1mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0), a diferentes velocidades de barrido: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 50, (e) 60, (f) 80 and (g) 100 mVs<sup>-1</sup>. Inserto gráfico de  $j_{ap}$ , como función de  $v^{1/2}$ , los círculos corresponde a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde a el ajuste lineal ,  $j \text{ (Am}^{-2}\text{)} = (0.007 \pm 0.018) \text{ Am}^{-2}\text{mV}^{-1/2} \text{ s}^{-1} v^{1/2} - (0.53 \pm 0.13) \text{ Am}^{-2}$  con  $r^2 = 0.9936$

123

**Figura 8.18.** a) VDPs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/NaCl 0.1 M (pH=3.0), a la velocidad de barrido de 20 mVs<sup>-1</sup> y amplitud 0.05V, con diferentes [AA] (a) 0.02 (b) 0.04 (c) 0.05 (d) 0.06 y (e) 0.07 mM. b) Variación de  $j_{pa}$ , en función de [AA]. Los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea a el ajuste lineal

124

**Figura 8.19.** VDPs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/DA 008 mM, AA 1 mM, NaCl 0.1 M, (pH 3.0), a velocidad de barrido de 20 mVs<sup>-1</sup> y

- amplitud 0.05 V 125
- Figura 8.20.** a) VDPs obtenidos con el EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/AA 1 mM, NaCl, (pH 3.0) 0.1 M para varias [DA]: (a) 0, (b) 0.02 (c) 0.05 (d) 0.08 (e) 0.01 (f) 0.14 (g) 0.16 (h) 0.2 mM. En todos los casos la velocidad de barrido de potencial fue 20 mVs<sup>-1</sup> y amplitud 0.05 V. b) Variación de  $j_p^{DA}$  como función de la [DA] obtenida de los DPVs mostrados en a). Los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea el ajuste lineal 125
- Figura 8.21.** VCs del sistema EPC/MWCNT/ $\square$ -CD /poly- $\beta$ -CD 0.01 M/HClO<sub>4</sub> 0.1 M, después de 10 ciclos a velocidad de barrido de 100 mVs<sup>-1</sup> 126
- Figura 8.22.** VCs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD NaCl 0.1 M (pH 3.0) para DA 0.1 mM, a velocidad de barrido de 100 mVs<sup>-1</sup> 127
- Figura 8.23.** (a) VCs obtenidos con el sistema EPC /MWCNT / $\square$ CD /poly- $\beta$ CD para DA 0.1 mM (pH 3.0) a diferentes velocidades de barrido (a) 10 (b) 20 (c) 40 (d) 60 (e) 80 (f) 100 mVs<sup>-1</sup>. Inserto: Variación de  $j_{ap}$ , en función de  $v^{1/2}$  los círculos corresponde a los datos experimentales y la línea al ajuste lineal 128
- Figura 8.24.** a) Curvas VDP para el sistema EPC/MWCNT- $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD en NaCl 0.1 M (pH 3.0) para [DA] de (a) 0.01 (b) 0.02 (c) 0.03 (d) 0.04 (e) 0.05 (f) 0.06 (g) 0.07 (h) 0.08 (i) 0.09 (j) 0.10 mM. Velocidad de barrido 20mVs<sup>-1</sup>, amplitud 0.05 V b) Análisis estadístico para la curva del inciso a). los círculos corresponde a los datos experimentales y la línea al ajuste lineal 129
- Figura 8.25.** Curvas VDP para el sistema EPC/MWCNT - $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD NaCl 0.1 M (pH 3.0) para AA 1 mM a diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.03 (c) 0.04 (d) 0.05 (e) 0.06 (f) 0.07 (g) 0.08 (f)0.09 (g)0.1. Velocidad de barrido 20mVs<sup>-1</sup>, amplitud 0.01 b) Análisis estadístico para las curvas del inciso a) los círculos corresponde a los datos experimentales y la línea al ajuste lineal 130

## CAPÍTULO 9

- Figura 9.1.** Representación esquemática de las formas moleculares protonadas de (a) la dopamina (b) del ácido ascórbico y (c) de la  $\beta$ -CD 135

<b>Figura 9.2.</b> Diagrama de zonas de predominio de las especies de dopamina y sus estructuras de mínima energía en función del pH [9.3]	136
<b>Figura 9.3.</b> Familia de espectros de absorción del AA $1 \times 10^{-4}$ M, para diferentes valores de pH entre 1.0 y 12.0	138
<b>Figura 9.4.</b> Diagrama de zonas de predominio de las especies de ácido ascórbico, y sus estructuras, en función del pH	139
<b>Figura 9.5.</b> Comportamiento espectral del AA $1 \times 10^{-4}$ M a pH 3.0 a diferentes concentraciones de $\beta$ -CD. El inserto muestra la variación del máximo de absorbancia a una $\lambda$ de 242 nm en función de la concentración de $\beta$ -CD	140
<b>Figura 9.6.</b> Comparación entre el espectro de absorción teórico (—) y el experimental (O) obtenido a $p\beta$ -CD = 4	141
<b>Figura 9.7 a).</b> Voltamperogramas cíclicos para el sistema EPC/NaCl 0.1M, AA $1 \times 10^{-4}$ M a pH 3 para diferentes adiciones de $\beta$ -CD, velocidad de barrido $100 \text{ mVs}^{-1}$ . b) Cambio del potencial en función de la concentración de $\beta$ -CD	142
<b>Figura 9.8.</b> Comportamiento espectral de DA $2.8 \times 10^{-4}$ M (—) y DA con $\beta$ -CD $2.5 \times 10^{-3}$ M ( $\Delta$ ) a pH 3.0. El inserto muestra la variación de la absorbancia a $\lambda=279$ nm en función de la concentración de $\beta$ -CD	144
<b>Figura 9.9.</b> Comparación entre el espectro de absorción teórico (línea) y el experimental (puntos) obtenido a $p\beta$ -CD = 4	145
 <b>CAPÍTULO 10</b>	
<b>Figura 10.1</b> Estructura molecular Azometina-H	149
<b>Figura 10.2.</b> Espectros de absorción de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en 0.1M de HCl a diferentes tiempos de disolución, en condiciones ambientales.	150
<b>Figura 10.3.</b> Gráfico del comportamiento de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en 0.1M de HCl, en función del tiempo en condiciones ambientales a,b) 244 nm, c,d) 260 nm.	151
<b>Figura 10.4.</b> Comportamiento espectral en el tiempo de $1 \times 10^{-5}$ M Azometina-H a pH 11.5 ajustado con 0.1M NaOH en condiciones del medio ambiente (luz y oxígeno).	152
<b>Figura 10.5.</b> Comportamiento de la absorbancia en $\lambda= 236$ y $296$ nm en función del	

tiempo. A partir de los espectros de absorción de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en 0.1M de NaOH, en condiciones del medio ambiente	153
<b>Figura 10.6.</b> Cambio espectral en función del pH de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en 0.1M HCl en condiciones ambientales (luz y oxígeno), obtenidos a partir de una valoración ácido base.	155
<b>Figura 10.7.</b> Curvas de absorbancia-pH de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M, obtenidas a partir de la Titulación ácido base.	156
<b>Figura 10.8.</b> Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en a) HCl con luz y con oxígeno, b) HCl sin luz y con oxígeno, c) HCl sin luz y sin oxígeno	158
<b>Figura 10.9</b> Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en a) Ano con luz y con oxígeno; aII) Espectros de absorción a $t=0$ , $t=3$ y $t=120$ min, b) NaOH sin luz y con oxígeno; bII) Espectros de absorción a $t=0$ , $t=4$ y $t=120$ min, c) NaOH sin luz y sin oxígeno CII) Espectros de absorción a $t=0$ , $t=6$ y $t=120$ min	159
<b>Figura 10.10</b> I). Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en fosfatos 0.01 M con luz y con oxígeno; II) Espectros de absorción a $t=0$ , $t=12$ y $t=120$ min.	161
<b>Figura 10.11.</b> a) Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en medio amortiguado fosfatos 0.01M sin luz y sin oxígeno; b) Espectros de absorción al $t=0$ y $t=120$ min	162
<b>Figura 10.12.</b> Comportamiento espectral a diferentes pH de la Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M, obtenidos mediante valoración.	163
<b>Figura 10.13</b> Espectros de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M a diferentes pH (puntual) en solución amortiguadora de fosfatos.	165
<b>Figura 10.14</b> Espectros de absorción de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M en medio de fosfatos. En la región de 200 a 300nm obtenidos por la metodología punto por punto.	166
<b>Figura 10.15.</b> Espectros de Azometina-H $1 \times 10^{-5}$ M para valores de pH entre 1 y hasta 11.5 en el intervalo de longitudes de onda de 275 a 425nm.	167
<b>Figura 10.16.</b> Coeficientes molares de Azometina-H, obtenido a partir del refinamiento de constantes por el programa SQUAD.	169

- 
- Figura 10.17.** Diagrama de fracciones molares de Azometina-H, obtenido a partir de los coeficientes de absorptividad molar obtenido del refinamiento de constantes por el programa SQUAD. 170
- Figura 10.18.** Espectros de absorción Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M simulados a partir de los datos Teórico (marcador) y comparados con los-Experimental (línea). 170
- CAPÍTULO 11**
- Figura 11.1** a) Blanco electrodo de pasta sin modificar, b) Perfil de la membrana de MWCNT /CD en acetato de amonio pH = 7.0 a la velocidad de barrido de 100mV/s 177
- Figura 11.2** Voltamperograma cíclico de 1mM de Azometina-H en acetato de amonio, pH = 7.0 a la velocidad de barrido de 100mV/s. 178
- Figura 11. 3** Voltamperograma cíclico de 1mM de Azometina-H, en acetato de amonio, pH = 7.0 a la velocidad de barrido de 100mV/s. a) electrodo sin modificar y b) electrodo modificado con MWCNT-CD . 179
- Figura 11.4.** Voltamperogramas cíclicos de 1mM azometina-H, en acetato de amonio a pH= 7, a diferentes velocidades de barrido: 0.01,0.02,0.03, 0.04, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.1V. Electrodo de trabajo: pasta de carbón modificado con MWCNT-CD. 180
- Figura 11.5.** a) Gráfico de la corriente de p1 en función de la raíz de la velocidad b) gráfico de la corriente p1 en función de la velocidad: electrodo de trabajo: pasta de carbón modificado con MWCNT  $\beta$ -CD. 180





# ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Tabla 3.1.</b> Constantes de acidez de las especies DA	19
<b>Tabla 3.2.</b> Constantes de acidez de la DA, obtenidas con el análisis punto por punto.	27
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Tabla 4.1.</b> Valores de las constantes de acidez de la DA reportadas en la literatura	31
<b>Tabla 4.2.</b> Constantes de Acidez del grupo catecol y etilenamina.	34
<b>Tabla 4.3.</b> Variación de las energías totales B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM, el potencial químico ( $\mu$ ) y la dureza química ( $\eta$ ), calculados con MP2/ 6-311+g(d,p) y nivel AM1 para los rotámeros de la DA.	39
<b>Tabla 4.4.</b> Afinidad protónica (PA) de las especies neutras H <sub>2</sub> DA-I, H <sub>2</sub> DA-II y H <sub>2</sub> DA-III, calculadas por B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM de acuerdo a la ecuación (1).	42
<b>Tabla 4.5.</b> Energías moleculares relativas ( $\Delta E$ ) (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) de los diferentes isómeros formados de la desprotonación de H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup> : H <sub>2</sub> DA-I, H <sub>2</sub> DA-II, H <sub>2</sub> DA-III.	42
<b>Tabla 4.6.</b> Afinidad protónica (PA) de las especies HDA <sup>-</sup> -I y HDA <sup>-</sup> -III, para formar H <sub>2</sub> DA-I, calculadas por B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM de acuerdo a la ecuación (1).	42
<b>Tabla 4.7.</b> Energías moleculares relativas ( $\Delta E$ ) (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) de los diferentes isómeros involucrados durante de la desprotonación de H <sub>2</sub> DA-I, de acuerdo a la ruta C (HDA <sup>-</sup> -III) y D (HDA <sup>-</sup> -I).	43
<b>Tabla 4.8.</b> Afinidades protónicas (PA) de DA <sup>2-</sup> para formar HDA <sup>-</sup> -I o HDA <sup>-</sup> -III calculadas por B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM de acuerdo con la ecuación (1).	43
<b>Tabla 4.9.</b> Cargas atómicas de Mulliken (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) de la DA N-protonada (H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup> )	44
<b>Tabla 4.10.</b> Distancias de enlace (Å) B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM of the N-protonada dopamina (H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup> )	44

---

<b>Tabla 4.11.</b> Desplazamientos químicos experimentales en ppm de los átomos de carbono en la DA a diferentes valores de pH, obtenidos de los espectros $^{13}\text{C}$ RMN.	48
---	----

## CAPÍTULO 5

<b>Tabla 5.1.</b> Variación de los parámetros voltamperométricos como función de la velocidad de barrido ( $v$ ) correspondientes a los VC mostrados en la figura 5.2.	59
--	----

<b>Tabla 5.2.</b> Variación de los parámetros voltamperométricos obtenidos de los gráficos de la figura 5.9, como una función de la [SDS]. La constante de velocidad heterogénea ( $k^o$ ) estimada para cada concentración de SDS.	65
---	----

<b>Tabla 5.3.</b> Variación de parámetros voltamperométricos obtenidos de los gráficos de la figura 5.10 como una función de la velocidad de barrido. La constante heterogénea ( $k^o$ ) y el número de electrones transferidos ( $n$ ), estimados usando las ecuaciones (5.7), y (5.8), se reportan en esta tabla.	68
---	----

<b>Tabla 5.4.</b> Parámetros del mejor ajuste, obtenidos por el ajuste no lineal ecuación (5.15) para el comportamiento anódico de VCs, en la figura 5.10 obtenida a diferentes velocidades de barrido.	70
---	----

## CAPÍTULO 6

<b>Tabla 6.1.</b> Parámetros Analíticos de algunos electrodos modificados para la determinación de DA, en presencia de AA.	74
--	----

<b>Tabla 6.2.</b> Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibración de DA, para el sistema EPC /NaCl 0.1 M, AA 0.8 mM en función de [SDS].	81
---	----

<b>Tabla 6.3.</b> Recobro de DA y determinación en fármacos en presencia de AA.	82
---	----

## CAPÍTULO 7

<b>Tabla 7.1.</b> Valores de potenciales del pico anódico y catódico de 0.1mM de DA a pH = 3.4 y pH 7.4 con ECV.	85
--	----

<b>Tabla 7.2.</b> Parámetros electroquímicos obtenidos de la VC de la DA 0.01 mM usando un ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD	94
---	----

---

**CAPÍTULO 8**

<b>Tabla 8.1.</b> Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibración de DA, usando el sistema, EPC/poly- $\beta$ -CD (después de aplicar 10, 20 y 30 ciclos voltamperométricos)/AA 1 mM, NaCl 0.1M (pH 3.0), donde la poly- $\beta$ -CD fue sintetizada a diferentes números de ciclos voltamperométricos.	120
<b>Tabla 8.2.</b> Parámetros analíticos para cada electrodo estudiado para la determinación de DA	131
<b>Tabla 8.3.</b> Parámetros analíticos para cada sistema donde la DA fue determinada en presencia de AA. Los valores fueron obtenidos de los VDPs	131
<b>Tabla 8.4.</b> Resultados obtenidos de la determinación de DA en fármacos en presencia de AA del laboratorio Kendricks usando los mejores electrodos diseñados en este capítulo	132

**CAPÍTULO 9**

<b>Tabla 9.1.</b> Constantes de formación global del AA evaluados mediante experimentos espectrofotométricos, ver figura 9.3 y el programa SQUAD	138
<b>Tabla 9.2.</b> Constantes de formación global del complejo H <sub>2</sub> AA- $\beta$ -CD evaluados mediante experimentos espectrofotométricos y el programa SQUAD	140

**CAPÍTULO 10**

<b>Tabla 10.1.</b> Valores de log $\beta$ de Azometina-H obtenidas de la valoración Espectrofotométrica	164
<b>Tabla 10.2.</b> Valores de pka's de Azometina-H obtenidos del análisis puntual	168



---

# ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Esquema 3.1.</b> Equilibrios ácido-base asociados a la DA.	18
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Esquema 4.1.</b> Dos posibles rutas de desprotonación de acuerdo al mecanismo propuesto por Kiss y Martin [4.8]	33
<b>Esquema 4.2.</b> Rutas posibles de desprotonación propuesto por el mecanismo de Rajan y col. [4.17]	34
<b>Esquema 4.3.</b> Rutas alternativas de desprotonación de DA en solución acuosa	35
<b>CAPÍTULO 9</b>	
<b>Esquema 9.1.</b> Diagrama de predicción de reacción de la DA y del AA [9.1]	136



# ABREVIATURAS

<b>A</b>	<b>AMPERES</b>
<b>A</b>	<b>AFINIDAD ELECTRÓNICA</b>
<b>A<sup>280nm</sup><sub>t=0</sub></b>	<b>ABSORBANCIA A UNA LONGUITU DE ONDA DE 280nm AL TIEMPO CERO</b>
<b>AA</b>	<b>ÁCIDO ASCÓRBICO</b>
<b>Az-H</b>	<b>AZOMETINA-H</b>
<b><math>\alpha</math></b>	<b>COEFICIENTE DE ENERGÍA DE TRANSFERENCIA</b>
<b><math>\beta</math>-CD</b>	<b><math>\beta</math>-CICLODEXTRINA</b>
<b>°C</b>	<b>GRADOS CENTRIGADOS</b>
<b>C<sub>0</sub><sup>*</sup></b>	<b>CONCETRACIÓN</b>
<b>CMC</b>	<b>CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA</b>
<b>D</b>	<b>COEFICIENTE DE DIFUSIÓN</b>
<b>DA</b>	<b>DOPAMINA</b>
<b>DA<sup>2-</sup></b>	<b>DOPAMINA COMPLETAMENTE DESPROTONADA</b>
<b>DASQ</b>	<b>FORMA DE LA SEMIQUINONA DE LA DOPAMINA</b>
<b>DZP</b>	<b>DIAGRAMA SE ZONAS DE PREDOMINIO</b>
<b>DSS</b>	<b>2,2-DIMETIL-2-SILAPENTANO-5-SULFONATO SODIO</b>
<b><math>\Delta E_0</math></b>	<b>DIFERENCIA DE LAS ENERGÍAS TOTALES</b>
<b><math>\Delta E_p</math></b>	<b>DIFERENCIA DE POTENCIAL (<math>E_{pa}-E_{pc}</math>)</b>

---

$\Delta G^0$	ENERGÍA LIBRE
$D_2O$	AGUA DEUTERADA
$\phi$	ÁNGULO DIEDRO
E	POTENCIAL
$E^0$	POTENCIAL FORMAL
$E_{FWHH}$	AMPLITUD DE PICO A MEDIA ALTURA
$E_{pa}$	POTENCIAL DEL PICO ANÓDICO
$E_{pc}$	POTENCIAL DEL PICO CATODICO
ECV	ELECTRODO DE CARBON VÍTREO
EPC	ELECTRODO DE PASTA DE CARBÓN
EC	MECANISMO ELECTROQUÍMICO-QUÍMICO
F	CONSTANTE DE FARADAY
FIA	ANÁLISIS EN FLUJO CONTINUO
GIAO	GAUGE INCLUDING ATOMIC ORBITAL
$H_3DA^+$	DOPAMINA COMPLETAMENTE PROTONADA
$H_2DA$	DOPAMINA NEUTRA
$HDA^-$	DOPAMINA ANIÓNICA
HOMO	ENERGÍAS DEL ORBITAL MOLECULAR DEL ORBITAL MOLECULAR MÁS ALTO OCUPADO
HPLC	CROMATOGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN
I	POTENCIAL DE IONIZACIÓN
$i$	INTENSIDAD DE CORRIENTE



---

$i_{pa}$	INTENSIDAD DE CORRIENTE DEL PICO ANODICO
$i_{pc}$	INTENSIDAD DE CORRIENTE DEL PICO CATODICO
$j$	DENSIDAD DE CORRIENTE
$j_{pa}$	DENSIDAD DE CORRIENTE DEL PICO ANODICO
$j_{pc}$	DENSIDAD DE CORRIENTE DEL PICO CATODICO
$j_P^{DA}$	DENSIDAD DE CORRIENTE DEL PICO DE LA DOPAMINA
$j_P^{AA}$	DENSIDAD DE CORRIENTE DEL PICO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO
K	KELVIN
$k^0$	CONSTANTE DE VELOCIDAD HETEROGÉNEA
$k_\eta$	CONSTANTE DE VELOCIDAD EN EL ELECTRODO SOBRE EL POTENCIAL
LUMO	ENERGÍAS DEL ORBITAL MOLECULAR DEL ORBITAL MOLECULAR MÁS BAJO DESOCUPADO
$\lambda$	REORGANIZACIÓN DE LA ENERGÍA
$\lambda$	LONGITUD DE ONDA
M	MOLARIDAD
min	MINUTOS
MWCNT	NANOTUBOS DE CARBÓN DE MULTIPARED
$\mu$	POTENCIAL QUÍMICO
$n$	NÚMERO DE ELECTRONES
$\eta$	DUREZA QUÍMICA

---

<b>nm</b>	<b>NANOMETROS</b>
<b>NMR-GIAO</b>	<b>NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE-GAUGE INCLUDING ATOMIC ORBITAL</b>
<b>P<sub>AA</sub></b>	<b>PICO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO</b>
<b>P<sub>DA</sub></b>	<b>PICO DE LA DOPAMINA</b>
<b>PA</b>	<b>AFINIDAD PROTÓNICA</b>
<b>PCM</b>	<b>MODELO CONTINUO POLARIZABLE</b>
<b>pKa</b>	<b>CONSTANTE DE ACIDEZ</b>
<b>poly-β-CD</b>	<b>POLIMERIZACIÓN DE LA β-CD</b>
<b>ppm</b>	<b>PARTES POR MILLON</b>
<b>R</b>	<b>CONSTANTES DE GAS UNIVERSAL</b>
<b>r<sup>2</sup></b>	<b>COEFICIENTE DE CORRELACIÓN</b>
<b>RMN</b>	<b>RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR</b>
<b>ρ</b>	<b>DENSIDAD</b>
<b>s</b>	<b>SEGUNDOS</b>
<b>SEM</b>	<b>MICROSCOPÍA DE BARRIDO ELECTRÓNICO</b>
<b>SDS</b>	<b>DODECIL SULFATO DE SODIO</b>
<b>SQUAD</b>	<b>STABILITY QUOTIENTS FROM ABSORBANCE DATA</b>
<b>SNC</b>	<b>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b>
<b>σ</b>	<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>
<b>T</b>	<b>TEMPERATURA ABSOLUTA</b>

<b>t</b>	<b>TIEMPO</b>
<b>t<sub>r</sub></b>	<b>TIEMPO DE RETENCIÓN</b>
<b>TFD</b>	<b>TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD</b>
<b>UV</b>	<b>ULTRAVIOLETA</b>
<b>v</b>	<b>VELOCIDA DE BARRIDO</b>
<b>VC</b>	<b>VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA</b>
<b>VDP</b>	<b>VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO</b>
<b>V</b>	<b>VOLTS</b>
<b>VIS</b>	<b>VISIBLE</b>



---

## RESUMEN

Mediante métodos electroquímicos, espectrofotométricos (UV/Vis), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatográficos (HPLC) y cálculos teóricos (DFT) se estudiaron sistemas supramoleculares para el desarrollo de métodos de análisis cuantitativos útiles en la determinación de dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) y Azometina-H (Az-H).

Los sistemas supramoleculares fueron desarrollados mediante la modificación de electrodos de pasta de carbono (EPC) y de carbón vítreo (ECV) con diferentes sistemas: dodecilsulfato de sodio (SDS), nanotubos de carbón de multipared (MWCNT) y  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD).

Se determinaron experimentalmente las constantes termodinámicas de acidez de DA, AA y Az-H, (pKa), así como de las diferentes interacciones de estas moléculas con los sistemas supramoleculares considerados (p. ej. complejos de inclusión), encontrando además que tanto la DA como el AA forman complejos de inclusión con  $\beta$ -CD en relación estequiométrica 1:1. El cálculo de todas las constantes termodinámicas se llevó a cabo utilizando el programa computacional SQUAD, para los resultados de espectroscopía UV/Vis, lo que permitió una importante contribución con la determinación de estos valores, además a partir de las constantes de acidez de la DA fue posible elucidar su mecanismo de desprotonación de dicha molécula empleando cálculos teóricos y experimentalmente por RMN.

Los diferentes sistemas supramoleculares propuestos fueron utilizados como electrodos de trabajo y mediante métodos electroquímicos se determinó el mecanismo y la cinética de oxidación electroquímica (constantes de velocidad heterogéneas de transferencia de carga,  $k^0$ ), entre otras características, de las moléculas DA, AA y Az-H. En el caso de la DA se pone en evidencia el efecto del SDS en la estabilización de un radical, producto de la esta oxidación formado vía la transferencia de un electrón.

A partir de estos resultados se aportó al conocimiento químico y electroquímico de estos sistemas supramoleculares y de esta manera se pudieron elegir condiciones experimentales óptimas para el desarrollo de un método analítico robusto aplicado a la determinación de DA en presencia de AA. Se proponen tres métodos de determinación de DA, uno para cada sistema utilizado y se presenta la evaluación del método utilizando muestras reales (fármaco), los resultados obtenidos son satisfactorios ya que se tiene un CV menor al 2% en dicha determinación.

---

**ABSTRACT**

The present thesis studied supramolecular systems designed to develop reliable quantitative chemical analyses for the determination of dopamine, DA, azomethine-H, Az-H, and ascorbic acid, AA, by means of electrochemical, spectrophotometric UV/Vis, nuclear magnetic resonance, NMR, chromatographic, HPLC, methods and theoretical calculations, DFT.

The said supramolecular systems were developed by modifying carbon paste electrodes, CPE, and glassy carbon electrode, GCE, with different systems, composed by: sodium dodecyl sulphate, SDS, multiwalled carbon nanotubes, MWCNT and  $\beta$ -cyclodextrin,  $\beta$ -CD.

The thermodynamic acidity constants, pKa, of the DA, Az-H and AA were determined experimentally, as well as their different interactions, such as inclusion complexes, with the supramolecular systems considered, which indicated that both the DA and AA formed inclusion complexes with the  $\beta$ -CD with a 1:1 stoichiometric ratio. The assessment of the said thermodynamic constants was carried out using the UV/Vis data and its processing through SQUAD rendered values that signify an important contribution. Apart from the DA's acidity constants, it was possible to elucidate its deprotonation mechanisms using theoretical calculations verified by experimental NMR.

The different supramolecular systems proposed herein, were used as working electrodes that permitted to devise specific electrochemical methods for the DA, Az-H and AA molecules, to gain insight of the kinetics and mechanisms, namely, the heterogeneous charge transfer constants,  $k^0$ , associated to their electrochemical oxidation, among other features. For instance, in the DA's case, the effect of the SDS became evident to stabilise a radical formed through oxidation via an electron transfer.

From the results obtained, chemical and electrochemical knowledge was derived of the supramolecular systems designed such that basic analytical criteria were implemented to construct a robust analytical method to determine DA in the presence of AA. Three methods are proposed to determine DA, one for each system used, that are presented along with their evaluation using real pharmaceutical samples in each case; the results obtained are satisfactory as the resulting CV was less than 2% for each determination.



# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Justificación

El análisis químico en nuestros días involucra tanto la identificación como la determinación cuantitativa de las sustancias presentes en una muestra en solución. Estas muestras pueden ser desde fluidos biológicos hasta desechos industriales. Para el desarrollo del método de análisis, es importante conocer el comportamiento químico de las especies que se quieren determinar, y de esta manera tener un método de análisis robusto. Los resultados de un análisis químico servirán para ejecutar acciones apropiadas en cada uno de los diversos escenarios.

### 1.2. Introducción.

Hoy en día el análisis químico no sólo está encaminado al estudio cuantitativo, sino también al estudio cualitativo de las especies en solución, es importante saber cuanto se tiene y que se tiene, así como poder evitar la formación de productos no deseados.

En la actualidad muchas de las investigaciones están enfocadas a la búsqueda de entender mejor el comportamiento químico de diversos compuestos, ya que algunos procesos químicos como la degradación, pueden afectar los procesos en los que están involucrados y causar daños irreversibles en el sistema en que se encuentren.

Esta problemática ha dirigido las investigaciones hacia compuestos que son susceptibles al daño en su estructura e integridad funcional.

La inestabilidad o degradación de los compuestos frecuentemente está asociada con su estructura química y con agentes oxidantes, aquellos que pueden con facilidad atraer electrones de moléculas circundantes, o con agentes que influyen en la estabilidad de las moléculas provocando hidrólisis.

En este sentido algunos investigadores estudian las diferentes causas que pueden provocar la degradación de ciertas sustancias químicas y los productos de degradación que se obtienen de la misma.

Miyazaki (2003) [1.1], ha estudiado la degradación de las catecolaminas, donde asocia el oxígeno y las especies de nitrógeno con la oxidación y auto-oxidación de estas sustancias.

Las vitaminas por otra parte, también son sustancias que pueden degradarse por fotooxidación, ya que son sensibles a la luz, algunos estudios al respecto han sido realizados por Marciniak (2003) [1.2], mientras que Fazakerley (1960) [1.3], ha estudiado la degradación para algunos esteroides como ergosterol, calciferol y la cortisona.

Por otra parte diversas investigaciones se han enfocado al estudio de azocompuestos (colorantes) ya que los intermediarios formados a partir de la degradación u oxidación de estos, pueden ser tóxicos según estudios realizados por la ETAD [1.4] (Ecological and Toxicological Association Dystuff), han identificado que los productos de degradación pueden ser causa de riesgo y efecto crónico en la salud del ser humano.

Las catecolaminas y las bases de Schiff en su estructura molecular presentan grupos funcionales que pueden ser oxidados y llevar a la formación de especies del tipo de las quinonas altamente reactivas.

La estabilidad de los compuestos como las bases de Schiff, está relacionada también con la formación de isómeros que pueden presentar este tipo de moléculas, y con la existencia de equilibrios tautoméricos, además de los productos generados por la oxidación de los grupos funcionales de estas moléculas.

En la búsqueda de nuevos métodos que permitan estabilizar las sustancias químicas, se ha encontrado que la química supramolecular puede ayudar a contrarrestar esta problemática, así macromoléculas como las ciclodextrinas pueden estabilizar, solubilizar, retener y liberar de manera controlada un gran número de compuestos orgánicos e

inorgánicos mediante la formación de complejos de inclusión, las interacciones entre la molécula de interés con la ciclodextrina son interacciones débiles tipo Van der Waals, dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno.

Por lo que, mediante la formación de complejos de inclusión se ha resuelto el problema de estabilidad y solubilidad de compuestos como parafinas, alcoholes, ácidos carboxílicos, colorantes aromáticos, vitaminas y derivados de benceno según reporta Contreras [1.5] en su publicación del 2001.

El problema de estabilidad de colorantes y solubilidad se ha resuelto también mediante el uso de ciclodextrinas por ejemplo, Hewlett-Packard, Xerox y Kimberly-Clark emplean ciclodextrinas para solubilizar tintas adecuadas para impresoras, de tal manera que Morffat (1992) [1.6], Helbrect en (1994) [1.7] y Cappuccio (1996) [1.8] han patentado los procesos de solubilidad con ciclodextrinas para dichas marcas.

El uso de ciclodextrinas ha permitido estabilizar a compuestos del tipo de los esteroides como lo hace Loftsson (1994) [1.9], o para solubilizar y estabilizar medicamentos como lo propone Loftsson y Brewster (1996) [1.10].

Otros sistemas supramoleculares de gran interés son los surfactantes estos son frecuentemente usados en bioquímica, medicina y farmacéutica debido a su habilidad para formar micelas, ya que la formación de éstas, favorece la estabilidad y solubilidad de algunos compuestos.

Los surfactantes también han permitido estabilizar y solubilizar ciertos compuestos por ejemplo Alamelu (1990) [1.11], utilizó diferentes surfactantes para estudiar la estabilidad de liposomas. En los medicamentos se han empleado para aumentar la solubilidad y el control de la liberación del medicamento [1.12], en los plaguicidas también se utilizan para mejorar sus propiedades químicas y físicas, moléculas como los azocolorantes pueden ser estabilizados por la presencia de surfactantes Pelan (1997) [1.13].

En base a estos antecedentes, el empleo de la química supramolecular, con moléculas como las ciclodextrinas y los surfactantes, está encaminado a mejorar características como la solubilidad e incrementar la estabilidad de los compuestos lábiles. Por esta razón se pretende usar los sistemas supramoleculares para estabilizar y evitar la degradación de moléculas como la Dopamina, el Ácido Ascórbico y la Azometina-H, además se usará para aumentar la solubilidad de materiales como nanotubos de carbón.

Siendo que el análisis químico involucra dos piezas esenciales como son: el análisis cualitativo y cuantitativo, una vez que se haya logrado conocer las especies involucradas y en el mejor de los casos *controlar* la evolución del sistema, mediante las ciclodextrinas y los surfactantes, es necesario desarrollar un método para cuantificar el analito de interés.

Este análisis requiere de técnicas muy sensibles y selectivas para muestras que contengan trazas de las especies de interés. El método o técnica ideal para este objetivo, es aquel que sea económico y fácil de operar, donde los datos obtenidos sean reproducibles y confiables en cada trabajo. A pesar de que existen diversas técnicas, las que destacan son las técnicas electroanalíticas y los sensores químicos, los cuales tienen alta sensibilidad y buena selectividad. Los sensores son recientemente aplicados a bioanálisis y al análisis ambiental, por lo que en la actualidad los métodos de análisis cuantitativo están encaminados al uso de sensores químicos.

Los métodos para la determinación de sustancias como: neurotransmisores (DA), antioxidantes (AA) y colorantes (Az-H) se realizan preferentemente, mediante el uso de técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), como lo sugieren Yoshitake (2004) [1.14], Heidbreder (2001) [1.15], Chi (1999) [1.16], Parsons (1998) [1.17], sin embargo, el uso de HPLC tiene diferentes limitantes como el tiempo de análisis, el costo de los solventes y del equipo, por otro lado, los métodos electroquímicos han sido la solución a esta problemática ya que la construcción de electrodos modificados y sensores electroquímicos aumentan la selectividad y se pueden eliminar las interferencias Li (2003) [1.18].

Para dar a conocer la importancia de cada una de las especies químicas en estudio, en los siguientes apartados se mencionan diferentes características de ellas.

### **1. 3. Dopamina (DA)**

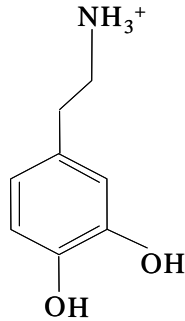
En 1958, Carlsson [1.19] consideró a la dopamina como el prototipo de las catecolaminas. La DA es un neuroregulador, que desempeña un papel fundamental en la comunicación entre células nerviosas adyacentes. Es uno de los neurotransmisores más importantes dentro del sistema nervioso central, del contenido total de catecolaminas del cerebro, la DA representa más del 50%.

A principios de la década de 60's, algunos investigadores identificaron un defecto cerebral fundamental en la enfermedad de Parkinson, el cual se relacionaba con la pérdida de células cerebrales que producen a la DA, esta pérdida hace que los músculos actúen sin control.

Una teoría sostiene que los radicales libres, moléculas inestables y potencialmente perjudiciales generadas por acciones químicas normales en el cuerpo, pueden contribuir a la muerte de las células nerviosas. Los radicales libres son inestables debido a que carecen de un electrón, en su intento por recuperarlo reaccionan con moléculas circundantes (especialmente metales), generando un proceso llamado oxidación. Se considera que la oxidación ocasiona daño a los tejidos, así como a las neuronas como lo sugiere Cavalieri (2002) [1.20]. Los niveles de DA pueden ser alterados por la presencia de agentes oxidantes que causan la oxidación de ésta, e inducen a un cambio en la ruta metabólica de la sustancia propone Cavalieri (2002) [1.21].

Se ha encontrado que las catecolaminas reaccionan con el oxígeno afectando su estructura e integridad funcional, con frecuencia ésto se atribuye al grupo funcional catecol que es fácilmente oxidado a una quinona [1.22].

Barreto y col. [1.23], en su estudio de la oxidación de una catecolamina, muestra que el principal agente oxidante es el oxígeno y que su producto de degradación es la formación de semiquinonas. Dado que en la estructura química de la DA (figura 1.1), está formada por un grupo catecol y un grupo amino, la DA es muy sensible a agentes oxidantes, provocando formación de productos con estructuras del tipo de las quinonas como lo sugieren los estudios de Slivaka (1985) [1.24] y Haque (2003) [1.25].



**Figura 1.1. Estructura molecular de dopamina**

Algunos investigadores han propuesto rutas metabólicas y mecanismos de reacción que involucran la presencia de oxígeno, ellos sugieren que la DA puede formar además de adrenalina, un producto de oxidación conocido como dopaminocromo, Levin 1961 [1.26], sin embargo la DA puede seguir diferentes rutas y generar diferentes productos de oxidación, como el indol (figura 1.2) o la quinona (figura 1.3), estas discrepancias provocan que se sigan haciendo investigaciones sobre el mecanismo de oxidación que sigue la DA.

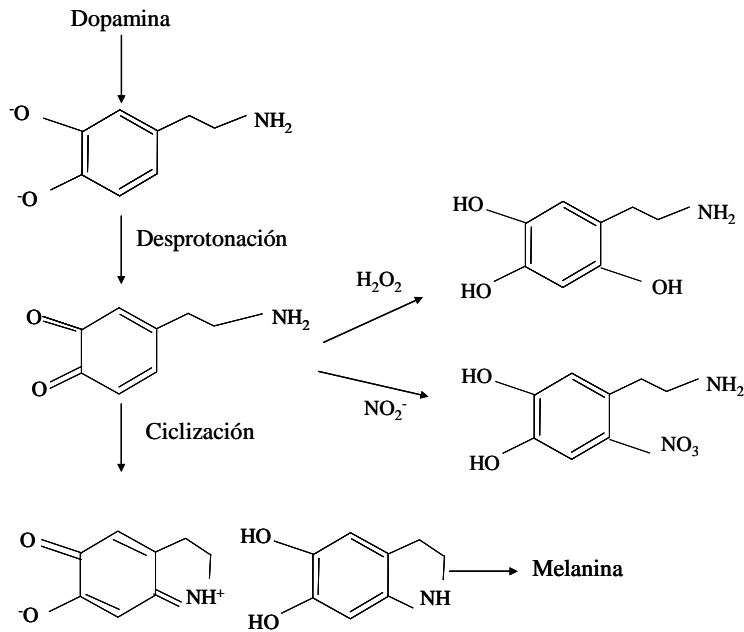


Figura 1.2. Mecanismo de reacción propuesto por Palumbo [1.27].

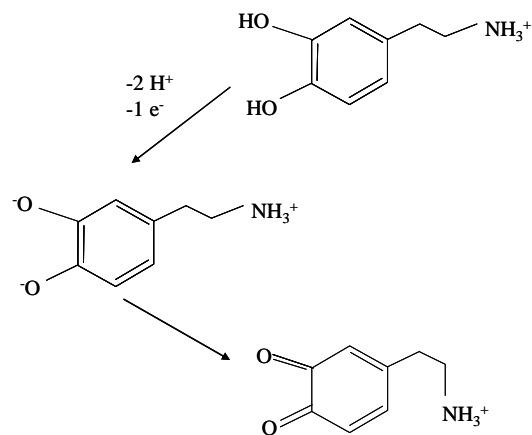


Figura 1.3. Mecanismo de reacción propuesto por Doménech, García [1.28].

Dada la importancia a nivel biológico de la DA y los efectos que puede causar la descomposición de ésta, numerosos estudios se han enfocado a su estudio, sin embargo la mayoría de estos no están encaminados a resolver la problemática por su descomposición, siendo que ésta es un factor que también influye en la determinación del neurotransmisor y su aplicación como fármaco, ya que algunos estudios muestran que esta catecolamina es estable en solución en tiempos menores a 24 hrs. ésto llevó a la preparación de

soluciones de DA cada 24 hrs, sin embargo la interrupción de la infusión durante el cambio, puede resultar en inestabilidad hemodinámica en algunos pacientes con deficiencia renal.

El problema de la descomposición de la DA puede ser tratado si se considera que esta molécula presenta un grupo catecol, por lo que es fácilmente oxidada a una quinona, así lo que se sugiere es estabilizar este grupo a través de la presencia de un agente que no altere su composición ni su función biológica.

Algunas sustancias capaces de estabilizar compuestos lábiles son las ciclodextrinas (CD) por su capacidad para formar complejos de inclusión a través de interacciones débiles entre el huésped (DA) y el anfitrión (CD). Este tipo de macromoléculas presentan estructura cónica y pueden aceptar moléculas tanto orgánicas como inorgánicas, catiónicas, iónicas o neutras, en el interior de su cavidad pueden aceptar moléculas no polares debido a su carácter hidrofóbico.

Dado que la mayoría de las investigaciones están dirigidas hacia la determinación de DA, tanto en fármacos como en muestras biológicas, la determinación de ésta tiene como limitante la presencia de sustancias que interfieren en la respuesta analítica de la DA, tal como es el ácido ascórbico [1.29-1.30], el cual se emplea como antioxidante en fármacos y está presente en los sistemas biológicos.

Por otra parte, el análisis en muestras biológicas como orina [1.31], presenta la limitante de la descomposición de las catecolaminas, por lo que se requiere que la orina tenga un tratamiento especial. Sin embargo se complica cuando se analizan otras sustancias, que necesitan de un tratamiento diferente, o cuando en la matriz existen sustancias con respuesta similar al analito, interfiriendo con la señal de estudio.

La interferencia de otras especies en una matriz compleja, se ha intentado resolver con el uso de los surfactantes, utilizados para mejorar la detección de las catecolaminas por la interferencia con otras especies [1.32] o con la creación de sensores químicos selectivos a



este tipo de compuestos, en este sentido se ha estudiado que la DA puede ser determinada a través de electrodos modificados para evitar algunas interferencias [1.33, 1.34] y aún cuando este tipo de metodologías puedan determinar concentraciones de DA de  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  se requiere técnicas de mayor selectividad y sensibilidad.

#### 1.4. Ácido ascórbico (AA)

El AA es un ácido orgánico, este compuesto es hidrosoluble y posee un efecto antioxidante, el interés en el estudio de este antioxidante es debido a su importancia a nivel biológico, y es que el AA está involucrado en la formación de los tejidos conjuntivos, el transporte iónico y protección de células contra los radicales libres, se ha estudiado que la deficiencia de AA en el cuerpo causa escorbuto [1.35].

Sin embargo, en el ser humano, la vitamina C o AA no puede ser sintetizado, por lo cual debe ingerirse a través de los alimentos.

En 1937, el premio Nobel de química fue concedido a Walter Haworth por su trabajo en la determinación de la estructura del AA (Figura 1.4).

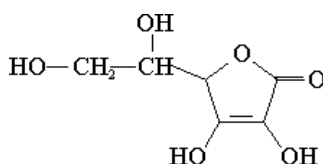


Figura 1.4. Estructura molecular del ácido ascórbico

El ácido ascórbico tiene una estructura de lactona. Este antioxidante es particularmente sensible a las reacciones de oxidación, destruyéndose con gran facilidad durante el procesamiento de los alimentos en presencia de oxígeno. La oxidación es dependiente del pH, ya que la forma ionizada es más sensible que la forma no ionizada. El dianión es todavía más sensible, pero para que se forme en proporciones significativas es necesario un pH alcalino que no suele encontrarse en los alimentos.

La oxidación del AA puede ser producida de forma química, sin la intervención de enzimas, especialmente en presencia de metales como el hierro o el cobre, que actúan como catalizadores, en ausencia total de metales, el ácido ascórbico es relativamente estable, incluso en presencia de oxígeno. Los agentes quelantes son relativamente efectivos frente al cobre, pero no frente al hierro.

El AA puede romperse también en reacciones no oxidativas, especialmente en medio ácido, por apertura del anillo lactónico y posterior descarboxilación, este efecto puede ser importante en productos enlatados, en cualquier caso, a igualdad de temperatura esta reacción es mucho más lenta que la de oxidación.

Por la importancia del AA, el análisis cuantitativo de esta sustancia resulta de gran interés en áreas como química analítica, farmacia, clínica y alimentos, en este sentido técnicas espectrofotométricas [1.36], HPLC [1.37], y amperométricas [1.38] han sido empleadas con el fin de mejorar el método de análisis, sin embargo se sigue en la búsqueda de un método donde la determinación, sea directa, sencilla y en tiempos de análisis cortos.

### 1.5 Azometina-H (Az-H)

La Az-H o base de Schiff pertenece al grupo de los azocompuestos, ésta tiene en su estructura molecular un grupo funcional C=N, es sintetizada a partir del ácido H y de hidroxi-aldehído (figura 1.5).

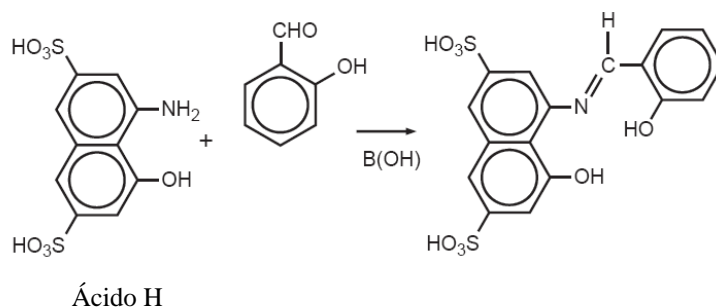


Figura 1.5 Síntesis de la Az-H

El uso de este tipo de compuesto es básicamente como herramienta analítica para la identificación cualitativa o cuantitativa de estructuras morfológicas (histológicas) es de gran importancia en bioquímica, biología y medicina [1.39], además estos compuestos son también utilizados como agentes terapéuticos ya que algunos presentan propiedades antibacterianas [1.40].

Frecuentemente las azometinas son utilizadas como agentes cromóforos [1.41, 1.42] y metalocrómicos, el uso de dichos compuestos depende de las propiedades tanto físicas como UV-Vis, para la determinación de iones metálicos

Por la importancia en la aplicación de este tipo de moléculas, se ha incrementado el interés en conocer su comportamiento químico, es por ello que numerosos trabajos han sido publicados con relación a la determinación de valores de pKa, para bases de Schiff [1.43,-1.44].

En particular el uso de la Az-H es como herramienta analítica principalmente en la determinación espectrofotométrica de micro nutrientes como Boro [1.45-1.46], ya que tiene la capacidad de formar un complejo que puede ser detectado en la región del visible, la determinación de este elemento en plantas y aguas residuales es de gran interés, por lo que la mayoría de las investigaciones se ocupan en el desarrollo de una metodología que permita hacer el análisis con técnicas automatizadas, sin embargo a la fecha existe una gran cantidad de metodologías propuestas para la determinación de boro basado en la formación del complejo Boro-Az-H, todas ellas difieren en las condiciones experimentales, las diferencias primordiales son en la longitud de onda donde se registra el complejo (410 a 420 nm), el pH de formación (pH 5-8), y el tiempo de muestreo (15-40 min), por lo que existe gran controversia, aunado a ello Harp sugiere que no existe tal complejo y que la banda observada es debido a la degradación de la molécula.

Pese a todo este conocimiento no se ha reportado en la literatura el comportamiento espectrofotométrico del complejo Boro-Az-H y mucho menos de la Az-H, a la cual en los

últimos años se le han asociado propiedades contra la malaria [1.47], no obstante, no se tiene reportado ningún trabajo sobre el comportamiento químico de esta molécula,

Para el desarrollo de un método de análisis cualitativo o cuantitativo es importante primero conocer del comportamiento químico del analito de interés (p.ej. DA, AA y Az-H), estudiar sus posibles interferencias, y analizar la posibilidad del uso de agentes de reconocimiento (SDS, CDs) que permitan la selectividad del método, en este contexto se describen los objetivos del trabajo.

## **CAPÍTULO 2.**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo, es el estudio del comportamiento químico de la DA, el AA y la Az-H, el cual permita mejorar la estabilidad y minimizar la degradación de estos compuestos químicos, basado en las interacciones entre el analito y los surfactantes, así como con las ciclodextrinas, es decir en sistemas supramoleculares, además de desarrollar un método analítico para su determinación cuantitativa.

#### **2.1. Hipótesis**

Esto se sustenta en la hipótesis de que, por las características y propiedades que poseen estos agentes, pueden formar complejos y/o a actuar como receptores moleculares capaces de atrapar eficaz y selectivamente un sustrato dado. El uso de las ciclodextrinas y los surfactantes permite que la reactividad de la molécula incluida disminuya y se estabilice; la formación de los sistemas supramoleculares (DA-SDS, AA-SDS, DA- $\beta$ -CD, AA-  $\beta$ -CD, Az-H-  $\beta$ -CD) permitirá incrementar la selectividad y la sensibilidad del método.

#### **2.2 Objetivos Generales**

- Caracterizar el comportamiento espectrofotométrico de la DA y Az-H.
- Determinar las constantes de acidez de la DA, AA y Az-H.
- Determinar el orden de desprotonación de la DA.
- Caracterizar el comportamiento electroquímico de DA.
- Estudiar la interacción de DA y AA con  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) por espectrofotometría UV-Vis y voltamperometría cíclica.
- Estudiar la interacción de DA con el surfactante dodecilsulfato de sodio (SDS).
- Desarrollar un método cuantitativo para la determinación de DA y AA.

#### **2.3. Objetivos Particulares**

- Estudiar la estabilidad de la DA y Az-H asociada a factores como luz y oxígeno.
- Formar los complejos de inclusión de DA/ $\beta$ -CD y AA/ $\beta$ -CD.
- Cálculo de las constantes de los complejos de inclusión de DA/ $\beta$ -CD y AA/ $\beta$ -CD.
- Analizar el efecto de la concentración de  $\beta$ -CD sobre el comportamiento electroquímico de DA.
- Analizar el efecto de la concentración de SDS sobre el comportamiento electroquímico de DA.
- Construir un sensor electroquímico basado en sistemas supramoleculares para la detección de DA.
- Construir un sensor electroquímico basado en sistemas supramoleculares para la detección de AA.
- Eliminar la interferencia del AA, usando los sistemas supramoleculares  $\beta$ -CD y SDS para la cuantificación de DA.
- Construir un sensor electroquímico basado en sistemas supramoleculares para el estudio electroquímico de Az-H.

## CAPÍTULO 3.

### ESTABILIDAD DE LA DOPAMINA Y DETERMINACIÓN DE SUS CONSTANTES DE ACIDEZ

#### 3.1. Introducción.

Las catecolaminas son aminas bioenergéticas que juegan un papel importante como neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC). Como parte de estos neurotransmisores se encuentra la dopamina (3-4 dihidroxifeniletilamina, DA). Debido a su estructura molecular, es sensible al aire y a la luz, ya que el grupo catecol es fácilmente oxidable a una quinona [3.1]

Por su estructura molecular la DA, puede presentar tres constantes de acidez asociadas a la desprotonación del grupo fenol y del amino. El cálculo de dichas constantes no es una tarea fácil, como lo reporta Martin [3.2], ya que la acidez entre los grupos de la estructura es similar, por lo que la desprotonación ocurre en la misma región de pH, haciendo que el cálculo sea difícil, lo que significa que las técnicas potenciométricas, comúnmente utilizadas, no son idóneas para la determinación de estas constantes.

Sin embargo, para otros neurotransmisores, las constantes de acidez han sido calculadas por titulaciones potenciométricas y espectrofotométricas [3.3-3.8], Kiss calcula y reporta tres valores de pKa para la DA, mientras que Zelano [3.4], Sedeh [3.3] y Rajan [3.5] reportan sólo dos, esta contradicción, es atribuida a la tercera desprotonación, asociada con el grupo fenol, la cual no puede ser determinada potenciométricamente. Algunos autores reportan el valor en cuestión, por ejemplo Kiss [3.6] y Gerard [3.7] mencionan las dificultades para calcular la constante principalmente debido a la proximidad entre los valores.

Por otra parte los investigadores reportan condiciones experimentales donde controlan temperatura, fuerza iónica, atmósfera de nitrógeno (Kiss), sin embargo sólo Gerard considera el efecto de la oxidación de la molécula por la luz, y controla el sistema cubriéndolo de la luz.

Considerando lo anterior, se puede relacionar que las condiciones experimentales donde la molécula está expuesta a la luz y oxígeno, pueden afectar la estabilidad de la DA y la determinación de sus constantes de acidez, es por ello que en este capítulo se estudia el efecto de la luz y del oxígeno sobre el comportamiento de la DA y la determinación de sus constantes de acidez, además estas constantes, se evalúan empleando dos metodologías: una titulación espectrofotométrica y la segunda usando un análisis punto por punto, la cual requiere preparar soluciones frescas de DA para cada valor de pH para obtener el espectro de absorción.

### **3.2. Determinación de las constantes de acidez de la DA por titulación espectroscópica.**

La titulación espectroscópica fue usada para determinar las constantes de acidez de la DA, el método (Apéndice A) se realizó preparando una solución de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M en medio ácido para la titulación, controlando el tiempo de muestreo y de  $1.25 \times 10^{-4}$  M para la titulación sin controlar el tiempo, ésta se tituló con una solución de NaOH en el intervalo de pH de 2.00 a 12.99, los espectros de absorción fueron tomados en el intervalo de 220 a 660 nm a una velocidad de barrido de  $960 \text{ nm min}^{-1}$ .

La figura 3.1 muestra los espectros de absorción de la DA obtenidos a partir de una titulación espectrofotométrica donde el espectro fue tomado una vez que el valor de pH permaneció constante (figura 3.1.a) y controlando el tiempo de muestreo (figura 3.1.b), en ambos experimentos se puede observar que a valores de pH ácido, la DA presenta una banda de absorción cuyo máximo se ubica en 279 nm, ésta permanece constante hasta un pH de 7.8, a partir de este valor y a medida que se incrementa el pH se observa un desplazamiento batocrómico (295 nm) y un efecto hipercrómico.



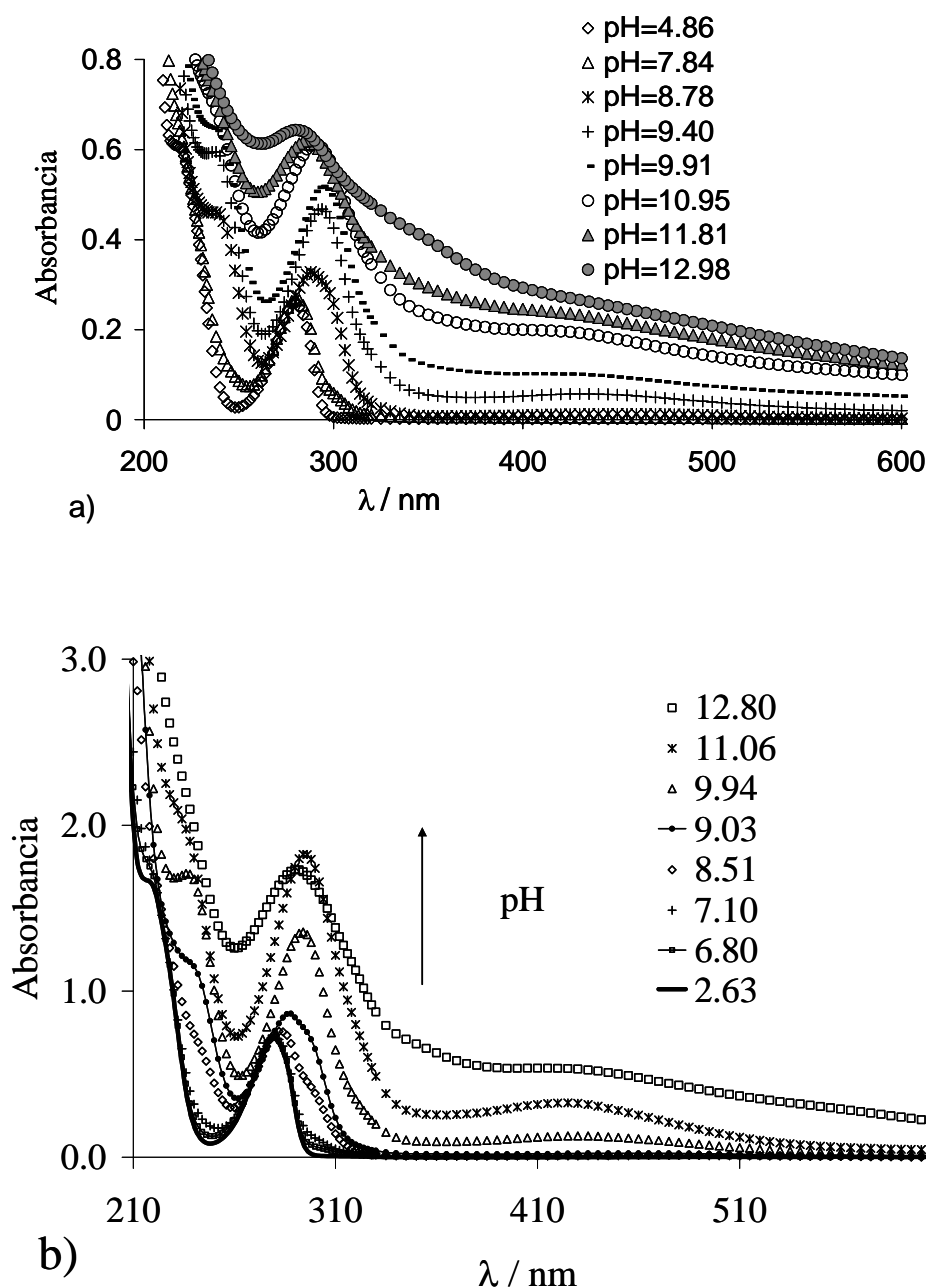
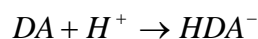
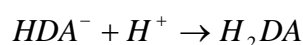
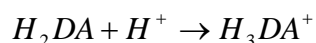


Figura 3.1. Espectros de absorción a diferentes valores de pH en medio de fosfatos a partir de una titulación espectrofotométrica a) DA  $1.25 \times 10^{-4}$  M titulación al equilibrio y b) DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M controlando el tiempo de muestreo

A partir de pH 8.51, la banda de 279 nm presenta un hombro, indicativo de la formación de otra especie, a medida que se incrementa el valor en el pH, la contribución de esta especie nueva es mayor, de tal forma que a pH 9.0 se tiene el máximo de absorción en 295 nm, esta banda es la contribución de las dos especies presentes en solución, al mismo tiempo se tiene la formación de especies oxidadas, esto se observa en la región del visible con la formación de una banda en 421 nm, estas dos últimas bandas presentan un efecto hipercrómico, sin embargo cuando se ha llegado a pH mayor a

12.50, la contribución de las especies oxidadas es mayor. Con este análisis es posible observar que las especies de DA son más estables a pH ácido que pH neutro y básico. Al comparar los resultados entre las dos titulaciones se observa en la titulación al equilibrio en un valor de pH 9.9 (figura 3.1a), se tiene no solo la formación de las especies oxidadas sino también la posible existencia de un precipitado, el desplazamiento de la línea base es un indicativo, este comportamiento no sucede con la titulación controlando el tiempo de muestreo (figura 3.1a), lo que sugiere que el tiempo de análisis es determinante en la formación de las especies.

Para el cálculo de las constantes de acidez, se utilizaron los espectros obtenidos a cada valor de pH y el programa computacional SQUAD (Stability Quotients from Absorbance Data) [3.9], este programa además requiere de un modelo químico que describa los equilibrios ácido base, en este sentido y con base en lo reportado se propusieron los siguientes equilibrios:



**Esquema 3.1. Equilibrios ácido-base asociados a la DA.**

Los tres equilibrios descritos en el esquema 3.1, fueron considerados para el cálculo por SQUAD, la tabla 3.1 muestra los valores refinados por el programa, y son comparados con los reportados en la literatura, es posible notar que Zelano, Sedeh, y Rajan sólo reportan 2 valores de pKa, mientras Kiss, Gerard y Grgas-Kuznar reportan tres valores, lo que indica la discrepancia entre los resultados y los valores de pKa, sobre todo para la tercer desprotonación, esto puede ser asociado con la metodología empleada y las condiciones experimentales, este último factor es relevante ya que todos los autores trabajan a fuerza iónica constante, atmósfera de nitrógeno y a 25°C a excepción de Grgas-Kuznar quien trabaja a 20°C, el factor importante es el intervalo de pH pues los tres primeros autores, quienes no calculan el valor de pKa<sub>3</sub> sólo llegan a pH < 10 mientras que Kiss, Gerard y Grgas-Kuznar llegan a pH tan básico, que es posible determinar la tercer constante, sin embargo cabe señalar, que sólo estos dos últimos investigadores consideran el efecto de la luz sobre el sistema, este factor es importante pues como es sabido las catecolaminas pueden oxidarse a quinonas en presencia de luz,

lo que indica que los valores de pKa reportados, no sólo están asociados con equilibrios ácido base, sino que pueden estar afectados por equilibrios redox.

Las constantes calculadas en este trabajo por titulación ácido base son comparables y se encuentran dentro de lo reportado en la literatura, sin embargo, también están afectadas por la presencia de equilibrios redox, una evidencia es la formación de la banda en la región del visible, la cual es asociada con la presencia de especies oxidadas.

**Tabla 3.1. Constantes de acidez de las especies DA**

Referencia	pKa <sub>1</sub> H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup>	pKa <sub>2</sub> H <sub>2</sub> DA	pKa <sub>3</sub> HDA <sup>-</sup>
V. Zelano [3.4]	8.88	10.41	
I.F. Sedeh [3.3]	8.93	10.49	
K. Rajan [3.5]	8.96	10.5	
T. Kiss [3.6]	8.89 ± 0.01	10.42 ± 0.01	13.19 ± 0.02
C. Gerard [3.7]	9.05	10.55	12.81
B. Grgas-Kuznar [3.8]	9.069 ± 0.01	10.69 ± 0.01	12.06 ± 0.01
Titulación espectrofotométrica*	8.61 ± 0.03	9.95 ± 0.03	12.04 ± 0.02
Titulación espectrofotométrica con tiempo controlado**	8.75 ± 0.01	10.34 ± 0.01	12.500 ± 0.008

\*Se alimentaron 24 espectros de absorción cada uno con 48 longitudes de onda al programa computacional SQUAD, la desviación estándar fue de  $\sigma=6.43 \times 10^{-3}$ ,  $U=3.33 \times 10^{-5}$

\*\*Se alimentaron 24 espectros de absorción cada uno con 50 longitudes de onda al programa computacional SQUAD, la desviación estándar fue de  $\sigma=4.22 \times 10^{-2}$ ,  $U=1.15 \times 10^{-3}$

Por esta razón, es importante estudiar el efecto de la luz y del oxígeno sobre las diferentes especies de la DA, los cambios pueden ser estudiados en función del tiempo y evaluados para diseñar una metodología que ayude a la determinar los valores de pKa que únicamente incluyan las especies ácido base.

### 3.3. Estudio de la estabilidad de la DA.

Para estudiar el efecto de la luz y del oxígeno sobre el comportamiento químico de la DA, se llevó a cabo un experimento (Apéndice A) donde el sistema fue expuesto a la luz, y para eliminar el efecto del oxígeno el sistema fue burbujeado y mantenido con atmósfera de nitrógeno. El estudio se llevó a cabo en función del tiempo, es decir, se obtuvieron los espectros de absorción a diferentes tiempos de muestreo, esto con el fin

de determinar la estabilidad de la DA, para ello se tomaron los espectros de absorción durante 30 min a tres valores de pH 3.0, 9.0 y 12.0.

### 3.4. Estudio de estabilidad de DA a pH 3.0

#### 3.4.1. Sistema expuesto a la luz.

El comportamiento espectrofotométrico muestra una banda en 280 nm, no se observa ningún cambio notable, es decir el máximo se ubica a la misma longitud de onda ( $\lambda$ ) y el incremento en absorbancia es menor al 10% respecto al valor inicial durante la experimentación; sin embargo, en el sistema con oxígeno (figura 3.2a), la  $A^{280\text{nm}}_{t=0} = 0.8575$ , mientras que en el sistema con atmósfera de nitrógeno (figura 3.2b)  $A^{280\text{nm}}_{t=0} = 0.6778$ , lo que corresponde a un 21% en el incremento en la señal de DA con oxígeno, indicando que la señal obtenida puede ser una mezcla de DA y especies oxidadas, formadas debido a la presencia de oxígeno presente en solución. Además durante los primeros 15 min hay un incremento del 1.64% para el sistema con oxígeno (figura 3.2.a), mientras que el sistema con atmósfera de nitrógeno tiene un incremento del 0.79%, lo que indica que la DA ambos sistemas permanecen estables durante 15min.

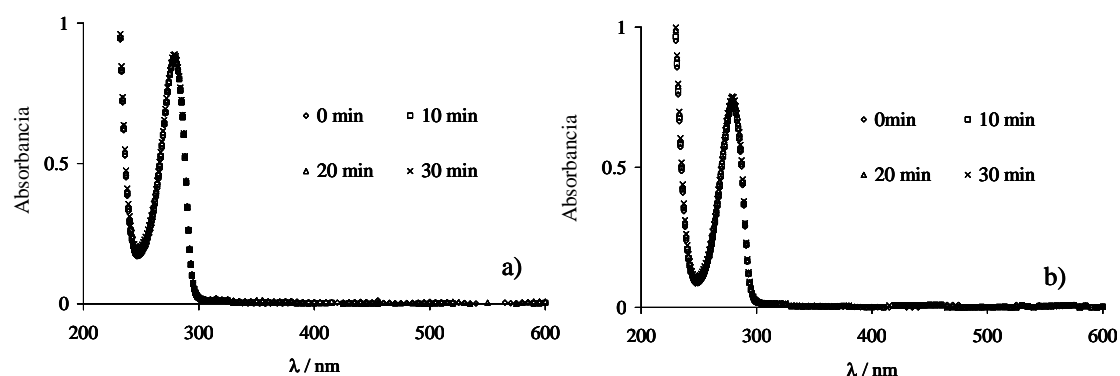
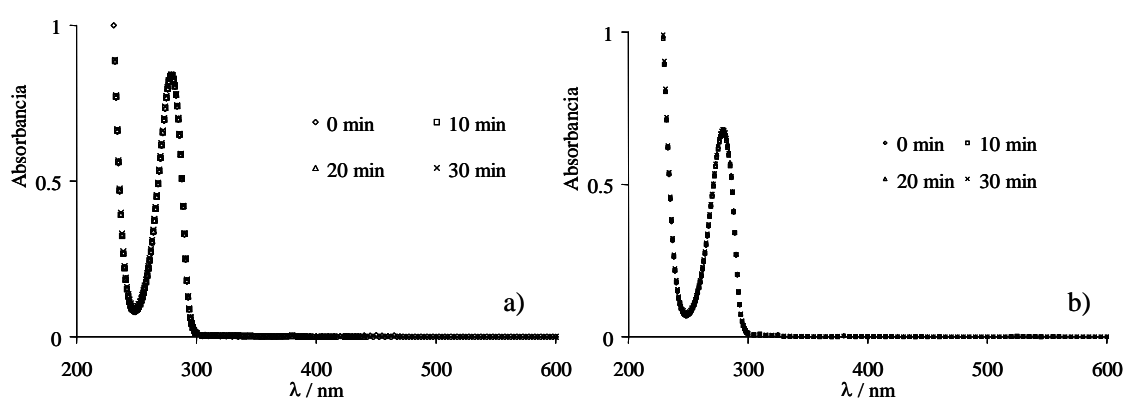


Figura 3.2. Comportamiento espectrofotométrico de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M, solución expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 3.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.

#### 3.4.2 Sistema no expuesto a la luz.

La figura 3.3, muestra los espectros de absorción de la DA, obtenidos con la exposición a la luz, con oxígeno y atmósfera de nitrógeno a pH 3.0, los espectros obtenidos

nuevamente muestran la banda de absorción en 280 nm, y no se observa ningún cambio significativo durante la experimentación ya que la banda de absorción se mantiene a la misma longitud de onda. Para el sistema con oxígeno (figura 3.3a) la  $A^{280\text{nm}}_{t=0} = 0.8234$ , mientras que el sistema con atmósfera de nitrógeno (figura 3.3b) la  $A^{280\text{nm}}_{t=0} = 0.6416$ , esto es equivalente a un incremento del 22% de la señal de DA en el sistema con oxígeno, un comportamiento similar antes mencionado. También se observa que durante los primeros 15 min, el incremento es del 0.57% para el sistema mostrado en la figura 3.3a y para el sistema de la figura 3.3b es el 0.37%, estos valores comparados con el cambio obtenido en los sistemas anteriores son mas pequeños lo que indica que en ausencia de luz la DA es más estable.



**Figura 3.3. Comportamiento espectrofotométrico de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M, solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 3.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.**

La comparación entre los sistemas con luz y sin luz, indica que la absorbancia de la banda en 280 nm, presenta una disminución del 3.9%, para el sistema con oxígeno, mientras que con atmósfera nitrógeno fue del 5%. Los resultados a pH 3.0, muestran que el efecto del oxígeno es del 20% sobre la estabilidad de la DA, este efecto es mayor que el producido por la exposición a la luz (5%), sin embargo este factor también afecta la estabilidad de la molécula, los cambios de la DA en el transcurso de 15 min no son significativos, pues el único cambio observado durante este tiempo, es el incremento en absorbancia, el cual es menor al 10% con respecto a la absorbancia inicial, sin embargo el efecto se observa sobre la respuesta inicial al comparar la respuesta con oxígeno y nitrógeno, donde evidentemente es mayor el valor de la absorbancia.

### 3.5 Estudio de estabilidad de la DA a pH 9.0

#### 3.5.1 Sistema expuesto a la luz

Los espectros de absorción de la DA a diferentes tiempos, que resultaron del sistema con la exposición de la luz, con oxígeno y atmósfera de nitrógeno a pH 9.0, se presentan en la figura 3.4. Los espectros muestran una banda de absorción en 283 nm, que conforme el tiempo transcurre, se forma una banda en 435 nm. En el caso con oxígeno (figura 3.4a), revela una  $A^{283\text{nm}}_{t=0} = 0.8835$ , mientras que con atmósfera de nitrógeno  $A^{283\text{nm}}_{t=0} = 0.7992$ , lo cual implica un incremento del 9% en la señal de DA con oxígeno. Los cambios en absorbancia en función del tiempo fueron evaluados para ambas bandas, se encontró que el sistema con oxígeno presenta un incremento del 6.04% respecto a su valor inicial figura 3.4a, mientras que el sistema con nitrógeno presenta solo un incremento del 1.76% para el sistema de la figura 3.4b, los resultados muestran que la DA, en este sistema tiene una variación mayor con respecto al pH 3.0, y que el efecto del oxígeno es significativo, en el incremento de la absorbancia en la banda de 283 nm y la formación de la banda en 435 nm, ya que para el caso en presencia de oxígeno la absorbancia sobre la banda 453 nm, es el doble que en atmósfera de nitrógeno, generándose el inicio de las especies oxidadas.

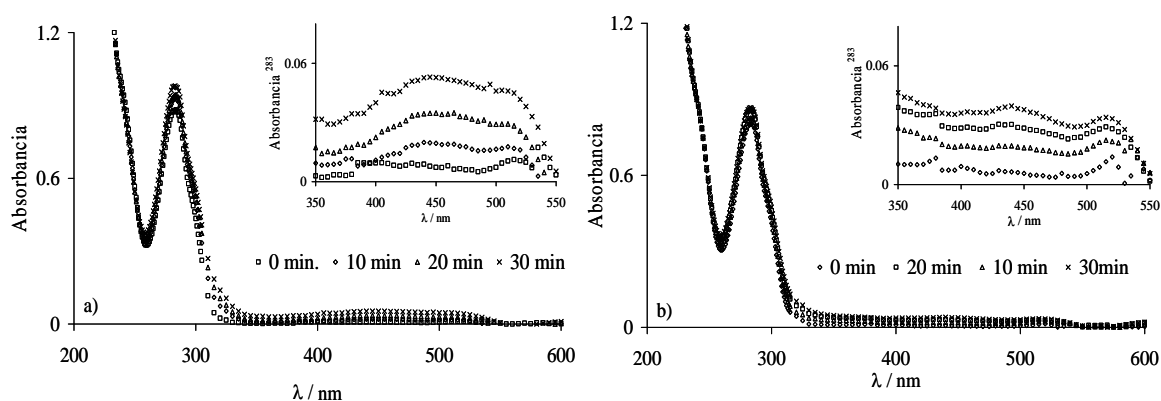
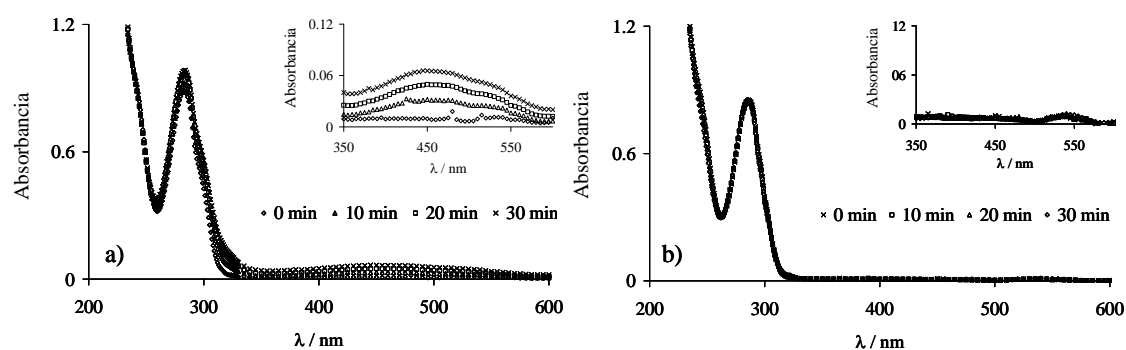


Figura 3.4. Comportamiento espectrofotométrico de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M solución expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 9.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.

#### 3.5.2 Sistema no expuesto a la luz

La figura 3.5, muestra los espectros de absorción de la DA sin exposición a la luz, con oxígeno y en atmósfera de nitrógeno a pH 9.0, una vez más el espectro muestra una

banda de absorción en 283 nm, al igual que en estudio anterior se forma una banda en 435nm a medida que transcurre el tiempo, pero esto sólo ocurre en el sistema con oxígeno, para este sistema (figura 3.5a) la  $A^{283\text{nm}}_{t=0} = 0.8774$ , para el sistema con atmósfera de nitrógeno (figura 3.5b)  $A^{283\text{nm}}_{t=0} = 0.8454$ , esto es equivalente al incremento en la señal de DA de 3% en el sistema con oxígeno, el cual es atribuido a la eliminación del efecto de la luz que causa el decremento en absorbancia comparado con mismo sistema del estudio previo, además se observa que en el lapso del tiempo el  $\Delta A^{283}_{(t=15- t=0)} = 0.0319$  y el  $\Delta A^{435}_{(t=15- t=0)} = 0.0012$  para el sistema de figura 3.5a, mientras que para el sistema con atmósfera de nitrógeno (figura 3.5b)  $\Delta A^{283}_{(t=15- t=0)} = 0.0097$ , cabe señalar que no se forma la banda en 435 nm durante toda la experimentación.



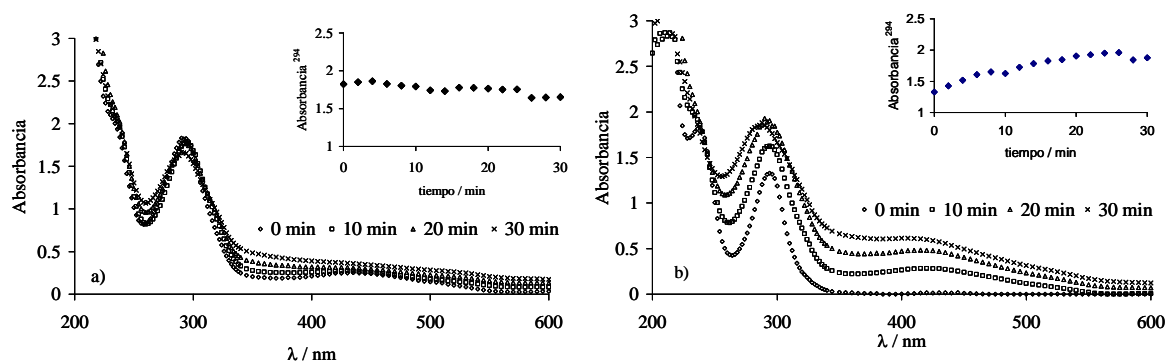
**Figura 3.5. Comportamiento espectrofotométrico de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M, solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 9.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.**

La comparación entre los sistemas con la exposición y sin exposición a la luz indica una disminución en la absorbancia del 0.69% para el sistema con oxígeno, pero para el sistema con atmósfera de nitrógeno la disminución fue del 5.46%, lo que indica que la DA es más estable con atmósfera de nitrógeno y sin luz, en este sistema no existe la formación de ninguna banda en el visible y la banda en 283 nm permanece sin cambios durante 15min, por lo que se infiere que la DA es estable en este periodo de tiempo.

### 3.6 Estudio de estabilidad de la DA a pH 12.0

#### 3.6.1 Sistema expuesto a la luz

En la figura 3.6, se muestran los espectros de absorción, obtenidos del sistema expuesto a la luz con oxígeno y atmósfera de nitrógeno a pH 12.0, los espectros para estos sistemas muestran una banda de absorción en 294 nm, la cual en ambos casos incrementa en absorbancia durante la experimentación, para el sistema con oxígeno (figura 3.6a)  $A^{294\text{nm}}_{t=0} = 1.76$  mientras que para el otro sistema es de 1.33 (figura 3.6b), lo que implica un 32% en el incremento de la banda con atmósfera de oxígeno. El análisis del comportamiento de la banda durante los primeros 15min, mostró que el  $\Delta A^{283}_{(t=15-t=0)} = 0.098$  para el caso con oxígeno, para el sistema mostrado en la figura 3.6b,  $\Delta A^{283}_{(t=15-t=0)} = 0.46$ . Además los sistemas mostraron la formación de una banda en 435 nm, ésta evoluciona en función del tiempo, pero en el caso del sistema con atmósfera de nitrógeno la banda aparece después de 2min, el análisis sobre esta banda con respecto al tiempo indica que  $\Delta A^{435}_{(t=30-t=0)} = 0.10$ , para el caso con oxígeno, mientras que  $\Delta A^{435}_{(t=30-t=0)} = 0.70$ , es pertinente considerar que la diferencia es mayor en este último sistema debido a que la banda en 435 nm no existe al  $t=0$  min.



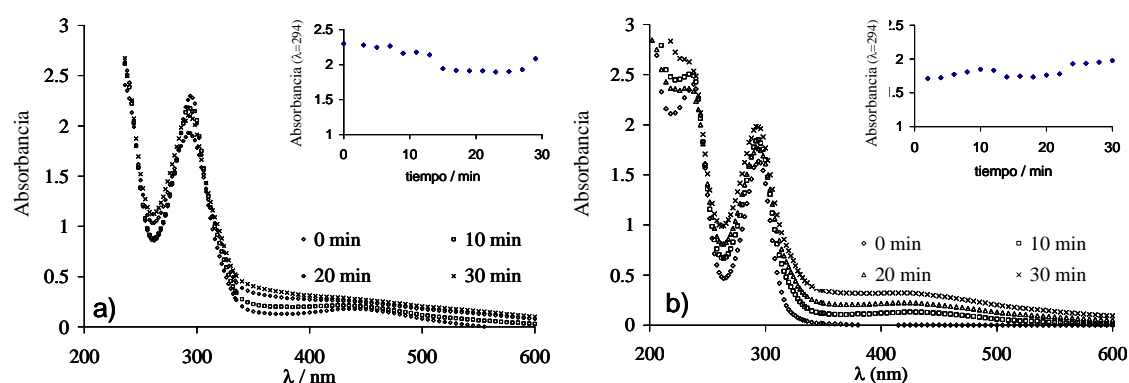
**Figura 3.6. Comportamiento espectrofotométrico de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 12.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.**

Los resultados revelan la influencia del oxígeno sobre el comportamiento de la DA, ya que la formación de la banda en 435nm es inmediata, cabe mencionar que existe un desplazamiento hipsocrómico lo cual indica que no solo se tiene la especie de DA, sino la contribución de las especies oxidadas.



### 3.6.2 Sistema no expuesto a la luz

Para ambos sistemas no expuestos a la luz, el espectro de absorción muestra una banda en 291 nm (figura 3.7), en el sistema con oxígeno la  $A^{291\text{nm}}_{t=0} = 2.30$ , y para el sistema con atmósfera de nitrógeno  $A^{294\text{nm}}_{t=0} = 1.60$ , lo cual indica un incremento en la banda del 30% en presencia de oxígeno. El análisis sobre la banda de absorción durante los primeros 15 min mostró un  $\Delta A^{291}_{(t=15- t=0)} = 0.19$  correspondiente al caso con oxígeno (figura 3.7a), mientras que el caso con atmósfera de nitrógeno  $\Delta A^{291}_{(t=15- t=0)} = 0.398$ . Una vez más la banda en 435 nm se presenta en ambos casos y evoluciona en función del tiempo, y se registra desde el inicio sólo para el sistema con oxígeno, mientras que el otro sistema (figura 3.7b) aparece después de 4min de iniciado el experimento. El análisis de la banda en función del tiempo indica que el sistema con oxígeno presenta un  $\Delta A^{435}_{(t=15- t=0)} = 0.3$ , y para el sistema con atmósfera de nitrógeno  $\Delta A^{435}_{(t=15- t=0)} = 0.6$ , hay que recordar que esta diferencia es mayor debido a que la banda no se presenta desde el inicio de la experimentación.



**Figura 3.7.** Comportamiento espectrofotométrico de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M solución no expuesta a la luz en medio de fosfatos 0.01 M a pH 12.0 a) sistema con oxígeno y b) sistema con atmósfera de nitrógeno.

La comparación entre el sistema expuesto y no expuesto a la luz indica un 23.4% en la disminución al  $t=0$  para los sistemas con oxígeno, y del 17.5% para los sistemas con atmósfera de nitrógeno, este comportamiento es debido a la presencia de la banda en 435 nm.

Los resultados anteriores revelan que el efecto de la luz es del 17.5% tiene una gran influencia sobre el comportamiento de la DA a pH 12.0, A partir de los resultados es posible inferir que la exposición de la DA a la luz y la presencia de oxígeno influyen

sobre el comportamiento espectrofotométrico de la DA. Los experimentos realizados a pH 3.0 y 9.0 mostraron que la magnitud de la absorbancia es mayor cuando el sistema está en presencia de oxígeno. Hay que resaltar que la DA evoluciona en solución, y que cuando el pH se incrementa se presenta un efecto batocrómico, desplazando la banda de absorción de 280 nm, además aparece una nueva banda en 435nm. Para valores cercanos a pH 12, y aún cuando el sistema no está expuesto a la luz y en atmósfera de nitrógeno la DA permanece estable sólo en los primeros minutos.

A partir de los resultados obtenidos, se encontró que factores como el oxígeno, la luz y el tiempo de análisis son determinantes en la evolución de la DA, por lo que, para la determinación de las constantes de acidez es necesario llevar a cabo el análisis punto por punto, donde se controlan los factores antes mencionados y así se asegura que los cambios que sufre la molécula observados espectralmente, sean únicamente debido al cambio en el pH y no estén asociados con la formación de otras especies de DA.

### **3.7. Determinación de las constantes de acidez de la DA por análisis punto por punto**

La determinación de las constantes se llevó a cabo usando el análisis punto por punto, éste consiste en la preparación de soluciones frescas de DA para cada experimento a cada valor de pH. Para este estudio se utilizó el amortiguador de fosfatos y se mantuvo la fuerza iónica constante. Dado que el estudio previo mostró que la luz y el oxígeno afectan la estabilidad de la DA, el sistema estudiado fue protegido de estos agentes, el intervalo de pH fue de pH 2.0 a 12.9, debido a que el valor de la tercer constante se encuentra alrededor de pH 12.0, por esta razón y considerando que la DA a este pH permanece estable durante 4 min, fue necesario diseñar un método experimental que permitiera realizar la medición en el tiempo donde la DA es estable, para poder llevar a cabo lo anterior, se acopló un sistema análisis en flujo continuo (FIA), los espectros fueron corridos de 200 a 600nm a velocidad de barrido de 1920nm min.<sup>-1</sup>. Para minimizar el tiempo de muestreo, se llevó un control estricto en cada paso de la experimentación, desde el momento en que la solución de DA está en contacto con la solución de amortiguadora hasta que el espectro es obtenido. El experimento requirió que la muestra de DA fuera preparada a diferentes valores de pH y correr el espectro para cada valor.

La familia de espectros obtenidos para este análisis se muestra en la figura 3.8, en el intervalo de pH de 2.3 a 12.8. En la zona de pH ácido la DA presenta una banda de absorción de 279 nm, la cual permanece constante hasta un pH de 7.9, después de este valor hay un incremento en absorbancia y un desplazamiento batocrómico. A partir de pH 8.0 aparece un pequeño hombro en 238 nm, el cual evoluciona con el incremento del pH, hasta llegar a ser una banda bien definida a pH 12.86. Cabe señalar que no se presenta ninguna banda en el visible.

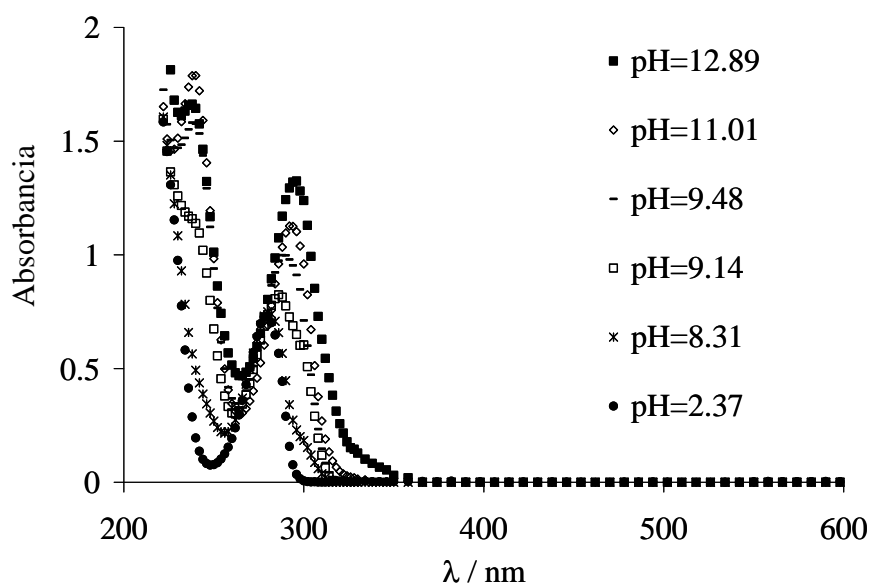


Figura 3.8. Espectros de absorción de una solución de DA  $2.8 \times 10^{-4}$  M, a diferentes valores de pH, en medio de fosfatos, usando el método de análisis punto por punto.

Las constantes de acidez fueron obtenidas usando los espectros del análisis punto por punto empleando el programa computacional SQUAD [3.9]. La tabla 3.2, muestra los valores calculados de pKa para la DA.

Tabla 3.2. Constantes de acidez de la DA, obtenidas con el análisis punto por punto.

DA	
*pKa <sub>1</sub> (H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup> )	9.046 ± 0.1472
*pKa <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> DA)	10.579 ± 0.1479
*pKa <sub>3</sub> (HDA <sup>-</sup> )	12.071 ± 0.0690

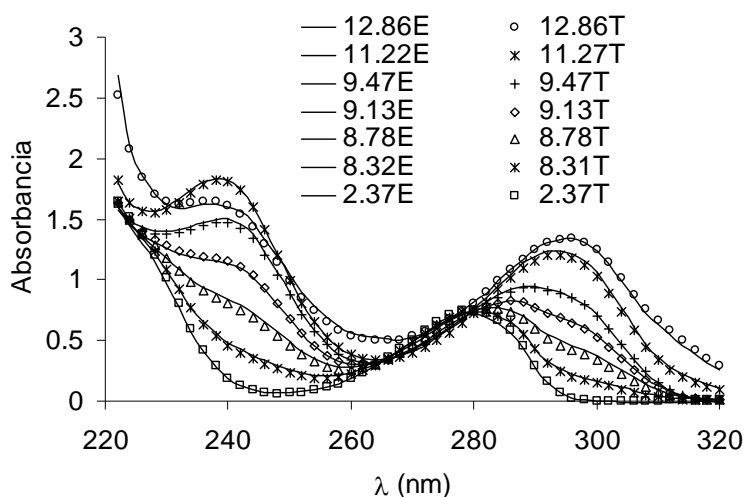
\*Se alimentaron 24 espectros de absorción cada uno con 50 longitudes de onda al programa computacional SQUAD, la desviación estándar fue de  $\sigma=4.22 \times 10^{-2}$ ,  $U=1.15 \times 10^{-3}$

Haciendo la comparación del comportamiento espectrofotométrico de la titulación ácido base con el análisis punto por punto, es evidente la formación de la banda en el visible además del desplazamiento de la línea base cuando se hace la titulación, lo que no ocurre con el otro método, esto se ve reflejado en el valor de las constantes.

Es importante mencionar, que el incremento en la desviación estándar de las constantes de acidez, obtenidas por el análisis punto por punto, es debido al ruido producido por el uso de la bomba peristáltica del sistema de análisis en flujo continuo (FIA).

Comparando los valores de las primeras dos constantes obtenidas con el análisis punto por punto contra las reportadas en la literatura, es claro que existe una equivalencia, con lo reportado por Gerard [3.7] y Grgas-Kuznar [3.8], quizá debido a que ellos consideran el efecto de la exposición a la luz sobre la DA, sin embargo no mencionan el efecto cinético. La tercer constante presenta una diferencia marcada respecto a la reportada por Kiss [3.6] Gerard [3.7], esto puede ser atribuido a la pobre estabilidad de la molécula en esta región de pH, lo que afectaría en el caso de las titulaciones. A pesar de que Gerard controlan el efecto de la luz y la presencia de oxígeno en el sistema, no se controló el tiempo de análisis, lo cual podría influir en su cálculo.

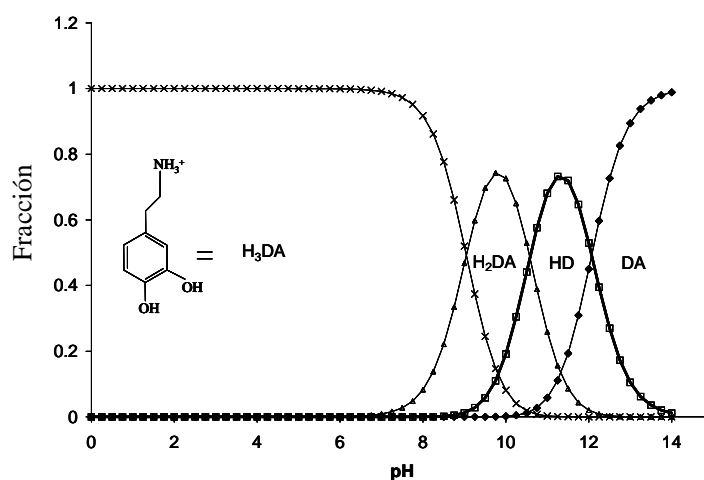
Con el fin de evidenciar la precisión de los cálculos, se realizó la simulación de los espectros experimentales a partir de las constantes de acidez obtenidos, la simulación se realizó para diferentes valores de pH (figura 3.9).



**Figura 3.9. Simulación de los espectros experimentales para diferentes valores de pH, obtenidos a partir de las constantes de acidez calculadas.**

La simulación mostró que los espectros teóricos se ajustan a los datos experimentales, por lo que el modelo químico y las constantes obtenidas representan correctamente el comportamiento experimental de la DA.

A partir de las constantes de equilibrio calculadas fue posible hacer el diagrama de distribución de especies de DA (figura 3.10).



**Figura 3.10. Diagrama de distribución de especies de DA en función del pH**

Después de obtener la constante de acidez de la DA, el siguiente paso es asignar cada constante a los protones ácidos de la molécula, lo que se presenta en el siguiente capítulo.

### 3.8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se pone en evidencia la necesidad del control de diferentes variables experimentales para la determinación de las constantes de acidez, con este hallazgo fue posible calcular las constantes de acidez de DA con la seguridad de que sólo están involucrados equilibrios ácido base, y se elimina la participación de productos de descomposición.

Así, los estudios realizados mostraron que la presencia del oxígeno favorece la oxidación del neurotransmisor, mientras que la exposición a la luz afecta la estabilidad de DA, por lo que ambos factores tienen un efecto importante sobre todo cuando el pH incrementa.

Lo que sugiere que las determinaciones de las constantes de acidez evaluadas empleando titulaciones potenciométricas o espectrofotométricas pueden no corresponder a DA, sino a especies químicas generadas en solución.

## CAPÍTULO 4.

### MECANISMO DE DESPROTONACIÓN DE LA DA

#### 4.1. Introducción

Por su valor a nivel biológico [4.1], la puesta en práctica de los métodos analíticos sobre la DA, intentan proporcionar mayor certeza en la determinación de la concentración de ésta, por lo que la determinación se debe basar en la comprensión del comportamiento químico de la DA más clara, por ejemplo en solución acuosa donde el pH es un factor importante [4.2-4.5].

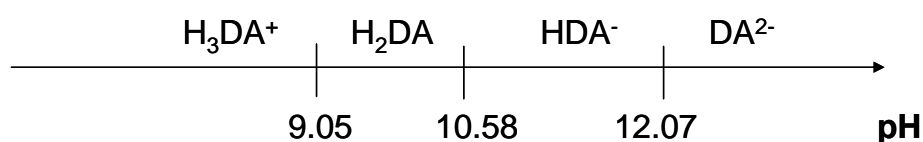
Dada la importancia de establecer adecuadamente las estructuras químicas de la DA a diferentes valores de pH, varios trabajos han sido publicados los cuales se han enfocado sobre la determinación de las constantes de acidez pKa, tabla 4.1. Estas determinaciones han sido llevadas a cabo a través de potenciometría ácido-base o titulaciones espectrofotométricas.

**Tabla 4.1. Valores de las constantes de acidez de la DA reportadas en la literatura**

Referencias	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>
Determinación puntual capítulo 3	9.05	10.58	12.07
Gerard y Chehhal [4.6]	9.05	10.55	12.81
Sedeh y Ohman [4.7]	8.93	10.49	-
Kiss y Martin [4.8]	8.01	12.37	13.7
Kiss y Gergely [4.9]	8.89	10.41	13.1
Kuznar y Weber [4.10]	9.06	10.6	12.05

Como se puede observar la tabla 4.1 muestra diferentes valores de pKa reportados, éstos pueden ser atribuidos a las condiciones experimentales utilizadas para evaluar las

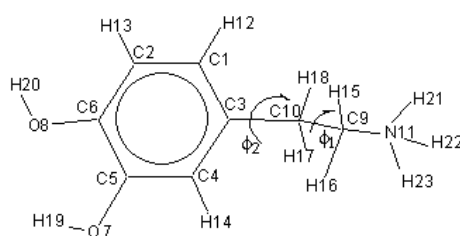
constantes. Sin embargo, la determinación realizada en este trabajo (capítulo 3.) donde los parámetros experimentales han sido controlados sugiere que los valores obtenidos son debidos, únicamente al cambio en el pH de la solución. Partiendo de este conocimiento es posible construir el diagrama de zonas de predominio (DZP) como una función del pH (figura 4.1).



**Figura 4.1 DZP de las especies de DA construido a partir de los valores de pKa obtenidos a partir del análisis punto por punto.**

A partir del DZP figura 4.1 se puede notar que existen 4 regiones de pH donde cada especie de DA en solución puede predominar. Las especies formadas son la DA completamente protonada  $H_3DA^+$  o catiónica, la especie neutra  $H_2DA$ , la especie aniónica  $HDA^-$ , y la especie completamente desprotonada  $DA^{2-}$ .

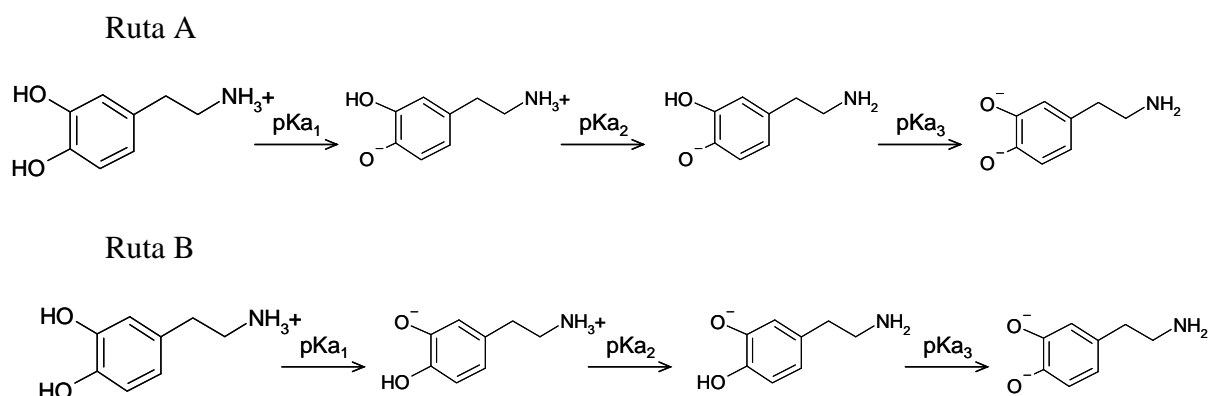
La estructura molecular de la DA se muestra en la figura 4.2, ésta representa la molécula completamente protonada, la estructura consta de un grupo catecol y un grupo amino,  $H_3DA^+$ , es la especie presente a pH fisiológico [4.4], como puede verse en el DZP (figura 4.1), donde se muestra que la especie aniónica predomina hasta  $pH = 9.05$ , sin embargo cuando el pH incrementa, la pérdida de protones puede seguir diferentes mecanismos de desprotonación, lo cual hace complicado la asignación de las estructuras con un valor particular de pKa. Cabe resaltar que en la figura 4.2, se muestran también la numeración de los carbonos e hidrogenos que se utilizarán en este capítulo.



**Figura 4.2. Representación esquemática y asignación de números a los átomos de la molécula de  $H_3DA^+$ . Ángulos diedros  $\phi_1$  y  $\phi_2$ .**



En este sentido Kiss y Martin [4.8] propusieron que la primer desprotonación ocurre sobre alguno de los OH del grupo catecol, seguido del grupo amino y finalmente el otro hidroxilo del catecol. Sin embargo, esta propuesta no aclara, cual de los hidroxilos es el primero en desprotonarse, permitiendo la posibilidad de dos posibles rutas de desprotonación, (esquema 4.1.A y 4.1.B). Entonces la primera desprotonación puede ser del OH sobre el C6 (ruta A) o del OH sobre el C5 (ruta B).



**Esquema 4.1. Dos posibles rutas de desprotonación de acuerdo al mecanismo propuesto por Kiss y Martin [4.8].**

Como se puede observar en el esquema 4.1 el grupo hidroxilo que es desprotonado primero produce diferentes estructuras químicas que son factibles durante la desprotonación, estas diferencias químicas tienen gran importancia a nivel biológico, lo cual implica que es fundamental determinar las estructuras predominantes bajo ciertas condiciones.

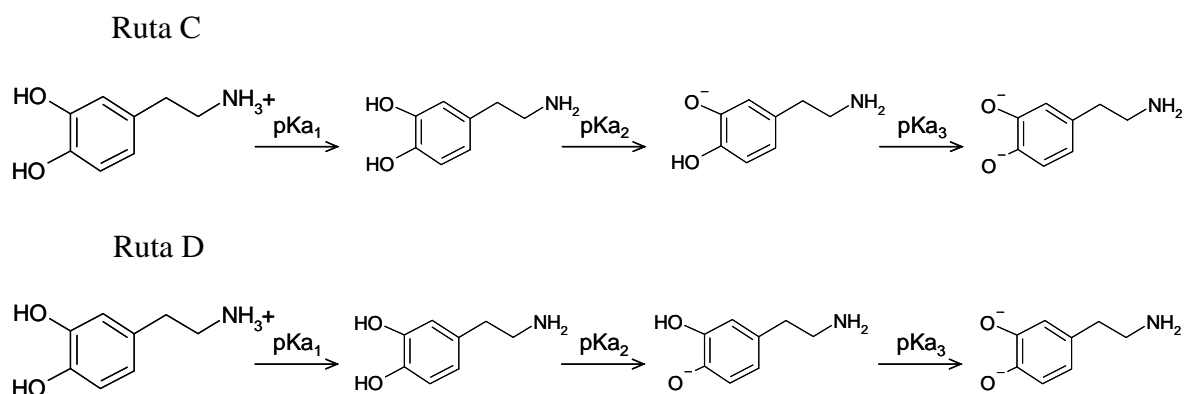
Algunos estudios reportados acerca de los valores de pKa para valores de catecol y la cadena etilamina se muestran en la tabla 4.2.

Considerando los valores de la tabla 4.2 y comparándolos con los valores obtenidos para la DA, se podría concluir que el valor de  $pK_{a1} = 9.05$  y  $pK_{a3} = 12.07$  corresponden a la desprotonación de DA de los hidroxilos del catecol, mientras que el  $pK_{a2} = 10.58$  corresponde a la desprotonación de la etilamina, lo cual concuerda con la propuesta de Kiss y Martin [4.8]. Sin embargo no hay evidencia de que el grupo hidroxilo de la DA libera primero el protón.

Tabla 4.2. Constantes de Acidez del grupo catecol y etilenamina.

Catecol		Referencia	Etilenamina	Referencia
pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>		pKa <sub>1</sub>	
9.46	12.52	Hancock y Orszulik [4.11]	10.61	Porzsolt [4.14]
8.34	13.66	Manjula y Bhattacharya [4.12]	10.66	Hancock [4.15]
9.25	13	Balla [4.13]	10.68	Jameson [4.16]

Por otra parte Rajan [4.17], propone que la primera desprotonación ocurre sobre el grupo amino, mientras que la segunda y tercer desprotonación sobre el grupo catecol (esquema 4.2). Esta propuesta es diferente con respecto a la de Kiss y Martin [4.8], sin embargo hay que resaltar que tampoco se indica cual de los protones del grupo hidroxilo se desprotona primero, este hecho da la posibilidad de que la segunda desprotonación pueda llevarse a cabo por dos posibles rutas (esquema 4.2), según la propuesta de Rajan.

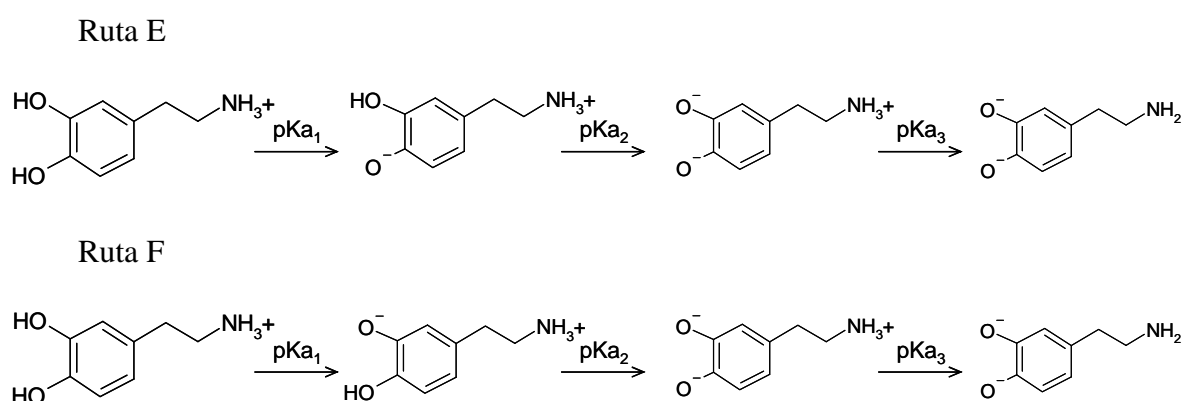


Esquema 4.2. Rutas posibles de desprotonación propuesto por el mecanismo de Rajan y col. [4.17].

En 1994, Gerard y Chehhal [4.6] asumieron, sin ninguna evidencia teórica o experimental, que la primer desprotonación correspondía al grupo OH, enlazado al C5, seguido por el grupo amino enlazado al C9, y finalmente la desprotonación del segundo

grupo OH del grupo catecol enlazado al C6. Es posible notar que esta secuencia concuerda con la propuesta por Kiss y Martin [4.8], siguiendo la ruta B en el Esquema 4.1.

Como se puede notar, las rutas de desprotonación de la DA no son muchas, además de la propuesta de Kiss y Martin, (Esquema 4.1) y la propuesta de Rajan (Esquema 4.2), solo hay dos posibilidades más, éstas se presentan en el esquema 4.3. Por lo que en este trabajo, se consideran todas las posibilidades para decidir, la ruta más razonable para la desprotonación de la DA.



Esquema 4.3. Rutas alternativas de desprotonación de DA en solución acuosa.

Es necesario mencionar que los estudios teóricos que se han realizado para tener un mejor entendimiento del comportamiento de la DA [4.18-4.26], muestran métodos obsoletos [4.18-4.21]. La mayoría de los estudios computacionales de DA que se han desarrollado están relacionados con propiedades conformacionales en fase gaseosa [4.23-4.25], y también en presencia de solvente [4.23, 4.25, 4.26] o para alguna de las especies que resultan del proceso de desprotonación de DA [4.25].

Sin embargo, hasta el momento no se ha detallado un estudio sobre la estructura molecular de los isómeros resultantes con la pérdida del protón (Esquema 4.1-4.3), y sus afinidades protónicas, lo cual puede ser directamente relacionada con las propiedades debido a los cambios del pH.

Con esta consideración en mente, es importante establecer el orden de desprotonación de la DA, de esta forma las estructuras existentes para cada intervalo de pH serán

determinadas, y con esta información se analizarán las posibles interacciones entre la DA y otro tipo de moléculas tales como compuestos orgánicos o metales.

Basado en lo anterior, el principal objetivo de este capítulo es encontrar y corroborar el orden en el cual la DA se desprotona, considerando todas las posibles rutas que pueden llevarse a cabo. Para ello se utiliza la Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD), esto pensando en que puede ser apropiado para el diseño de cálculos teóricos de los desplazamientos químicos obtenidos por Nuclear Magnetic Resonance-Gauge Including Atomic Orbital (NMR-GIAO) y modelando el efecto del solvente con un método continuo cuyo nombre es Modelo Continuo Polarizable (MCP). Los resultados obtenidos se corroboran con los obtenidos experimentalmente por análisis de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  RMN.

#### 4.2. Método Teórico.

Para este estudio se realizaron optimizaciones de geometrías totales y cálculos frecuencias con TFD [4.27], con el funcional Becke3LYP [4.28] y la base 6-311+G(*d,p*) en vacío y con efecto del solvente.

Las energías térmicas fueron calculadas ( $\Delta H_{298}$ ) para la reacción de protonación y la afinidad protónica (*AP*) fueron determinadas usando la ecuación (4.1) [4.29,].

$$AP = -\Delta H_{298} = \Delta E_0 + \Delta E_{term} \quad (4.1)$$

Donde  $\Delta E_0$  es la diferencia de las energías totales de las especies a 0 K, mientras que  $\Delta E_{term}$  incluye la contribución de la diferencia de energía vibracional, la diferencia de energía térmica, la diferencia de la energía rotacional y la diferencia de energía traslacional. El orbital frontera, corresponde al orbital molecular desocupado mas bajo (LUMO), fue calculado a través de un método semiempírico AM1 [4.30].

Para el cálculo RMN se utilizó el método GIAO (Gauge Including Atomic Orbital) [4.31] y la base para las optimizaciones 6-311+G(*d,p*), en el estudio del efecto del solvente en los espectros teóricos RMN se modeló un continuo de agua con método

MCP [4.32], todo con el programa Gaussian 2003 [4.33] y para la visualización de las moléculas, sus propiedades así como los espectros teóricos el programa GaussView 3.0 [4.34]. Arhus Lab [4.35] fue usado para calcular y visualizar la densidad de superficie del LUMO de las diferentes estructuras protonadas de DA. Para los cálculos y los espectros teóricos se usó una computadora Dell Precisión 670, 2 CPU Xeon 2.8 GHz, 2Gb RAM, 256 HD y una PC Dell Dimensión 8400, CPU Pentium 4.3 GHz, 1Gb RAM, 128 Gb HD.

### 4.3. Método Experimental

La solución stock de DA fue preparada a partir del reactivo grado A R Merck, para el ajuste del pH se utilizó NaOH (Merck 99%) y HCl (Merck 37%). Los espectros de RMN fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker AMX 500 NMR, se utilizó agua deuterada ( $D_2O$ ) y 2,2-Dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio (DSS), como solvente, tomando este último como referencia.

El pH de la solución fue medido con un electrodo de vidrio combinado (Metrohm).

### 4.4. Estudio Teórico de la DA

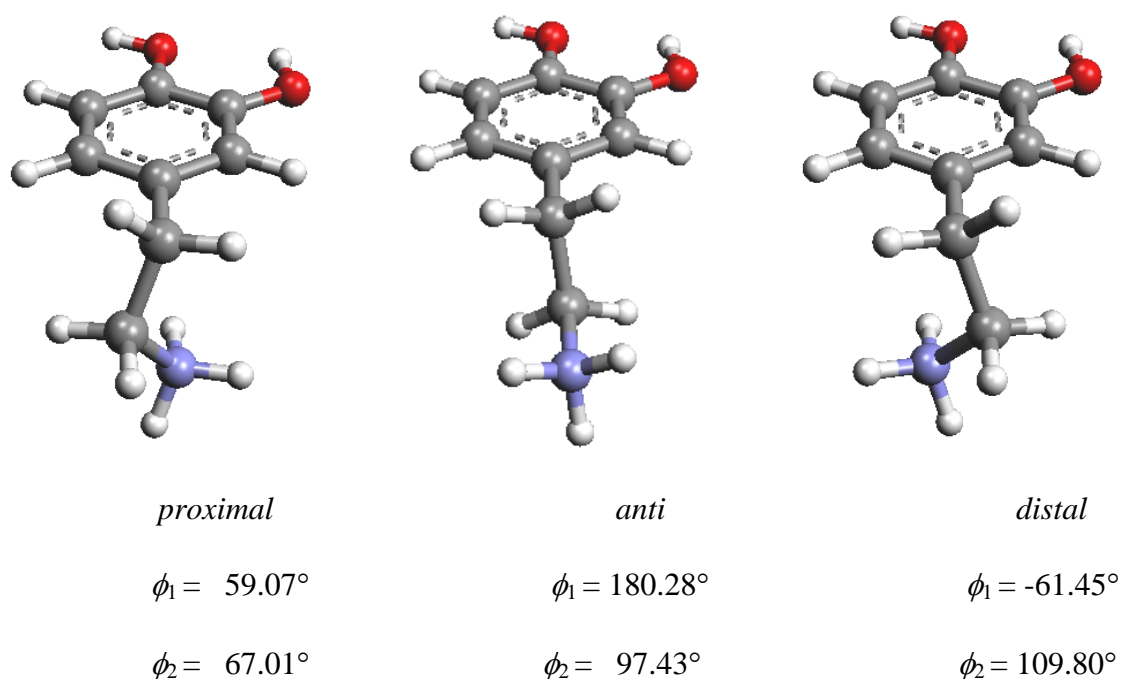
#### 4.4.1 Confórmeros de la DA N-protonada

Se ha demostrado a través de los perfiles AM1, en fase gaseosa o en solución acuosa, AM1-SM1 con AMSOL, que la conformación con ángulo diedro  $\phi_2 = 90$  (conformación perpendicular), son más estables [4.25].

Analizando las diferentes conformaciones de DA se encontró que la configuración *gauche*-perpendicular (+60,90) y (-60,90) tienen energías mucho más pequeñas, que las conformaciones anti-perpendicular (180,90). Sin embargo, cuando se utilizó el modelo de solvatación AM1/SM1, se encontró que la conformación *anti*-perpendicular da una contribución importante a la DA N-protonada [4.25].

La figura 4.3 muestra las geometrías moleculares obtenidas con las optimizaciones TFD (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM), de las tres conformaciones de la DA N-protonada, anti,

gauche y distal perpendicular. Los valores de los ángulos diedros fueron obtenidos a partir de las optimizaciones con TFD.



**Figura 4.3.** TFD (B3LYP/6-311+G(*d,p*)/PCM) geometrías optimizadas obtenidas a partir del rotámero más estable de la DA ángulos diedros  $\phi_1$  y  $\phi_2$ .

La tabla 4.3 muestra las energías relativas de los rotámeros así como los valores del potencial químico  $\mu$  y la dureza química  $\eta$ , calculados con las energías de los orbitales a la frontera AM1 y MP2 y usando los conceptos de TFD como se describe a continuación:

El potencial químico ( $\mu$ ) y la dureza química ( $\eta$ ) se definen como:

$$\mu = \left[ \frac{\partial E}{\partial N} \right]_{v(r)} \quad (4.2)$$

$$\eta = \left[ \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right]_{v(r)} \quad (4.3)$$

Donde  $E$  es la energía total,  $N$  es el número total de electrones y  $v(r)$  es el potencial externo generado por el núcleo.

La aproximación al infinito permite la definición de la dureza química como:

$$\eta \cong I - A \quad (4.4)$$

Y el potencial químico ( $\mu$ ):

$$\mu \cong -\frac{(I + A)}{2} \quad (4.5)$$

Donde I es el potencial de ionización y A es la afinidad electrónica, de acuerdo a teorema de Koopman's las energías del orbital a la frontera están dados por las ecuaciones (4.6) y (4.7)

$$-\epsilon_{\text{HOMO}} \cong I \quad (4.6)$$

$$-\epsilon_{\text{LUMO}} \cong A \quad (4.7)$$

Donde  $\eta$  corresponde a la diferencia entre las energías del orbital molecular ocupado más alto (HOMO) y del orbital molecular mas bajo desocupado (LUMO).

**Tabla 4.3. Variación de las energías totales B3LYP/6-311+G(d,p)/ MCP, el potencial químico ( $\mu$ ) y la dureza química ( $\eta$ ), calculados con MP2/ 6-311+g(d,p) y nivel AM1 para los rotámeros de la DA.**

Rotameros	$\Delta E$ (kcal/mol)	$\mu$ (eV)		$\eta$ (eV)	
		MP2/ 6-311+g(d,p)	AM1	MP2/ 6-311+g(d,p)	AM1
	B3LYP/6-311+g(d,p)/ MCP	MP2/ 6-311+g(d,p)	AM1	MP2/ 6-311+g(d,p)	AM1
<i>Anti</i>	-0.26	-7.03	-7.94	8.44	7.31
<i>Distal</i>	-0.09	-7.11	-8.04	9.03	7.79
<i>proximal</i>	0	-7.08	-8.04	9.03	7.82

Estos resultados muestran que la energía mas baja corresponde al rotámero anti. A partir de los resultados, es posible concluir que el rotámero anti, es la estructura más estable, lo cual concuerda con resultados previamente reportados [4.23,4.25]. Una vez que se ha optimizado la geometría de la DA N-protonada (figura I.1.4), el estudio teórico se llevará a cabo para determinar el orden de desprotonación de la DA, siguiendo el criterio de afinidad protónica (AP), las especies más estables, la carga atómica (Mulliken), la distancia de enlace y la densidad de superficie LUMO.

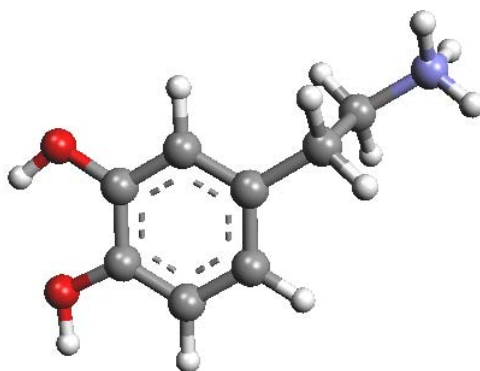


Figura 4.4. Geometría mínima energía (B3LYP/6-311+G(d,p)/ MCP) de la DA N-protonada (*anti*).

#### 4.4.2. Estudio teórico del orden de desprotonación de la DA N-protonada.

Con el fin de analizar el orden de desprotonación de la DA, se realizaron los siguientes cálculos para su diferentes especies químicas mostradas en los esquemas 4.1-4.3. Los cálculos se hicieron para todas las especies que se muestran en la figura 4.5, usando el mismo nivel de cálculo que se usó para el estudio de la DA N protonada. Es importante resaltar que para este estudio se usó la geometría optimizada del rotámero anti, considerando el efecto del solvente.

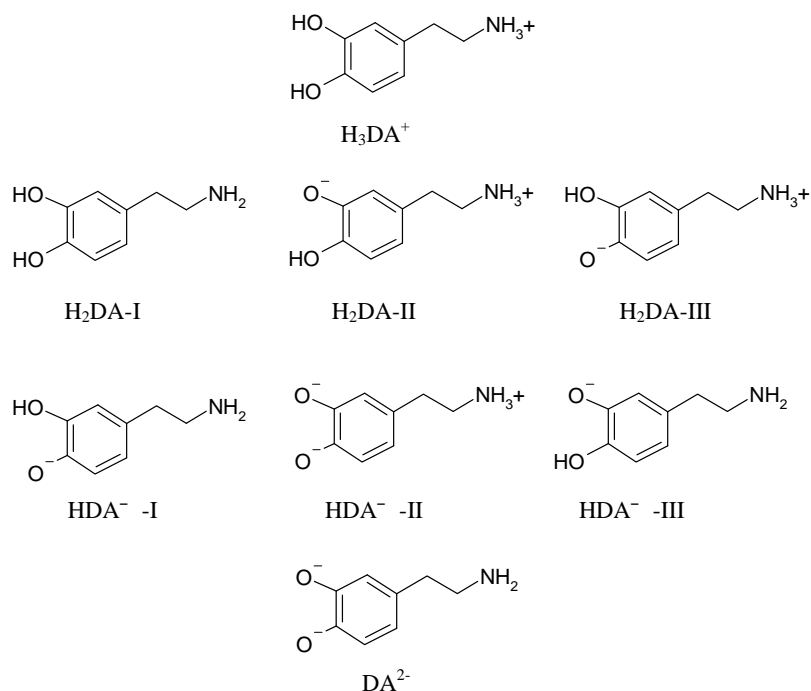


Figura 4.5. Especies involucradas durante la desprotonación de la DA N-protonada ( $\text{H}_3\text{DA}^+$ ).



Como puede observarse en la figura 4.5, después de la primera y segunda desprotonación las especies resultantes serán  $H_2DA$  y  $HDA^-$  respectivamente, para cada una de ellas pueden existir tres isómeros  $H_2DA$ -I,  $H_2DA$ -II,  $H_2DA$ -III para  $H_2DA$  y  $HDA^-$ -I,  $HDA^-$ -II,  $HDA^-$ -III para  $HDA^-$ .

Las geometrías totales optimizadas y el análisis de frecuencias para las ocho posibles especies de la figura 4.5, serán discutidos en la siguiente sección, sin embargo es importante notar que en las rutas de la desprotonación de la DA existe la posibilidad de interconversión entre las especies  $H_2DA$ -II y  $H_2DA$ -III así como  $HDA^-$ -I y  $HDA^-$ -III, esto es posible considerando las reacciones 4.8 y 4.9 respectivamente.



A continuación se analizarán las rutas de desprotonación de la DA totalmente protonada ( $H_3DA^+$ ), tomando en cuenta la posibilidad de interconversión entre los dos isómeros que pueden contener cada especie que contiene una desprotonación del grupo catecol, esto puede resultar en la intercepción de las diferentes rutas considerando las A con B, C con D y E con F.

#### 4.4.3 Afinidad protónica (AP) y estabilidad relativa de isómeros

La tabla 4.4 muestra la afinidad protónica de los tres isómeros ( $H_2DA$ -I,  $H_2DA$ -II y  $H_2DA$ -III) correspondientes a las tres diferentes posibilidades para la primera desprotonación de la DA  $H_3DA^+$  (ver figura 4.5). En la tabla 4.4 y 4.5 es posible notar que las especies con baja afinidad protónica y energía molecular relativa es  $H_2DA$ -I. Consecuentemente esto indica que la molécula más probable formada después de la primer desprotonación de  $H_3DA^+$  puede ser  $H_2DA$ -I, con lo cual las rutas A, B, E y F son energéticamente menos favorables, que las rutas D y C, y la reacción 8 no es posible. Así que estas dos rutas de desprotonación (D y C) son las más viables que puede seguir la DA.

**Tabla 4.4. Afinidad protónica (AP) de las especies neutras H<sub>2</sub>DA-I, H<sub>2</sub>DA-II y H<sub>2</sub>DA-III, calculadas por B3LYP/6-311+G(d,p)/ MCP de acuerdo a la ecuación (1).**

	AP (B3LYP/6-311 +G(d,p)/ PCM) (kcal/mol)	ΔAP (B3LYP/6-311 +G(d,p)/ PCM) (kcal/mol)
H <sub>2</sub> DA-I + H <sup>+</sup> → H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup>	283.644	0
H <sub>2</sub> DA-II + H <sup>+</sup> → H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup>	294.749	11.105
H <sub>2</sub> DA-III + H <sup>+</sup> → H <sub>3</sub> DA <sup>+</sup>	291.328	7.684

**Tabla 4.5. Energías moleculares relativas (ΔE) (B3LYP/6-311+G(d,p)/ MCP) de los diferentes isómeros formados de la desprotonación de H<sub>3</sub>DA<sup>+</sup>: H<sub>2</sub>DA-I, H<sub>2</sub>DA-II, H<sub>2</sub>DA-III.**

Energías moleculares relativas (ΔE) (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) (kcal/mol)		
H <sub>2</sub> DA-I	H <sub>2</sub> DA-II	H <sub>2</sub> DA-III
-10.12	-3.63	0

Con el fin de identificar cual es la ruta más favorable entre D o C, se analizó la afinidad protónica y las energías moleculares relativas de las moléculas involucradas durante la desprotonación de H<sub>2</sub>DA-I. En las tablas 4.6 y 4.7 es notorio que la HDA<sup>-</sup>-I tiene energía molecular relativa y afinidad protónica mas baja que HDA<sup>-</sup>-III, así la ruta D corresponde a la ruta con las especies de energía mas baja. Es importante resaltar que la interconversión entre HDA<sup>-</sup>-I y HDA<sup>-</sup>-III (reacción 4.9) es energéticamente no favorable pues el valor esta cerca de 3.6 kcal (ver tabla 4.5).

**Tabla 4.6. Afinidad protónica (AP) de las especies HDA<sup>-</sup>-I y HDA<sup>-</sup>-III, para formar H<sub>2</sub>DA-I, calculadas por B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM de acuerdo a la ecuación (1).**

	PA (B3LYP/6-311+G(d,p)/ PCM)/(kcal/mol)	ΔPA (B3LYP/6-311+G(d,p)/ PCM)/(kcal/mol)
HDA <sup>-</sup> -I + H <sup>+</sup> → H <sub>2</sub> DA-I	288.722	0
HDA <sup>-</sup> -III + H <sup>+</sup> → H <sub>2</sub> DA-I	292.050	3.328

**Tabla 4.7. Energías moleculares relativas ( $\Delta E$ ) (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) de los diferentes isómeros involucrados durante de la desprotonación de H<sub>2</sub>DA-I, de acuerdo a la ruta C (HDA<sup>-</sup>-III) y D (HDA<sup>-</sup>-I).**

Energía molecular relativa ( $\Delta E$ ) (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) (kcal/mol)	
HDA <sup>-</sup> -I	HDA <sup>-</sup> -III
-3.571	0

Si se analiza la afinidad protónica de la DA completamente desprotonada (DA<sup>2-</sup>) (ver Tabla 4.8), se tiene que la ruta D es la más estable. Cabe mencionar que las interconversiones de especies de intermediarios durante el proceso no son energéticamente favorables, por otra parte la diferencia entre las especies HDA<sup>-</sup>-I y HDA<sup>-</sup>-III no son consideradas suficientemente grandes como para abandonar la idea de la interconversión (ver reacción 4.9) si esto pasara las rutas D y C pueden coincidir.

**Tabla 4.8. Afinidades protónicas (PA) de DA<sup>2-</sup> para formar HDA<sup>-</sup>-I o HDA<sup>-</sup>-III calculadas por B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM de acuerdo con la ecuación (1).**

	PA (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) (kcal/mol)	PA (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) (kcal/mol)
DA <sup>2-</sup> + H <sup>+</sup> → HDA <sup>-</sup> -I	308.333	0
DA <sup>2-</sup> + H <sup>+</sup> → HDA <sup>-</sup> -III	305.005	3.328

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos a partir de los parámetros termodinámicos como PA y las energías relativas, se analiza en la siguiente sección la labilidad de los enlaces químicos asociados con los protones ácidos en la molécula de DA a través de las cargas de Mulliken, las distancias de enlace y las densidades de superficie molecular LUMO.

#### 4.4.4 Carga Atómica (Mulliken) y distancias de enlace interatómicas

La tabla 4.9 muestra las cargas de atómicas de Mulliken (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM), correspondientes a los átomos H asociados con el grupo amino (H21,H22 y H23) y con

los átomos asociados al grupo catecol (H19 y H20) de la  $H_3DA^+$ ). En la Tabla 4.9 es posible apreciar que los valores más positivos de las cargas Mulliken corresponde a los átomos de hidrógeno del grupo amino, lo cual indica que dichos átomos pueden ser los primeros en perderse durante la primer desprotonación, esto se confirma con los datos de la Tabla 4.10, relacionados con las distancias de enlace de átomos de hidrógeno asociados con la primer desprotonación.

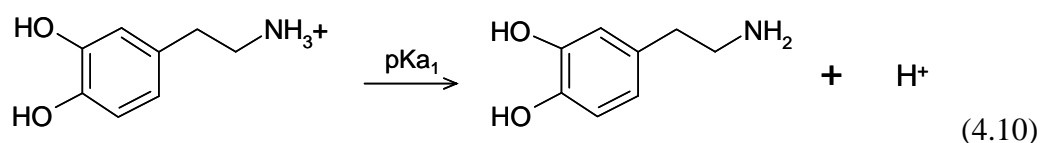
**Tabla 4.9. Cargas atómicas de Mulliken (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM) de la DA N-protonada ( $H_3DA^+$ )**

Cargas atómicas de Mulliken (B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM)	
	$H_3DA^+$
H19	0.330
H20	0.353
H21	0.374
H22	0.364
H23	0.364

**Tabla 4.10. Distancias de enlace (Å) B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM of the N-protonada DA ( $H_3DA^+$ )**

Distancias de enlace (Å) B3LYP/6-311+G(d,p)/PCM	
	$H_3DA^+$
O7-H19	0.977
O8-H20	0.983
N11-H21	1.032
N11-H22	1.033
N11-H23	1.033

Este análisis corrobora la idea de que el proceso de desprotonación de la DA N-protonada ( $H_3DA^+$ ) inicia con la siguiente reacciones (4.10):



Lo cual corresponde a la primera reacción descrita en el esquema 4.2 para la ruta C o D.

#### 4.4.5 Densidad de superficie del orbital molecular desocupado más bajo LUMO

La figura 4.6 muestra el orbital molecular (LUMO) de  $H_3DA^+$ ,  $H_2DA-I$  y  $HDA^- -I$ . Se sabe que sobre una molécula, la localización de la densidad de LUMO está asociada con los sitios más favorables que pueden sufrir una sustitución nucleofílica [4.36, 4.37].

En la figura 4.6 (a) se puede observar que la  $H_3DA^+$ , los coeficientes moleculares más altos para el LUMO se localizan en el grupo amino. Lo que indica que es el sitio más probable para la pérdida del protón, por tanto, la desprotonación se lleva a cabo siguiendo la reacción (4.10), esto concuerda con los resultados obtenidos del cálculos de PA y las energías relativas, las cargas de Mulliken y las distancias de enlace.

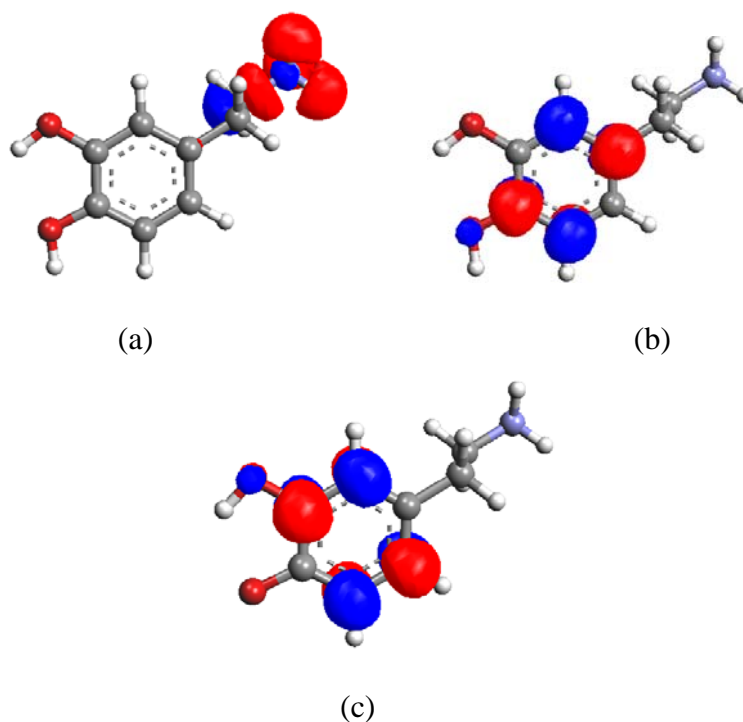
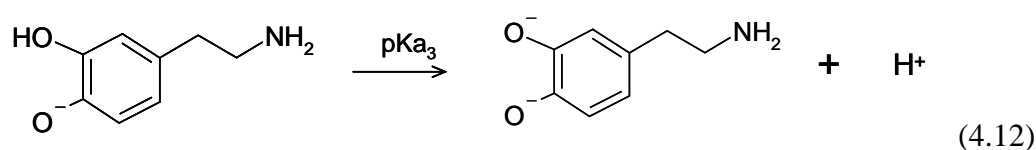
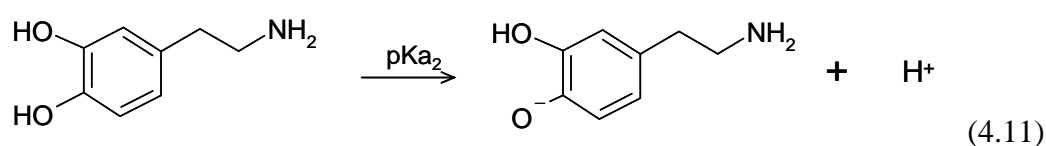


Figura 4.6. Densidad de superficie del LUMO (AM1) para la  $H_3DA^+$  (a),  $H_2DA-I$  (b) y  $HDA^- -I$  (c). Valor de Isodensidad 0.05 a.u.

Considerando que la primer desprotonación se lleva a cabo sobre el grupo amino, se calculó la densidad del LUMO (figura 4.6(b)) para la especie H<sub>2</sub>DA-I, donde es posible apreciar que la densidad se encuentra localizada sobre el O8 y el anillo aromático, analizando la acidez de la DA y la distribución de densidad, se descarta el efecto sobre el anillo pues no es viable una sustitución nucleofílica sobre el anillo aromático. Y por otra parte, de los dos protones ácidos que quedan, el más favorable a perder es el H20, ver la reacción (4.11). Una vez que la DA ha perdido los protones H20 y H21, el último protón que se pierde es el H19 (reacción 4.12), esto concuerda con la densidad del LUMO localizada sobre el átomo O7 (figura 4.6c).



A partir de los resultados obtenidos a través de los diversos parámetros Teóricos estudiados es posible concluir que la desprotonación de la DA ocurre como se indica en la figura 4.7. Esto es, la desprotonación se lleva a cabo primero sobre el grupo amino NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, después sobre el hidroxilo enlazado al C6 y finalmente sobre el hidroxilo enlazado a C5. Con el fin de tener mayor certeza sobre el orden de desprotonación de la DA, se realizaron experimentos RMN

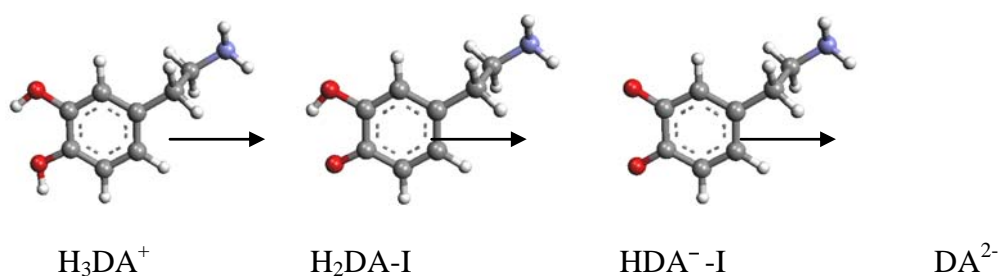


Figura 4.7. Especies de DA involucradas en la desprotonación. Se muestran las estructuras moleculares con la geometría de mínima energía.

#### 4.5 Estudio Experimental RMN

Los espectros RMN experimentales fueron tomados para dos valores de pH 5.1 y 9.6, En estas condiciones la DA se encuentra como  $H_3DA^+$  y  $H_2DA$  respectivamente, (ver figura 4.1). El espectro  $^{13}C$  para DA a pH 5.1 se muestra en la figura 4.8.

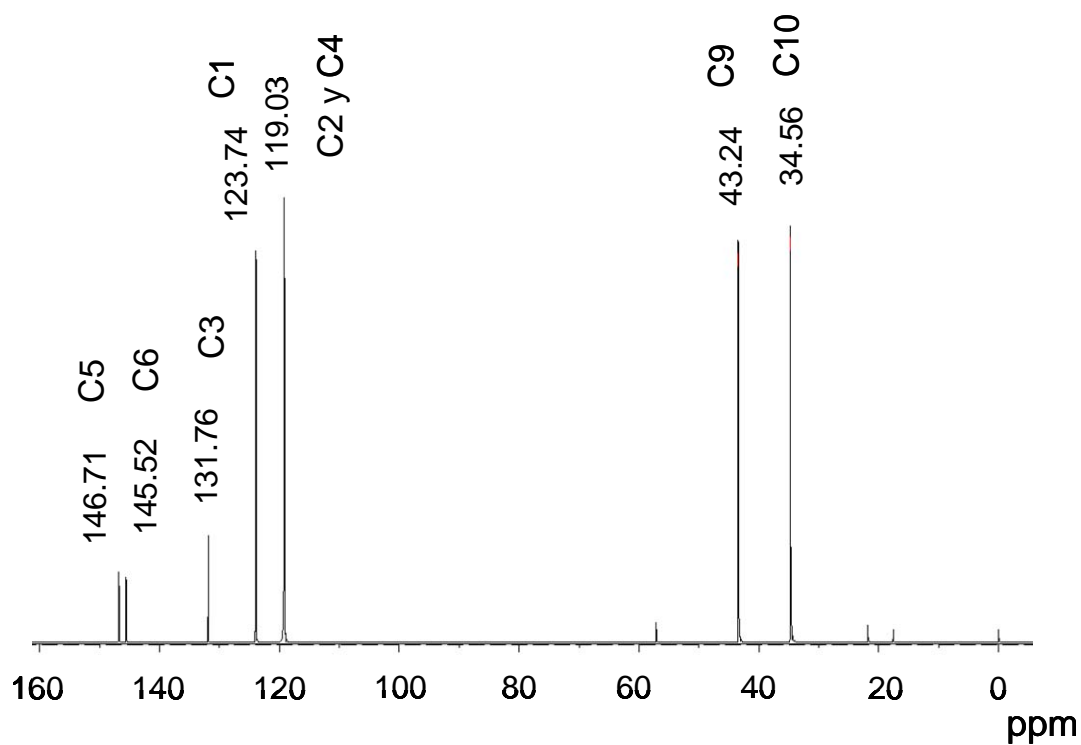


Figura 4.8. Espectro RMN  $^{13}C$  de DA en  $D_2O$  a pH 5.1.

Los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del espectro de RMN, fueron obtenidos para diferentes valores de pH, estos se muestran en la Tabla 4.11, considerando la misma asignación de números a los átomos en la molécula como en la figura 4.2.

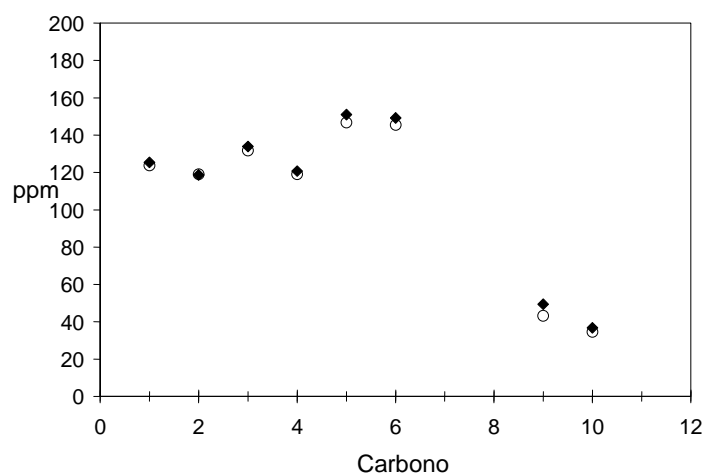
**Tabla 4.11. Desplazamientos químicos experimentales en ppm de los átomos de carbono en la DA a diferentes valores de pH, obtenidos de los espectros  $^{13}\text{C}$  RMN.**

Carbono	pH=5.1	pH=9.6
	$\text{H}_3\text{DA}^+$	$\text{H}_2\text{DA}$
1	123.74	121.87
2	119.03	118.65
3	131.76	130.69
4	119.03	119.22
5	146.71	150.52
6	145.52	148.68
9	43.24	43.65
10	34.56	35.23

Considerando estos valores y con el fin de corroborar el orden de desprotonación obtenido a través el estudio teórico, se hace una comparación entre los datos experimentales y los datos obtenidos con los espectros  $^{13}\text{C}$  RMN teóricos.



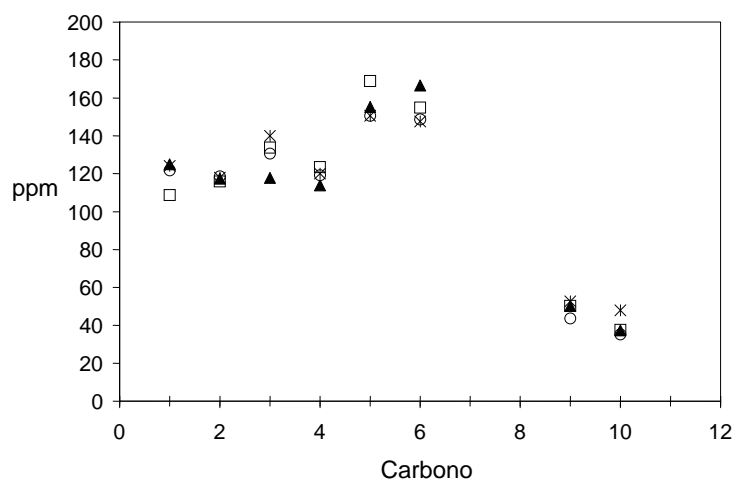
Para ello se calcularon los SCF GIAO Magnetic Shielding Tensor a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) en un cálculo “single point” con las geometrías de mínima energía obtenidas para las distintas etapas de la desprotonación calculadas también a nivel TFD con el mismo funcional y base, considerando el efecto del solvente y un continuo de agua a través del método PCM. Los desplazamientos químicos fueron referidos a TMS como se indicó previamente con esto se crea el espectro de RMN y se obtienen los desplazamientos para todas las moléculas. La figura 4.9 muestra una comparación de todos los desplazamientos de los carbonos de la  $H_3DA^+$  obtenidos experimental y teóricamente.



**Figura 4.9. Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes las especies  $H_3DA$ : (♦) teórico (TMS-B3LYP/6-311+G(d,p)-GIAO) (○) experimentales.**

Como puede observarse en la figura 4.9 tanto los datos experimentales como los teóricos quedan traslapados para cada carbono de la molécula, este comportamiento indica que el cálculo utilizado para la especie química  $H_3D^+$  concuerda con los datos experimentales de la DA a este pH.

Para la especie  $H_2DA$  se utilizan los resultados de los desplazamientos experimentales (tabla 4.11) y se comparan con los calculados teóricamente de las tres posibles especies químicas  $H_2DA$ -I,  $H_2DA$ -II y  $H_2DA$ -III (figura 4.7). En la figura 4.10 se muestra esta comparación.



**Figura 4.10.** Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos de las diferentes especies de H<sub>2</sub>DA, experimental (○) y teóricos TMS-B3LYP/6-311+G(d,p) -GIAO) (\*) H<sub>2</sub>DA-I, (□) H<sub>2</sub>DA-II y (▲) H<sub>2</sub>DA-III

El análisis de los datos (Figura 4.10) muestra que la información experimental es representada de mejor manera por los desplazamientos químicos de la especie H<sub>2</sub>DA-II obtenidos teóricamente. Si se observan los desplazamientos químicos obtenidos en los C5 y C6 los cuales se encuentran ligados a los hidroxilos directamente, concuerdan idénticamente. Sin embargo, los correspondientes a las moléculas H<sub>2</sub>DA-II y H<sub>2</sub>DA-III se separan más del comportamiento experimental. Por lo que el orden de desprotonación se lleva a cabo de acuerdo siguiendo la ruta D (ver esquema 4.2 y figura 4.7).

#### 4.6. Conclusiones.

Con base a los parámetros teóricos obtenidos: afinidad protónica, estabilidad energética de los conformeros, la distribución del LUMO, las cargas de Mulliken y las distancias de enlace fue posible proponer el orden de desprotonación de la DA. El mecanismo propuesto se corroboró experimentalmente, con el buen ajuste entre los datos de los desplazamientos químicos teóricos con los obtenidos experimentalmente, lo que significa que el cálculo representa el comportamiento experimental.

En el siguiente capítulo se estudia el comportamiento electroquímico de la DA, sobre un electrodo de carbón vítreo, por voltamperometría cíclica para caracterizar su comportamiento y por amperometría para hacer la determinación cuantitativa.

## CAPÍTULO 5

### EFFECTO DEL DODECILSULFATO DE SODIO SOBRE EL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE DA

#### 5.1. Introducción

La DA, es un neurotransmisor que tiene un papel importante en el sistema nervioso central, el cual cuando se encuentra en concentraciones bajas produce enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, y Parkinson [5.1, 5.2], entre otras, Por lo que es esencial realizar la determinación de DA en fluidos extracelulares, algunas técnicas analíticas como cromatografía de líquidos acoplado a detectores electroquímicos [5.3-5.5] facilitan esta determinación.

Sin embargo, es común que la mayoría de las muestras sujetas a análisis contengan ácido ascórbico, en concentraciones tales que éste sea problema como interferente, ya que las señales electroquímicas individuales se traslapan, debido a que sus potenciales de oxidación son muy cercanos.

Ante esta situación se han desarrollado diversos estudios para la determinación de DA en presencia de AA, por técnicas voltamperométricas como voltamperometría cíclica, VC, y diferencial de pulso VDP, usando electrodos modificados selectivos a una especie electroactiva específica, estas modificaciones se han hecho con moléculas como los surfactantes cloruro de cetilpiridina, bromuro de cetilmetilamonio entre otros [5.6-21]. Wen y col. [5.7], han estudiado las ventajas de la formación de micelas de los surfactantes como el dodecilsulfato de sodio, SDS, sobre un electrodo de carbón vítreo para la determinación de DA. Esto es debido a la adsorción del surfactante sobre el electrodo y la solubilización de las especies electroactivas en agregados micelares, los cuales podrían apropiadamente inducir a cambios en el potencial de oxidación, los coeficientes de transferencia de carga y los coeficientes de difusión de los procesos que

se llevan a cabo en la superficie del electrodo [5.7]. Además el SDS ha sido usado para la determinación de algunos compuestos biológicos como adrenalina, ácido úrico y guanina [5.22]. Recientemente Zheng y Zhou [5.23] han propuesto el uso de electrodos modificados con SDS, formados por la preadsorción del SDS para determinar selectivamente DA en presencia de ácido ascórbico. Considerando lo antes mencionado, en este capítulo se analiza la influencia de la concentración de SDS sobre el comportamiento electroquímico de la oxidación de DA cuando ambos SDS y DA se encuentran presentes en solución, y se hace la determinación selectiva de DA en presencia de AA aprovechando las ventajas que ofrecen los surfactantes.

## **5.2. Método Experimental**

### **5.2.1. Reactivos**

### **5.2.2. Instrumentación**

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos de grado analítico de la marca Merck y con agua desionizada tipo 1 con resistividad de 18.2 M $\Omega$ , libre de materia orgánica, obtenida del equipo US Filter PURE- LAB Plus UV. El pH fue ajustado a pH 2.1 con HCl de Merck. Las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno y preparadas frescas para cada determinación. También se protegieron de la luz durante toda la experimentación.

Las determinaciones fueron llevadas a cabo con un equipo BAS 100W, se utilizó una celda típica de tres electrodos, se empleó un electrodo de pasta de carbón, EPC, como electrodo de trabajo, éste fue preparado de manera usual mezclando polvo de grafito Johnson Matthey 1  $\mu$ m, 99.9%, con nujol, como lo indica Ramirez-Silva y col [5.24,5.25]. Un alambre de platino (BAS MW-1032) fue usado como contraelectrodo, mientras que como electrodo de referencia se utilizó Ag/AgCl (BAS MF-2052), al cual todos los potenciales están referidos en este trabajo, los experimentos de la macroelectrólisis se realizaron con una malla de Pt como electrodo de trabajo.

Las lecturas de pH fueron hechas en el intervalo de 0-14 con un potenciómetro TACUSSEL LP y un electrodo de vidrio CORNING, la cromatografía de líquidos de alta resolución fue llevada a cabo con un sistema Spectra System SCM 1000 Thermo Separation Products, con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos, se utilizó una columna Grom-sil 120, ODS-5ST 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm, con 4mm de diámetro interno. La fase móvil fue amortiguador de fosfatos pH 3.0, además se utilizó un detector amperométrico de BAS Instruments.

### 5.2.3. Procedimiento

El comportamiento electroquímico de DA fue estudiado por CV en un sistema EPC / NaCl 0.01 M , x M SDS donde  $x \in \{0, 0.075, 0.5, 5 \text{ mM}\}$ , manteniendo una atmósfera de nitrógeno y controlando la temperatura en 25°C. Los VC fueron corridos en la ventana de potencial de -600 a 1000 mV aplicando diferentes velocidades de barrido 10, 100  $\text{mVs}^{-1}$ . En todos los casos el barrido se inició en el potencial de corriente nula ( $E_{i=0}$ ).

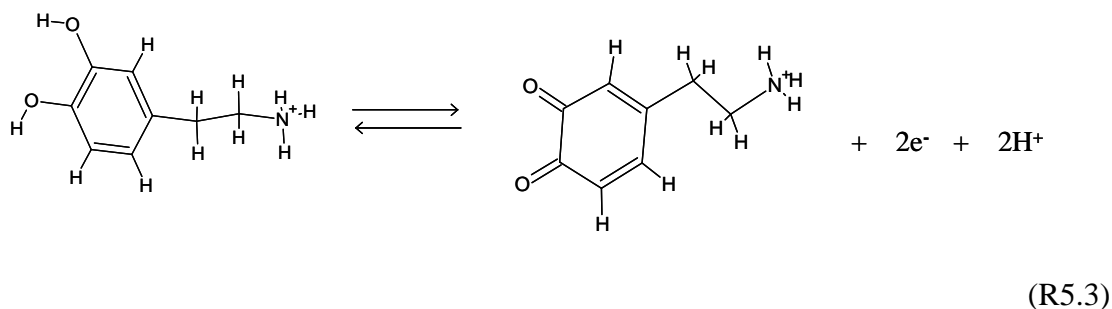
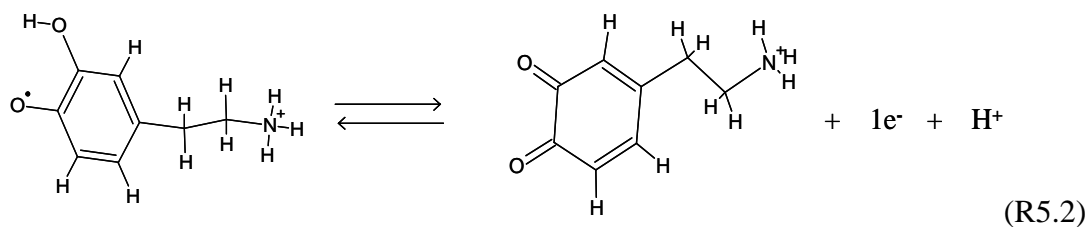
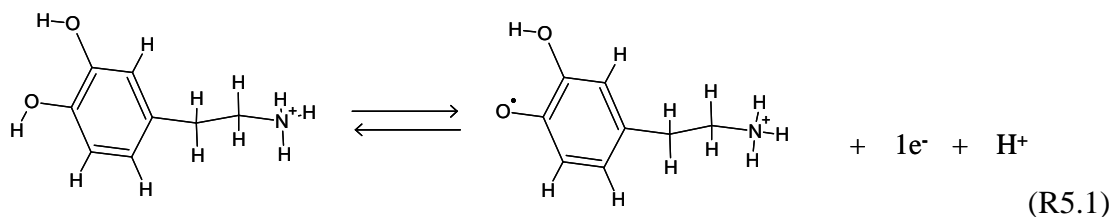
Los experimentos de la macroelectrólisis fueron hechos aplicando diferentes potenciales de oxidación dependiendo de la concentración de SDS, para tener la misma densidad de corriente para cada solución durante 5 min. Después de esta electrólisis, se tomo 20 $\mu\text{L}$  de la solución y se inyectó al cromatógrafo, la detección se hizo por espectroscopía y amperometría, para lo cual se impuso una longitud de onda de 480 nm donde la absorción de la DA es nula y un potencial ( $E = 315 \text{ mV}$ ) el cual se encuentra en la zona de reducción de la DA.

La tensión interfacial  $\gamma$  fue evaluada a partir de los gráficos de tiempo vs potencial usando una celda BAS CGM, para lo cual se empleó un electrodo de gota de mercurio (EGM) con un capilar de 1.59 mm de diámetro interno y flujo de  $4.36 \times 10^{-6} \text{ Kg s}^{-1}$  con un tiempo de goteo de 3 s.

### 5.3. Resultados y discusión.

#### 5.3.1. Procesos de oxidación y reducción de DA en ausencia de SDS.

La figura 5.1 muestra el comportamiento típico de la DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M en el sistema EPC / HCl 0.01 M (pH 2.10), ( $E_{i=0} = 304$  mV) en el sentido positivo, cuando la DA no se encuentra en el sistema, línea sólida, no hay ningún pico en este intervalo. En presencia de DA un pico de oxidación es observado en el potencial,  $E_{pa}$ , 589 mV, lo cual corresponde al siguiente mecanismo de reacción:



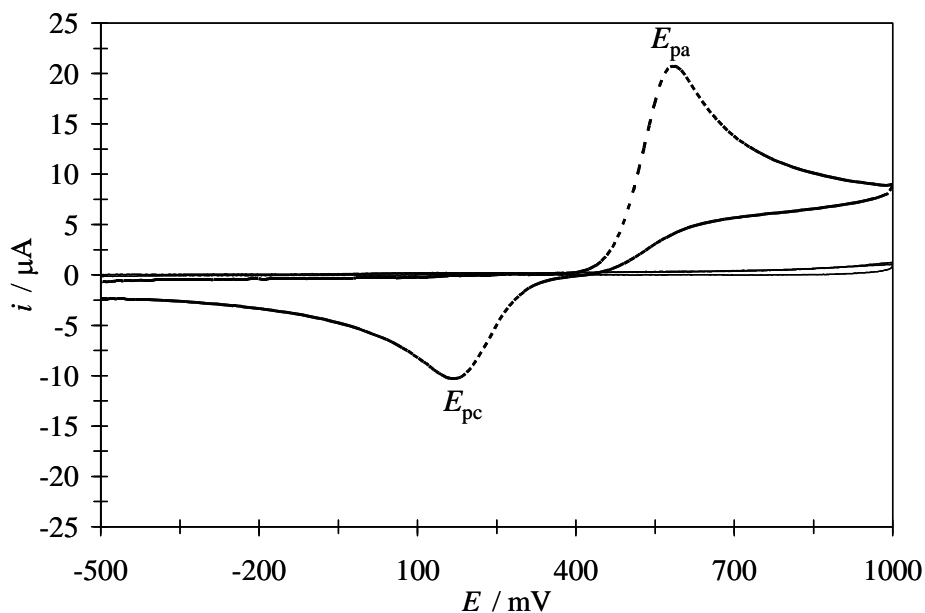
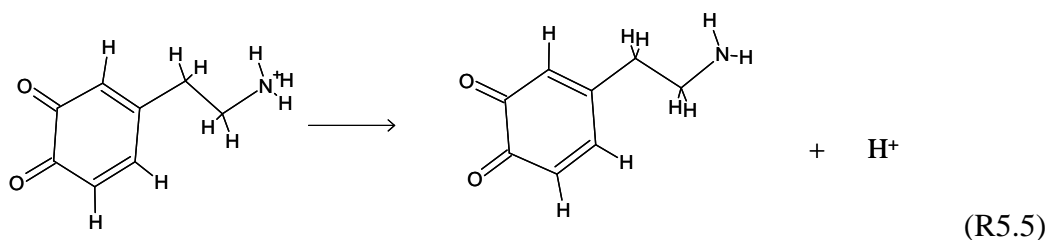
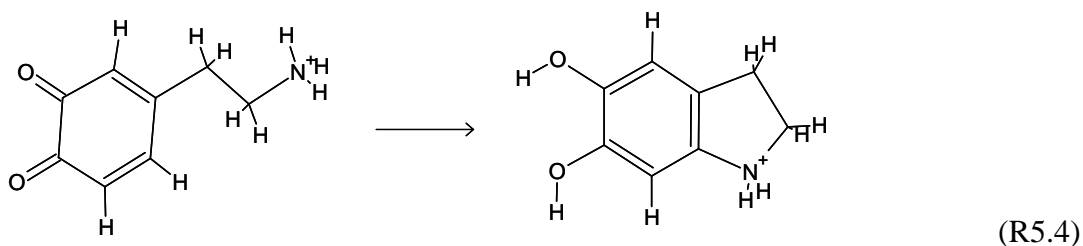


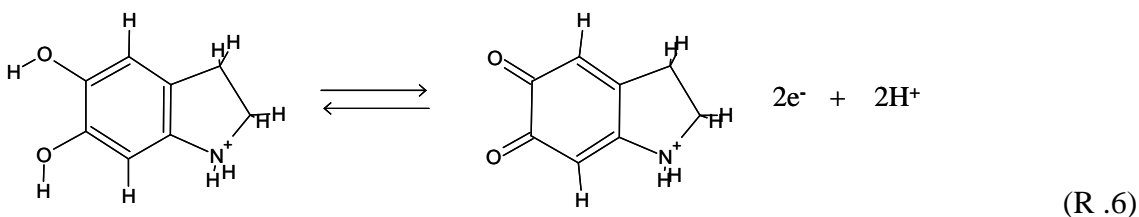
Figura 5.1. Voltamperogramas cíclicos EPC /NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10) para dos diferentes concentraciones de DA: 0 (—) y  $2.5 \times 10^{-4}$  M (---). En ambos casos el barrido de potencial se inició en el potencial de corriente nula en sentido positivo a velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

La mayoría de los estudios sobre la oxidación de la DA han asociado este proceso con la reacción R 5.3 [5.15, 5.23, 5.30-5.35] para formar dopaminoquinona, sin embargo hay algunos estudios que sugieren que la oxidación de la DA ocurre a través de las reacciones (R5.1) y (R5.2) considerando que la formación de la semiquinona puede ser estabilizada [5.7, 5.35-5.37].

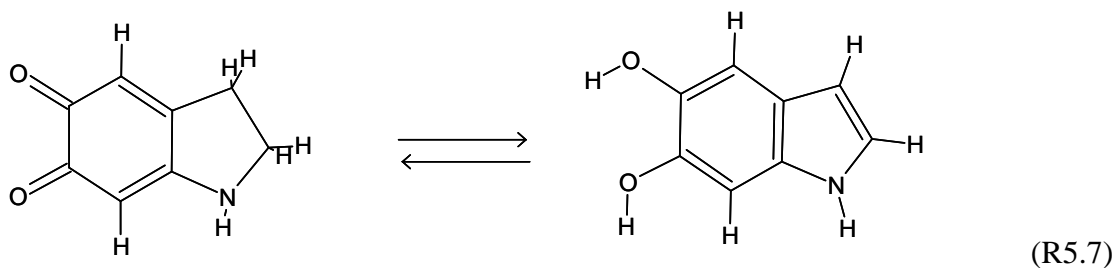
Estudios recientes sobre la oxidación electroquímica de la DA muestran el uso de electrodos modificados con polímeros [5.35], monocapas ensambladas [5.36] o agregados micelares [5.7]. Es importante mencionar que algunos autores proponen un mecanismo electroquímico químico (EC) para la oxidación de la DA donde la reacción electroquímica está dada por (R5.3) y la reacción química (C), corresponde a la reacción descrita en R5.4, para formar leucodopacromo formado a partir de la ciclización de la DA (R5.5) para formar aminocromo a partir de la dopaminoquinona [5.7]



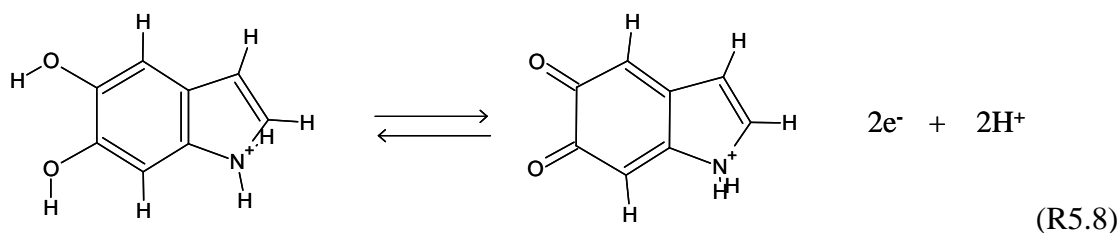
Otro mecanismo asociado con la oxidación de la DA involucra un mecanismo ECE donde la primer reacción electroquímica corresponde a R5.3, la reacción química a R5.4, y la segunda reacción electroquímica a R5.6. [5.31]



Recientemente Li [5.38], propuso un mecanismo de oxidación de DA en solución acuosa mas complejo (pH > 3.86) se trata de (ECECEE), el cual incluye además la isomerización (R5.8) y oxidación del producto de la ciclización (R5.8), permitiendo el crecimiento de la película. Es claro que el pH juega un papel importante sobre todas la reacciones para establecer cual es el mecanismo más probable que sigue la oxidación de DA.

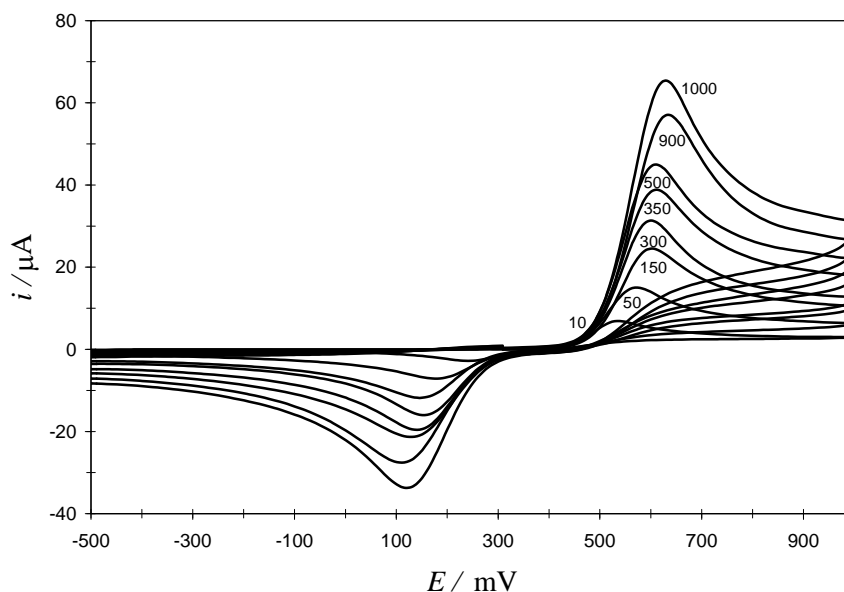






Por otra parte durante la inversión de barrido de potencial se observó un pico de reducción ( $E_{pc}$ ) en 171 mV, así que la diferencia entre los potenciales ( $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ ) fue 418 mV este valor fue mucho mayor que el esperado, 58 mV para  $n =$  un electrón o 60 mV/ $n$  para transferencia de electrones múltiples, para sistemas reversibles. [5.26-5.29, 5.40].

En figura 5.2 se presenta la familia de VC obtenidos en el sistema EPC / HCl 0.01 M (pH 2.1), DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M a diferentes velocidades de barrido. A partir de esta figura fue posible obtener la información de la tabla 5.1 donde se observa la influencia de la velocidad de barrido sobre los parámetros voltamperométricos.



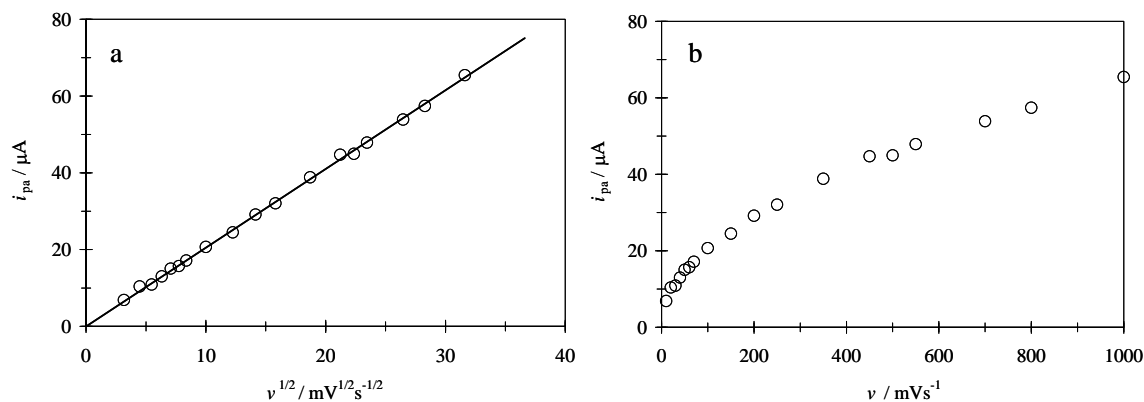
**Figura 5.2. Familia de VCs en el sistema EPC / NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M a diferentes valores de velocidad de barrido.**

La variación  $\Delta E$  con la velocidad de barrido se muestra en la tabla 5.1, donde se puede concluir, en este caso que la oxidación electroquímica de la DA es un proceso

cuasireversible, donde el transporte de masa está controlado por la difusión, figura 5.3. Sin embargo, el comportamiento de la relación entre los picos  $|i_{pc}/i_{pa}|$  puede indicar la presencia de una reacción química acoplada. Si esto es así, existiría la posibilidad de que esta reacción química esté directamente relacionada con (R5.9). Sin embargo, de acuerdo a Gosser [5.40], quien describe el diagrama de zonas para el mecanismo EC, ver figura 2-15 en la referencia [5.40], este caso podría corresponder a un mecanismo EC donde la cinética electroquímica y electródica son lentas.

Con el fin de sustentar la conclusión sobre la reacción electroquímica, se analizó la variación del potencial de pico como una función de la velocidad de barrido, figura 5.4, donde el pico anódico y catódico dependen linealmente sobre el logaritmo de la velocidad de barrido la cual se puede predecir por la ecuación 5.1 y 5.3 propuesta por Aoki [5.41].

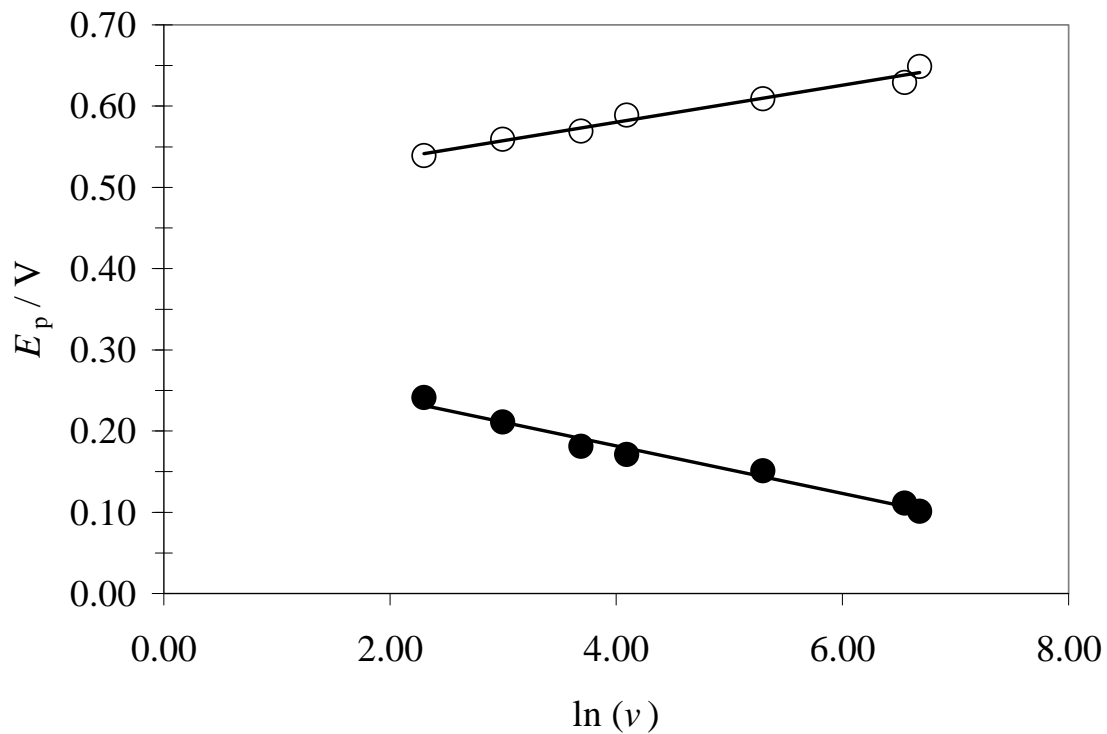
I



**Figura 5.3. Variación del corriente de pico anódico,  $i_{pa}$ , en función de (a)  $v^{1/2}$  y (b)  $v$  en el sistema EPC / NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M. los círculos corresponde a los datos**

**Tabla 5.1. Variación de los parámetros voltamperométricos como función de la velocidad de barrido ( $\nu$ ) correspondientes a los VC mostrados en la figura 5.2.**

$V / \text{mVs}^{-1}$	$E_{pa} / \text{mV}$	$E_{pc} / \text{mV}$	$E_{pa} - E_{pc} / \text{mV}$	$i_{pa} / \mu\text{A}$	$i_{pc} / \mu\text{A}$	$ i_{pc}/i_{pa} $
1000	629	121	508	65.44	-33.73	0.52
500	609	131	478	44.96	-21.32	0.47
350	599	141	468	38.83	-19.58	0.50
150	569	151	448	24.50	-11.78	0.48
50	579	181	388	15.04	-7.114	0.47
10	539	241	298	6.87	-2.823	0.41



**Figura 5.4. Relación entre el potencial del pico  $E_p$ , anódico (○) y catódico (●), y la velocidad de barrido  $\ln \nu$ , obtenidos de los VC en la figura 5.2. Las líneas son el resultado del ajuste lineal.**

$$E_{pa} = E^0 + m \left[ 0.78 + \ln \left( \frac{D^{1/2}}{k^0} \right) - 0.5 \ln m \right] + 0.5m \ln \nu \quad (5.1)$$

$$m = \frac{RT}{[(1-\alpha)nF]} \quad (5.2)$$

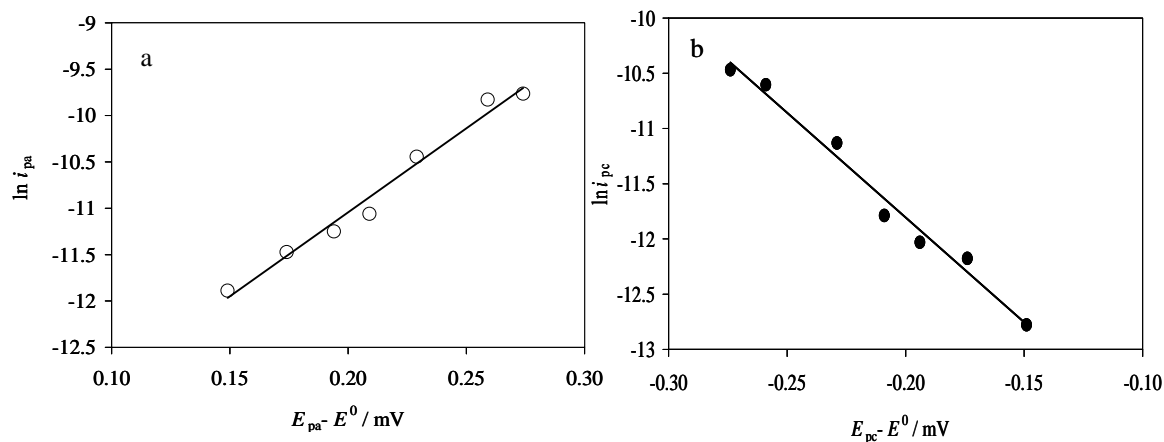
$$E_{pc} = E^0 - m' \left[ 0.78 + \ln \left( \frac{D^{1/2}}{k^0} \right) - 0.5 \ln m' \right] - 0.5 m' \ln v \quad (5.3)$$

$$m' = \frac{RT}{\alpha n F} \quad (5.4)$$

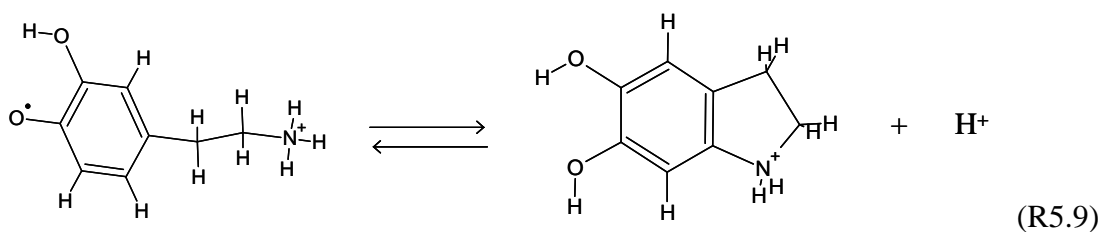
Donde  $E^0$  es el potencial formal de DA ( $(E_{pa} + E_{pc})/2 = 0.39$  V,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $k^0$  es la constante de velocidad heterogénea,  $\alpha$  es el coeficiente de energía de transferencia y  $n$  es el número de electrones transferidos durante la reacción heterogénea.  $R$ ,  $T$  y  $F$  son las constantes de gas universal, temperatura absoluta y la constante de Faraday, respectivamente. A partir de la pendiente y la intersección de la línea recta, en la figura 5.4 y usando el valor reportado del coeficiente de difusión DA,  $4.15 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [5.36], el valor de  $k^0$  fue calculado como  $0.0029$  y  $0.0038 \text{ cm s}^{-1}$ , para la parte anódica y catódica; el valor promedio es  $0.0034 \text{ cm s}^{-1}$ . Este valor indica que a la velocidad de barrido considerada, el proceso de oxidación-reducción DA es cuasireversible. Además de la variación de la corriente de pico catódico ( $i_{pa}$ ) como función del  $E-E^0$ , ver figura 5.5, y la ecuación (5.5) [5.29], es posible estimar el valor del coeficiente de transferencia de energía,  $\alpha$ , el cual en este caso fue de  $0.47$ , usando éste valor de  $\alpha$ , en la ecuación (5.2) y (5.4) y con la pendiente de las líneas en la figura 5.4, se puede estimar el número de electrones involucrados durante la oxidación y reducción de la DA, como  $0.93$  y  $0.95$  respectivamente. A partir de este resultado es posible concluir que la oxidación DA ocurre a través de la reacción R5.1.

$$i_p = 0.227 F A C_0^* k^0 \exp[-\alpha f (E_p - E^0)] \quad (5.5)$$

Donde  $A$  es el área del electrodo,  $C_0^*$  es la concentración de la DA,  $f = F/RT$



**Figura 5.5.** Variación experimental de las corrientes de pico en función de variación  $E_p - E^0$  (puntos) para cada proceso anódico (a) y catódico (b). Las líneas corresponden al ajuste lineal de los datos experimentales (a)  $\ln i_{pa} = 18.12(E_{pa} - E^0) - 14.66$  y (b)  $\ln i_{pc} = 18.97(E_{pc} - E^0) - 15.6$ .



### 5.3.2. Proceso de oxidación-reducción de DA en presencia de SDS.

Dada la naturaleza anfífilica de las moléculas de SDS, éste puede formar en solución agregados llamados micelas. Donde la concentración micelar crítica (CMC) determina la concentración (C) donde un surfactante presente en solución tiende a formar micelas ( $C > \text{CMC}$ ) o donde se encuentran principalmente como monómeros ( $C < \text{CMC}$ ) [5.42]. Por lo que es importante determinar este valor. Un método para determinar CMC consiste en medir la variación de la tensión interfacial ( $\gamma$ ) como una función de [SDS] (figura 5.6). A partir de esta figura fue posible establecer la concentración micelar crítica que para este sistema corresponde a 1.38 mM.

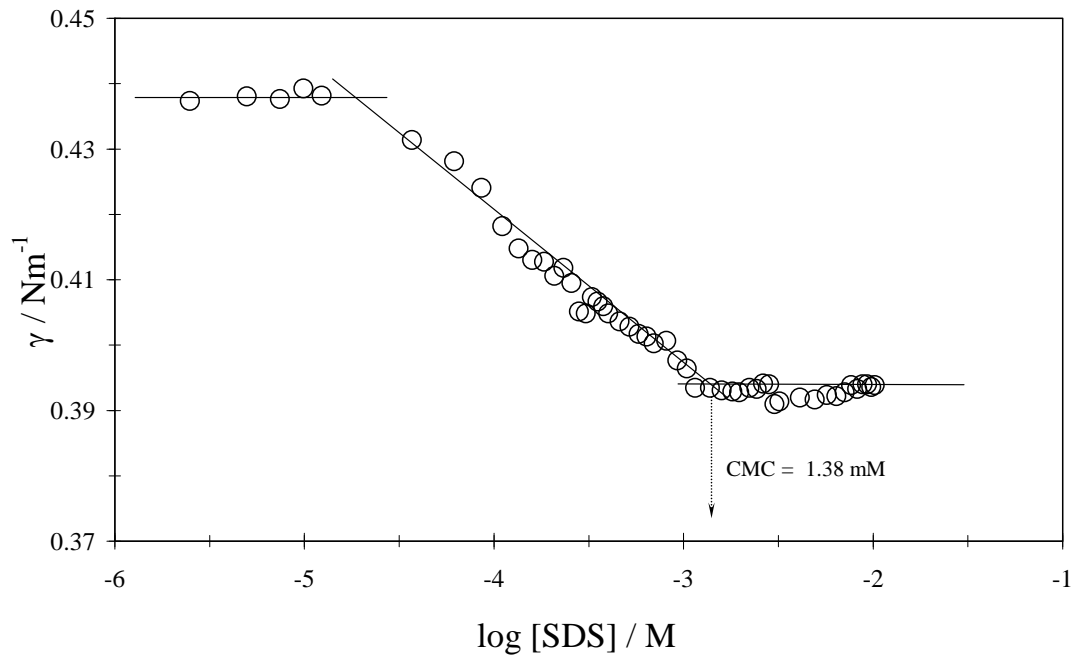
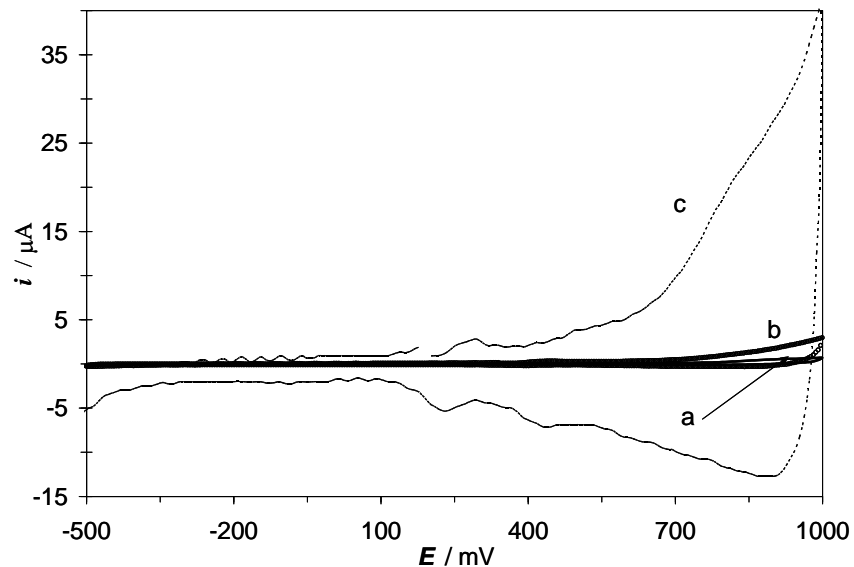


Figura 5.6. Variación de la tensión interfacial (○) con el logaritmo de la concentración del surfactante en el sistema Hg /  $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$  0.1 M,  $\text{SDS}_{(\text{aq})}$  x M.

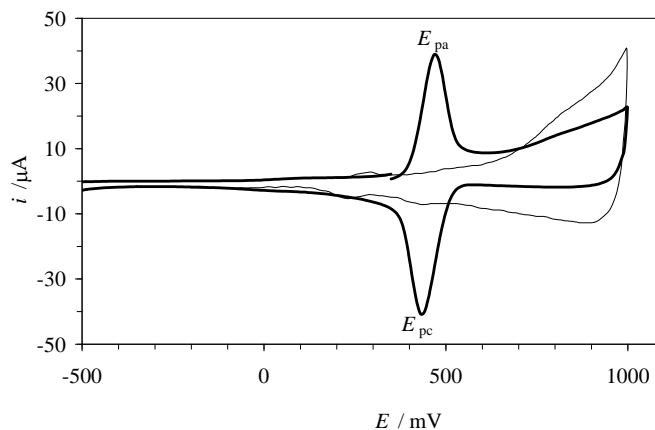
### 5.3.2.1 Electroactividad del SDS

La figura 5.7 muestra el comportamiento electroquímico en el sistema EPC /  $\text{NaCl}$  0.1 M,  $\text{HCl}$  0.01M (pH 2.10) con diferentes concentraciones de SDS en un intervalo alrededor de la CMC experimental obtenida. En esta figura es posible observar que el SDS no es una especie electroactiva, especialmente para  $[\text{SDS}] < \text{CMC}$ . Sin embargo para valores  $[\text{SDS}]$  mayores a CMC, se observa actividad particularmente en la zona anódica.



**Figura 5.7.** VC del sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10) con diferentes concentraciones de SDS (a) 0.075, (b) 0.5 y (c) 5 mM a velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

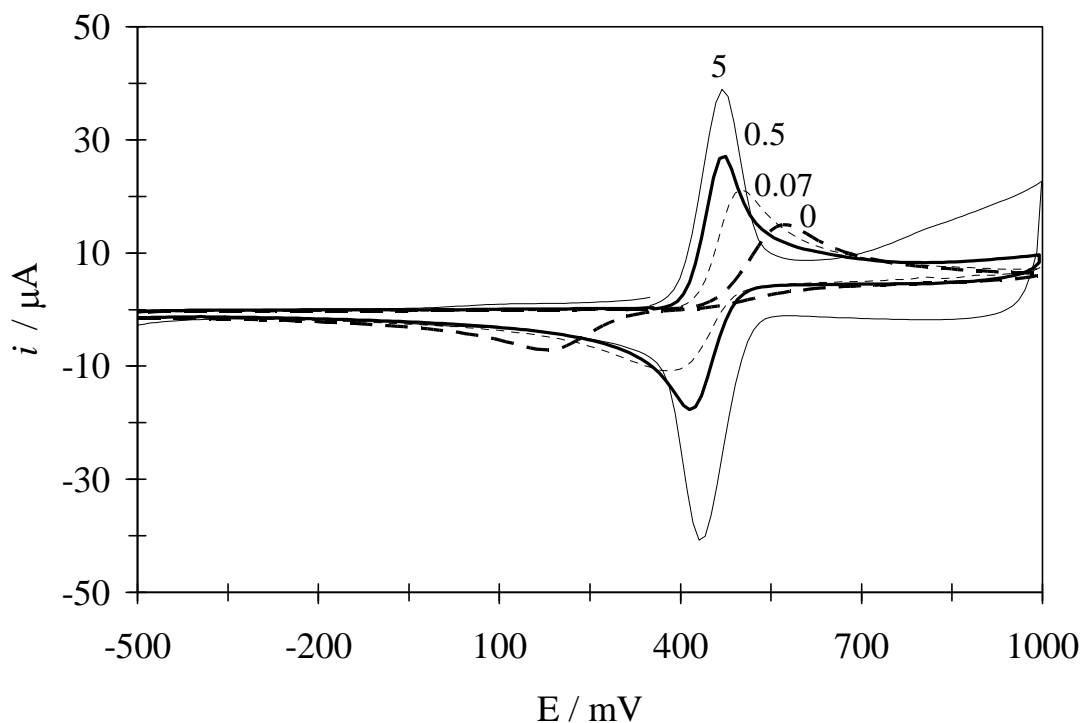
Con el fin de verificar si el SDS producía interferencias con la DA particularmente en concentraciones mayores a la CMC, se obtuvo el VC en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10) de SDS 5mM con y sin DA (figura 5.8), a partir de esta figura es posible notar que la señal del SDS no interfiere sobre el pico catódico y anódico de la DA, sin embargo, se nota claramente que  $\Delta E$  de los picos de la DA disminuye y que las corriente de pico anódica y catódica incrementan.



**Figura 5.8.** VC en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, para diferentes concentraciones de DA: 0 (—) y  $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$  (---). En ambos casos la velocidad de barrido fue de  $40 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 5.3.2.2 Efecto del [SDS] sobre el comportamiento voltamperométrico de DA

La figura 5.9 muestra la familia de VCs en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M con diferentes [SDS]. La tabla 5.2 resume los parámetros voltamperométricos generados de los gráficos de la figura 5.9, note que cuando [SDS] incrementa en el sistema, el  $\Delta E$  disminuye drásticamente, mientras que la relación  $-i_{p,c} / i_{p,a}$  tiende a la unidad. Cuando [SDS] < CMC (0 – 0.5 mM) el comportamiento electroquímico cambia de un sistema cuasirreversible a uno reversible, sin embargo cuando se tiene [SDS] > CMC (5 mM) el sistema corresponde a un sistema controlado por adsorción. Con el fin de corroborar esta posibilidad experimental se obtuvieron los VCs a diferentes velocidades de barrido (figura 5.10), a partir de este estudio se obtuvo la amplitud de pico a media altura ( $E_{FWHH}$ ) tabla 5.3 y la  $i_{pa}$  (figura 5.11), en todos los casos se espera que la variación de estos parámetros sea en función de  $\nu$ , donde la adsorción de las especies electroactivas se favorece [5.29, 5.40].



**Figura 5.9.** VC en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M con diferentes concentraciones de SDS indicadas en la figura en mM en todos los casos la velocidad de barrido fue  $40 \text{ mV s}^{-1}$ .

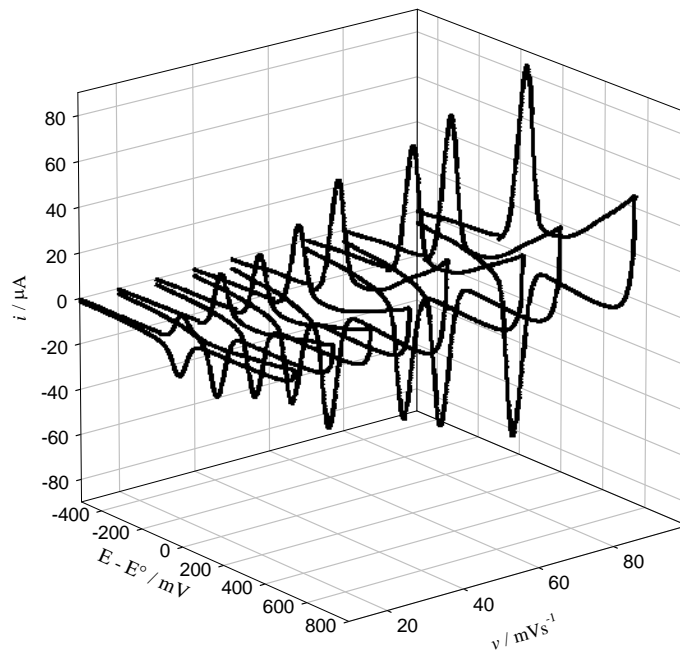


**Tabla 5.2. Variación de los parámetros voltamperométricos obtenidos de los gráficos de la figura 5.9, como una función de la [SDS]. La constante de velocidad heterogénea ( $k^o$ ) estimada para cada concentración de SDS.**

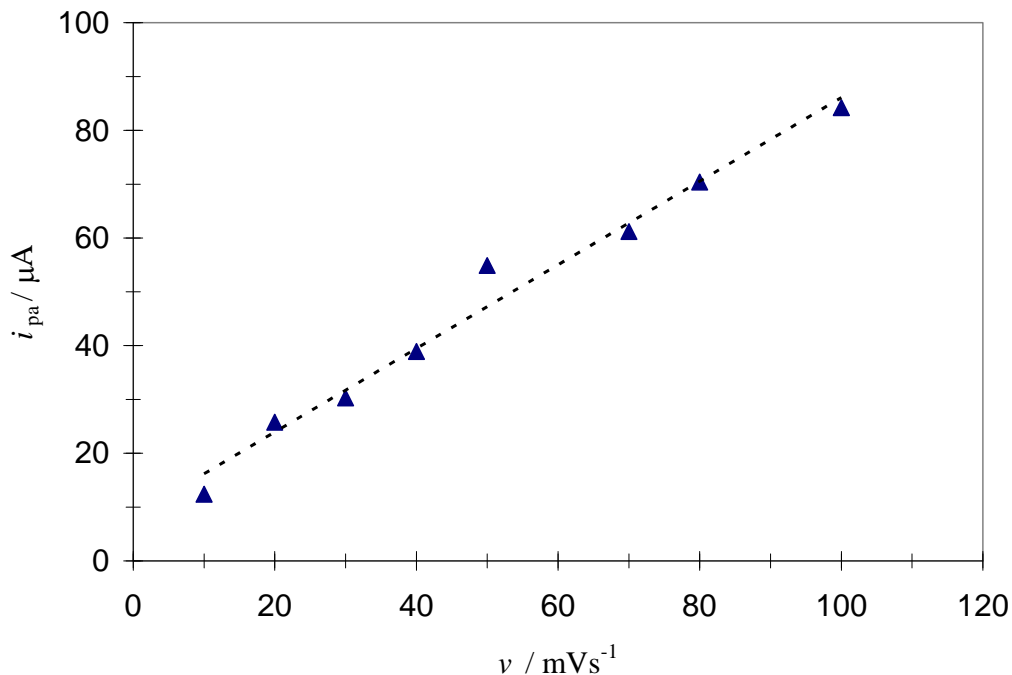
[SDS ] / mM	$E_{p,c}$ /mV	$E_{p,a}$ / mV	$\Delta E$ / mV	$i_{p,a}$ / $\mu A$	$-i_{p,c}$ / $\mu A$	$-i_{p,c} / i_{p,a}$	$10^2 k^o$ / $cm s^{-1}$
0	171	579	408	14.9	7.09	0.48	0.3*
0.075	371	509	138	20.48	10.89	0.53	2.8*
0.5	415	475	60	27.06	17.72	0.65	8.6*
5	431	469	38	38.95	40.75	1.00	82**

\* Estos valores fueron simulados a partir de los datos experimentales de  $E_p$  vs.  $\ln(v)$ , obtenidos para cada [SDS], y usando las ecuaciones: (5.1) y (5.2).

\*\* Estimados de las ecuaciones (5.7) y los valores experimentales  $\Delta E_p$  ver Tabla 5.3, a  $40 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 5.10. VC experimentales en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M, registrados a diferentes velocidades de barrido.**



**Figura 5.11.** Variación de  $i_{pa}$  como función de  $v$  en el sistema  $2.5 \times 10^{-4}$  M DA con SDS 5 mM. Los triángulos corresponden a los datos experimentales mientras que la línea punteada corresponde al ajuste lineal.

Murray y col. [5.43, 5.44], desarrollaron una teoría de la cinética de la superficie de monocapas inmovilizadas sobre el electrodo por VC, basada en la relación de velocidad de energía libre Marcus. En esta teoría, la estimación de la constante de velocidad,  $k^0$ , puede ser hecha a partir de  $\Delta E_p$  experimental, esta teoría sigue el modelo de Marcus-DOS, la cual toma en cuenta los estados electrónicos en el metal del electrodo, por la integración de la ecuación de Marcus, sobre estos estados como se muestra a continuación

$$k_{\eta} = \mu \rho k_B T \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\exp \left[ - \left( x - \frac{(\lambda \pm \eta)}{k_B T} \right)^2 \left( \frac{k_B T}{4\lambda} \right) \right]}{1 + \exp(x)} dx \quad (5.6)$$

Donde  $k_{\eta}$  es la constante de velocidad en el electrodo sobre el potencial  $\eta$ ,  $\lambda$  es reorganización de la energía y el factor pre-exponencial incluye la distancia dependiente

de parámetros acoplamiento electrónico  $\mu$ , y la densidad de los estados electrónicos en el metal del electrodo,  $\rho$ , los VC fueron simulados digitalmente basados en la ecuación 5.6 asumiendo que  $\lambda = 0.85$  como valor del agua para desarrollar las curvas a ( 298 K ) de  $\Delta E_p$  vs.  $\log (v/k^0)$  donde  $v$  es la velocidad de barrido y  $k^0$  es la velocidad de transferencia de electrones estándar a sobre potencial cero. Estas curvas de trabajo, las cuales son relativamente insensibles a  $\lambda$ , ver tabla 1 en [5.43], fueron usadas para obtener el valor experimental  $k^0$  a partir de los datos experimentales  $\Delta E_p$ . La ecuación (5.7) es una aproximación de las curvas de trabajo para  $\Delta E_p > 10$  mV.

$$\Delta E_p = 201.39 \log \left( \frac{v}{k^0} \right) - 301.78 \quad (5.7)$$

A partir de los valores experimentales de  $\Delta E_p$ , tabla 5.3, y la ecuación (5.7) los valores de  $k^0$  para la reacción electroquímica de DA (R5.1) fueron determinados y también reportados en la tabla 5.3. Para este sistema donde la adsorción es fuerte donde los reactivos y productos están involucrados y ( $E_{FWHM}$ ) debería corresponder a la ecuación 5.8. A partir de esta ecuación los datos experimentales y las medidas de  $E_{FWHM}$ , tabla 5.3, el número de la transferencia,  $n$ , en la reacción electroquímica fue estimado, tabla 5.3. Una vez más se encontró que la oxidación de la DA aún en presencia de SDS, corresponde a (R5.1).

$$E_{FWHM} = 90.6 / n \quad (5.8)$$

**Tabla 5.3. Variación de parámetros voltamperométricos obtenidos de los gráficos de la figura 5.10 como una función de la velocidad de barrido. La constante heterogénea ( $k^0$ ) y el número de electrones transferidos ( $n$ ), estimados usando las ecuaciones (5.7), y (5.8), se reportan en esta tabla.**

$v$ / $\text{mVs}^{-1}$	$\Delta E_p$ / $\text{mV}$	$E_{\text{FWHM}}$ / $\text{mV}$	$n$	$k^0$ / $\text{s}^{-1}$
10	18	120	0.8	0.26
20	28	100	0.9	0.46
30	28	80	1.1	0.69
40	38	80	1.1	0.82
50	48	90	1.0	0.92
70	48	90	1.0	1.28
80	48	90	1.0	1.47
100	68	100	0.9	1.46

Considerando el comportamiento de los VCs obtenidos a la  $[\text{SDS}] = 5\text{mM}$ , ver figura 5.10 y considerando el caso donde las especies son adsorbidas [5.29, 5.40, 5.45] la ecuación (5.9) se propone para describir el comportamiento experimental de las curvas  $i$ - $E$ .

$$i = \frac{n^2 F^2 v A \Gamma_o^* (b_o / b_R) \exp\left[\frac{(nF / RT)(E - E^{0'})}{RT}\right]}{\left\{1 + (b_o / b_R) \exp\left[\frac{(nF / RT)(E - E^{0'})}{RT}\right]\right\}^2} \quad (5.9)$$

Donde el potencial se refiere a las especies no adsorbidas,  $\Gamma_o^*$  es la superficie completamente cubierta,  $b_o$  y  $b_R$  son relacionadas con la energía libre  $\Delta G_{ads}^0$  en las ecuaciones (5.10) y (5.11)

$$b_o = \exp(-\Delta G_{ads,o}^0) \quad (5.10)$$

$$b_R = \exp(-\Delta G_{ads,R}^0) \quad (5.11)$$

El potencial y la corriente de pico son:

$$E_p = E^{0'} - \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln\left(\frac{b_o}{b_R}\right) \quad (5.12)$$

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_O^* \quad (5.13)$$

Sustituyendo ecuaciones (5.12) y (5.13) en (5.9) se produce la ecuación (5.14)

$$i = \frac{4i_p (b_O / b_R) \exp\left[\frac{nF}{RT}(E - E^{0'})\right]}{\left\{1 + (b_O / b_R) \exp\left[\frac{nF}{RT}(E - E^{0'})\right]\right\}^2} \quad (5.14)$$

Una forma parametrizada de la ecuación (5.14) es la ecuación (5.15)

$$i = \frac{P_1 P_2 \exp\left[P_3(E - P_4)\right]}{\left\{1 + P_2 \exp\left[P_3(E - P_4)\right]\right\}^2} \quad (5.15)$$

Donde:

$$P_1 = 4i_p \quad (5.16)$$

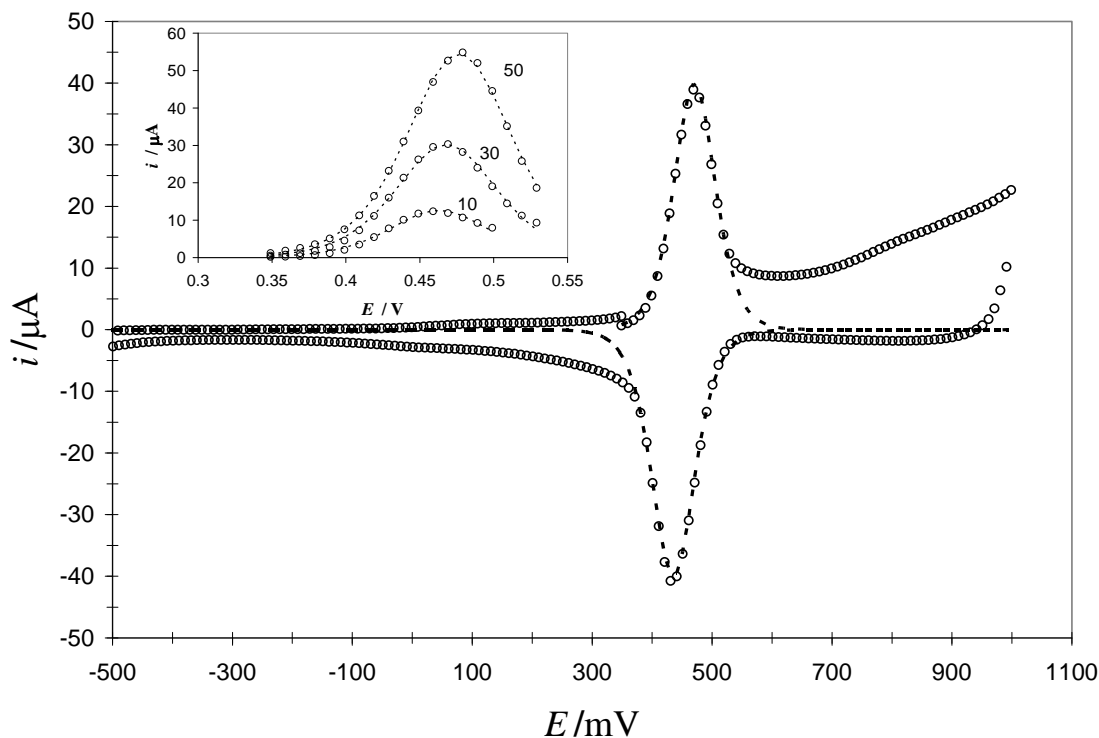
$$P_2 = \frac{b_O}{b_R} \quad (5.17)$$

$$P_3 = \frac{nF}{RT} \quad (5.18)$$

$$P_4 = E^{0'} \quad (5.19)$$

La figura 5.12 muestra una comparación de algunos VCs experimentales obtenidos con el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M a diferentes velocidades de barrido de potencial, ver figura 5.10, y su correspondiente VC teórico generado por un ajuste no lineal ecuación (5.15). A partir de esta figura se concluye que el modelo el cual está basado en la ecuación (5.9) puede describir adecuadamente los datos experimentales y que cuando el SDS está presente en el sistema en concentraciones mayores a la CMC, la forma reducida y oxidada de la DA, ver (R5.1),

son fuertemente adsorbidas. Además es posible concluir que la  $\Delta G_{ads,O}^0 < \Delta G_{ads,R}^0$  y se confirma el número de electrones transferidos, tabla 5.4.



**Figura 5.12.** Comparación experimental de CV (○) obtenidos en el sistema EPC/ NaCl 0.1 M, HCl 0.01 M (pH 2.10), a SDS 5 mM, DA  $2.5 \times 10^{-4}$  M a velocidad de barrido de  $40 \text{ mV s}^{-1}$  ver figura 5.10, VC teórico (línea discontinua) generados mediante el ajuste no lineal ecuación (5.15). El inserto muestra la comparación de comportamiento anódico de los VC a diferentes velocidades de barrido, los mejores parámetros obtenidos del ajuste se reportan en la tabla 5.4.

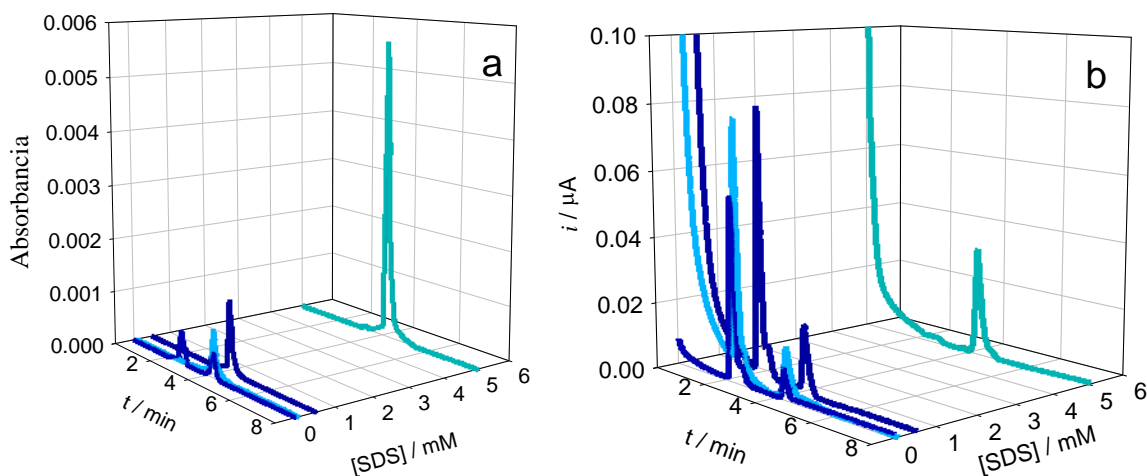
**Tabla 5.4.** Parámetros del mejor ajuste, obtenidos por el ajuste no lineal ecuación (5.15) para el comportamiento anódico de VCs, en la figura 5.10 obtenida a diferentes velocidades de barrido.

$V / \text{mVs}^{-1}$	$P_1 / \mu\text{A}$	$P_2$	$P_3 / \text{V}^{-1}$	$P_4 / \text{V}$	$n^*$
10	50	1.29	44.46	0.47	1.1
30	120	10.58	43.60	0.52	1.1
40	160	0.53	43.67	0.45	1.1
50	220	4.23	42.37	0.51	1.1

\* Calculada a partir del parámetro  $P_3$

### 5.3.2.3 Estudio cromatográfico.

La figura 5.13 muestra los cromatogramas obtenidos después de realizar una macroelectrólisis a una solución de DA con diferentes [SDS] usando dos tipos de detector, es posible notar que la para [SDS] < CMC varios productos pueden ser detectados con diferentes tiempos de retención ( $t_r$ ), sin embargo, cuando [SDS] > CMC solo un producto es detectado a  $t_R = 4$  min. Considerando lo anterior uno podría concluir que este producto podría corresponder a la forma de semiquinona de la DA (DASQ), ver reacción (R5.1). Li y Christensen [5.37], han encontrado por análisis en HPLC usando un detector electroquímico, y una columna 3 mm ODS con mezcla de amortiguador de citratos (pH 3.0), EDTA y acetonitrilo como fase móvil, la DASQ fue observada a  $t_R$  de 3.7 min. El producto detectado a  $t_R = 2$  min para [SDS] < CMC puede ser relacionado con la (R5.9).



**Figura 5.13.** Cromatogramas experimentales obtenidos de una solución de DA  $1 \times 10^{-4}$  M con diferentes [SDS] después de aplicar diferentes potenciales de oxidación, dependiendo de la concentración de SDS para producir la misma densidad de corriente para cada solución, durante 5 min usando diferentes detectores (a) espectrofotométrico, a longitud de onda constante ( $\lambda = 480$  nm) y (b) Electroquímico a potencial constante ( $E = 315$  mV).

#### 5.4. Conclusiones

A partir de los resultados se concluye que el mecanismo de oxidación de la DA en ausencia de SDS sigue la reacción (R1.5) la cual involucra la formación de la DASQ, seguida de una cinética lenta, el proceso es cuasireversible y está controlado por difusión tiene un reacción química acoplada concerniente a la ciclización de la DASQ (R5.9) mientras que cuando el  $[SDS] < CMC$ , se encontró que la velocidad de la cinética de transferencia de electrón (R5.1) incrementa, por lo que el proceso se vuelve cuasireversible. Cuando la  $[SDS] > CMC$ , el valor de la constante de velocidad heterogénea estándar,  $k^0$ , incrementa, y el proceso cambia a un procesos controlado por la transferencia de masa, pero limitado por la adsorción de la DA oxidada y reducida.

A partir de los resultados cromatográficos (electroquímicos y espectrofotométricos) se encontró que cuando  $[SDS] > CMC$ , se produce solo la formación de un producto de oxidación correspondiente a semiquinona (R5.1), así puede ser evitada la reacción de ciclización de la DASQ (R5.9).



## CAPÍTULO 6

### DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE DOPAMINA (DA) USANDO DODECILSULFATO DE SODIO (SDS).

#### 6.1. Introducción

La determinación de DA, en presencia de ácido ascórbico, AA, se ha convertido en un esencial diagnóstico para la prevención y el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas. Actualmente, varias técnicas se han utilizado para este objetivo, pero particularmente, hay que mencionar que muchos de los métodos se han diseñado electroquímicos basándose en electrodos modificados [6.1-6.41]. Sin embargo, algunos de estos electrodos son substratos costosos tales como oro [6.1, 6.21, 6.33, 6.41, 6.35] o carbón vítreo [6.5, 6.10, 6.11, 6.16, 6.26, 6.34, 6.38, 6.39], los métodos empleados para modificarlos requieren de gran tiempo en su preparación y son complicados. Recientemente, el uso de nanopartículas ha sido reportado [6.25, 6.26] para lograr una mejor separación entre las señales individuales de AA y DA, una de las desventajas radica en el tiempo de la fabricación y el costo.

Por otra parte el uso de moléculas anfifílicas tales como cloruro del cetilpiridina [6.4], dodecildimetil bromuro de amonio [6.27], bromuro tetraoctil amonio se han empleado para modificar electrodos como pasta de carbón (EPC), mientras que el cobalto-5-nitrosalophen [6.37], y el dodecilsulfato de amonio SDS [6.2] se ha utilizado sobre el electrodo del carbón vítreo, estos electrodos se han usado para la determinación de DA. Wen [6.2] ha investigado el efecto de las micelas en la electroquímica de la DA y encontró que la corriente del pico anódico de la DA aumenta en presencia de micelas de SDS, pero las interferencias con AA no pueden ser eliminadas. Recientemente Zheng y Zhou [6.42] han propuesto el uso de los EPC modificados con SDS, formado por la pre-absorción del SDS para determinar selectivamente la DA en presencia de AA, aún cuando ellos logran separar las señales de DA y AA, se requiere una preconcentración de alrededor de 10 min y una alta concentración de SDS (8 mM), Algunos de los parámetros analíticos para la determinación de DA en presencia de AA asociados con los electrodos modificados antes mencionados se presentan en la tabla 6.1.

**Tabla 6.1. Parámetros Analíticos de algunos electrodos modificados para la determinación de DA, en presencia de AA.**

Referencia	$(E_{AA}-E_{DA})$ / mV	Intervalo Lineal / $\mu\text{M}$	Límite de Detección / $\mu\text{M}$	Sensibilidad / $\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}$
[6.1]	-190	0.3 - 1	0.1	*
[6.2]	-410	5 - 300	3.0	*
[6.3]	-300	0.15 - 135	9.2	0.0407
[6.4]	-320	10 - 100	2.0	*
[6.5]	-190	0.1 - 100	0.1	0.0016
[6.7]	-200	0.8 - 20	0.1	0.0079
[6.8]	-205	200 - 950	15.1	0.0126
[6.11]	-150	0.7 - 5	0.3	*
[6.16]	-250	0 - 10	0.1	*
[6.17]	-210	4 - 500	2.4	0.0420
[6.23]	-200	6 - 800	1.8	*
[6.29]	-100	10 - 100	5.8	0.0074
[6.34]	-225	2.0 - 120	1.4	4.4200
[6.35]	-330	6 - 384	2.3	0.0140
[6.36]	-199	6.2 - 5000	1.0	0.4375
[6.37]	-400	1-100	0.7	0.7000
[6.38]	-195	8 - 285	0.4	0.1814
[6.39]	-200	2 - 80	0.3	0.0950
[6.41]	*	20 - 800	6.0	0.2000

Como se puede observar, existe una amplia variación en los parámetros dependiendo del electrodo usado, por ejemplo el límite de detección varía de 0.1 a 15.1  $\mu\text{M}$ , mientras que la sensibilidad varía de 0.0074 a 4.42  $\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}$ , es importante resaltar que la mayoría de estos electrodos fueron empíricamente propuestos sin haber un mecanismo claro que soporte como se está llevando a cabo la determinación en cada caso.

Considerando lo antes mencionado y los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde se mostró que la transferencia de carga de la reacción para la oxidación electroquímica de la DA se incrementa cuando el SDS está presente en solución y que cuando  $[\text{SDS}] > \text{CMC}$ , la oxidación de DA es controlada por una reacción de adsorción, en este capítulo se mostrará el utilidad de los agregados micelares de SDS como agente enmascarante, para diseñar un método de análisis cuantitativo para DA en presencia de AA usando voltamperometría diferencial de pulso (VDP) empleando para ello un EPC. También se mostrará que esta nueva metodología tiene parámetros similares a los

electrodos previamente reportados en la literatura para la cuantificación de DA, pero en este caso la modificación del electrodo es de una manera mas fácil y menos costosa.

## **6.2. Método Experimental.**

### **6.2.1. Metodología**

El pH fue ajustado a 3.0 con HCl (36%) de Merck, las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno y preparadas frescas para cada determinación, éstas se protegieron de la luz durante toda la experimentación.

### **6.2.2. Instrumentación**

Las determinaciones electroquímicas fueron llevadas a cabo con un Autolab PGSTAT 30 potentiostato–galvanostato. Se uso una celda típica de tres electrodos (ver Apéndice 3), electrodo de pasta de carbón EPC, como electrodo de trabajo. Éste fue preparado usando una mezcla de grafito; Johnson Matthey 1  $\mu\text{m}$ , 99.9% con nujol; mas detalles ver Ramírez-Silva [6.43, 6.44]. Un alambre de platino (BAS MW-1032) como contra electrodo, y un electrodo de Ag/AgCl (BAS MF-2052) como electrodo de referencia al cual todas las mediciones en este trabajo están referidas.

Las lecturas de pH fueron hechas con un potenciómetro LPH 430T pH-METER acoplado a un electrodo combinado de vidrio CORNING (intervalo pH 0–14).

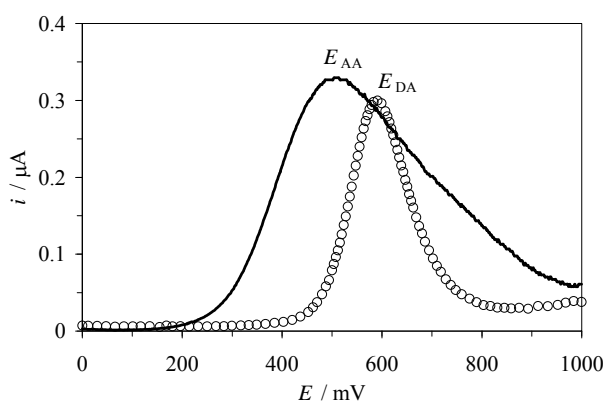
### **6.2.3. Procedimiento.**

El comportamiento electroquímico de la DA y AA fueron estudiados por VDP en el sistema EPC/0.1M NaCl, xM SDS donde  $x \in (0 \text{ a } 3 \text{ mM})$ , los VDPs fueron obtenidos en la ventana de potencial de 0 a 1000 mV, el sistema se mantuvo con atmósfera de nitrógeno y temperatura ambiente aplicando una amplitud de pulso de 50mV in todos los casos.

### 6.3 Caracterización Electroquímica de la DA y AA usando EPC

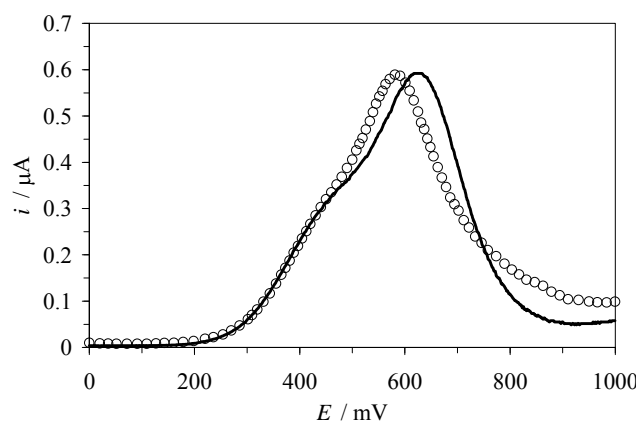
#### 6.3.1. Sin SDS en solución

La figura 6.1 muestra la comparación de los dos VDP obtenidos con los sistemas (o) EPC/ NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM (pH 3) y (—) EPC/ NaCl 0.1 M, AA 0.28 mM (pH 3.0). En esta figura es posible observar que el potencial del pico correspondiente a AA ( $E_{AA}$ ) aparece en 503 mV, mientras que el potencial del pico correspondiente a DA ( $E_{DA}$ ) esta en 593 mV. Aún cuando la diferencia entre  $E_{AA} - E_{DA}$  es  $-90\text{mV}$  puede observarse que existe un traslapamiento en las señales de los picos AA y DA casi del 100%.



**Figura 6.1 VDP obtenidos con los sistemas (o) EPC/ NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM (pH 3.0) y (—) EPC/NaCl 0.1 M, AA 0.28mM (pH 3.0)**

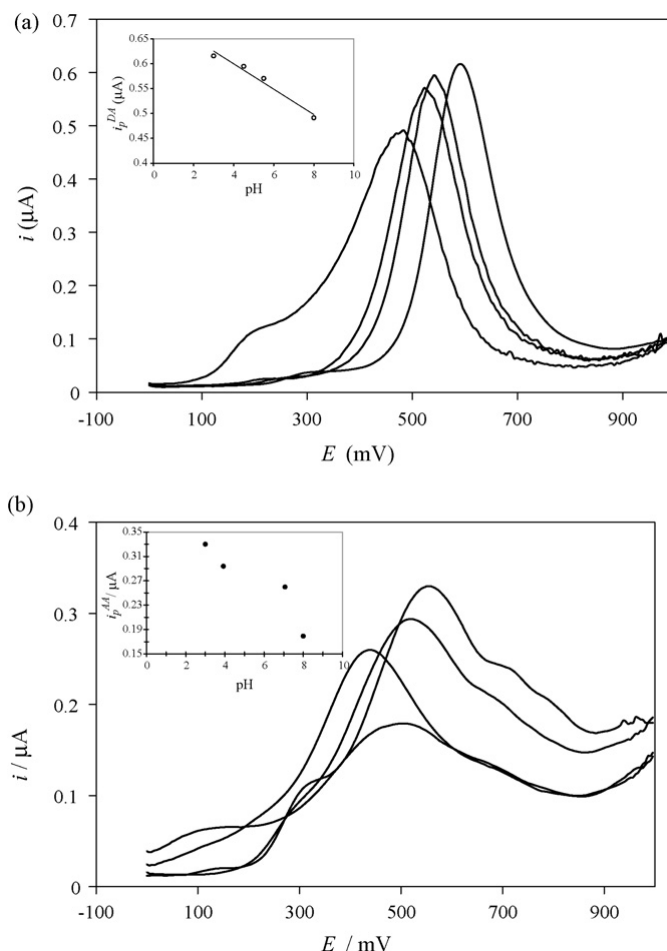
Con el fin de verificar la interferencia del AA sobre la señal de DA, se obtuvo el VDP de una solución que contenía una mezcla de ambas especies, el resultado se muestra en la figura 6.2 y se compara con la suma de los VDP de AA y DA obtenidos individualmente mostrado en la figura 6.1. Ambos VDP muestran una tendencia similar.



**Figura 6.2.** Comparación de VDP obtenidos con el sistema EPC/NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM y AA 0.28 mM, a pH 3 (—) con el VDP (o) obtenido de la suma de las señales de las especies individuales correspondiente a figura 6.1.

### 6.3.2. Influencia del pH

A pH 0 es bien sabido que el pico oxidación de la DA y el AA son diferentes lo que permite la determinación simultánea sobre un electrodo de carbón vítreo, sin embargo los parámetros analíticos son pobres pues tienen principalmente alto límite de detección y baja sensibilidad. Por otra parte, se podría concluir de la figura 6.2 que se tiene problema con el electrodo de pasta de carbón ya que los picos de AA y DA no son resueltos. Con el fin de verificar la influencia del pH sobre el potencial del pico de oxidación de DA y AA sobre el EPC se obtuvieron las gráficas de la figura 6.3, a partir de la cual es posible notar que cuando el pH incrementa, el potencial del pico y la corriente disminuyen, es relevante mencionar que la mejor respuesta para la oxidación de DA usando el EPC se obtiene a pH 3.0

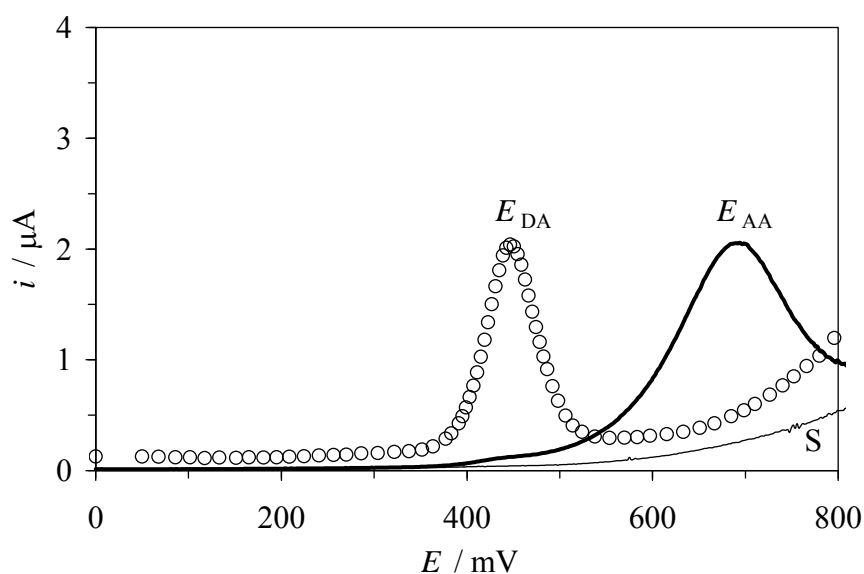


**Figura. 6.3.** VDP obtenidos del sistema (a) EPC/NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM y (b) EPC/ NaCl 0.1M, AA 0.10 mM a diferentes pH. Velocidad de barrido  $50\text{mVs}^{-1}$ . Curva de la corriente de pico de DA (a) de AA (b) vs. pH.

Los resultados hasta ahora muestran que el uso de un electrodo convencional para la determinación de DA en presencia de AA no es posible, por lo que es necesario el uso de agentes capaces de modificar la superficie del electrodo y mejorar la respuesta de DA en presencia de AA, como se ha mostrado previamente la presencia de SDS en una concentración mayor a la CMC incrementa la velocidad de transferencia de carga heterogénea y el proceso está controlado por adsorción, por lo que el SDS se considera para actuar como un buen agente enmascarante para la determinación selectiva de DA en presencia de AA. Por lo que se propone estudiar la DA en presencia de AA teniendo en solución la formación de micelas de SDS.

### 6.3.3. Con SDS en solución

Para corroborar la presencia de micelas en solución, se trabajó a una concentración de 3 mM de SDS porque esta concentración es más alta que la CMC del SDS, es importante resaltar que en el intervalo de potencial estudiado no se observa ningún proceso de oxidación del SDS (figura 6.4 y 6.5). Nuevamente se obtuvieron los VDPs para DA 0.10 mM y AA 0.28 mM por separado en presencia de SDS 3 mM, estos se presentan en la figura 6.4, bajo estas condiciones el  $E_{DA}$  se ubicó en 450 mV mientras que el  $E_{AA}$  en 689 mV. A diferencia de la señal de DA obtenida sin SDS (figura 6.2) ésta se oxida a un potencial mas bajo por 143 mV, mientras que el AA se oxida a un potencial mayor por 193 mV, resultando una diferencia entre los potenciales de pico de ( $E_{AA} - E_{DA}$ ) de 246 mV. De esta manera la presencia de SDS propicia la separación efectiva de las señales, donde la DA se oxida antes que el AA, por lo que se establece que el SDS favorece la oxidación de DA.



**Figura 6.4.** Comparación de VDP obtenidos con el sistema EPC/ NaCl 0.1M, SDS 3 mM a pH 3 con diferentes especies electroactivas (o) DA 0.10 mM y (—)AA 0.28mM. Velocidad de barrido 20  $mVs^{-1}$ .

De la misma manera que el estudio sin SDS, ahora se hará con una solución que contiene la mezcla de DA y AA, a las mismas condiciones y en presencia de 3 mM de SDS. En la figura 6.5 es posible notar que el  $E_{DA} = 450$  mV mientras que el pico de AA

$E_{AA} = 688$  mV con una separación efectiva de 238 mV, ésta separación es muy grande comparada con de lo reportado en la literatura [6.1, 6.5, 6.11, 6.17, 6.23, 6.29, 6.33, 6.36, 6.38, 6.39].

Otra característica importante de este sistema es que  $E_{AA}$  es más positivo que  $E_{DA}$ , lo cual es muy diferente a lo reportado previamente con otros sistemas en la literatura.

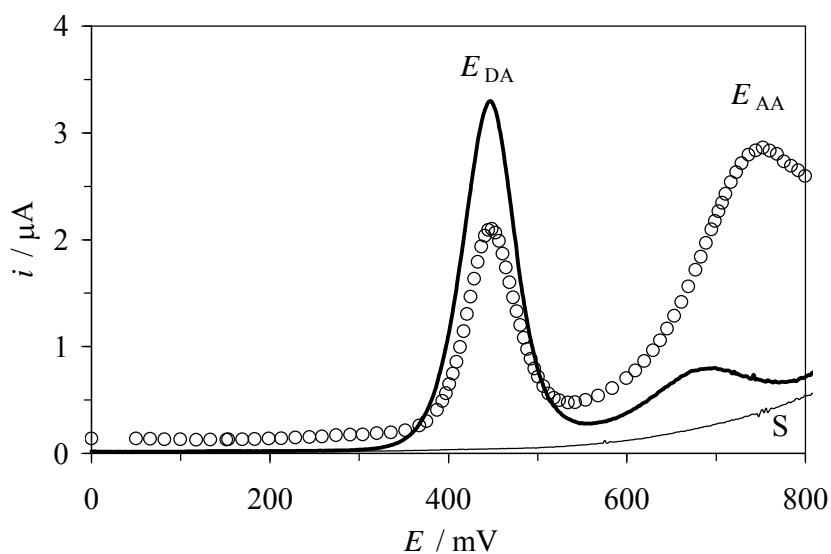


Figura 6.5. Comparación de VDP obtenidos con el sistema EPC/NaCl 0.1 M, DA 0.10 mM y AA 0.28 mM y 3 mM SDS a pH 3.0 (—), VDP (o) obtenido de la suma de las señales de las especies individuales correspondiente a figura 6.4, la línea marcada con S es la señal del surfactante solo.



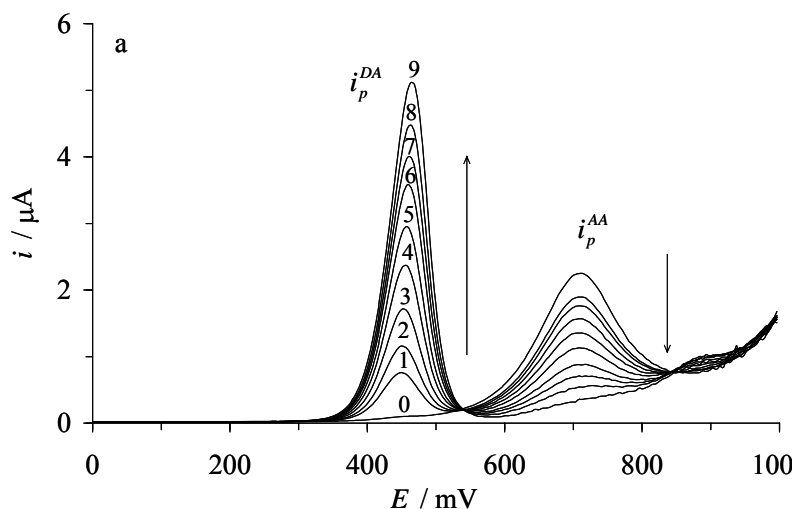


Figura 6.6. (a) VDP obtenidos con el sistema EPC/NaCl 0.1 M, AA 0.8 mM, SDS 3 mM, con diferentes [DA]: (0) 0 mM, (1) 0.02 mM, (2) 0.03 mM, (3) 0.05 mM, (4) 0.07 mM, (5) 0.1 mM, (6) 0.12 mM, (7) 0.16 mM, (8) 0.2mM y (9) 0.24 mM. A velocidad de barrido de  $50\text{mVs}^{-1}$ .

La figura 6.6, muestra los VDP obtenidos con EPC/ NaCl 0.1 M, AA 0.80 mM, SDS 3 mM, x mM DA. y la figura 6.7 muestra el gráfico de la corriente de pico en función de la concentración de DA, obtenida a partir de los VDP figura 6.6. Los parámetros analíticos se muestran en la tabla 6.2, Gráficos similares se obtuvieron para otras concentraciones de SDS, los parámetros analíticos correspondientes se muestran en la tabla 6.2, los resultados sugieren que los parámetros analíticos mejoran cuando se usa la una concentración de SDS 3 mM.

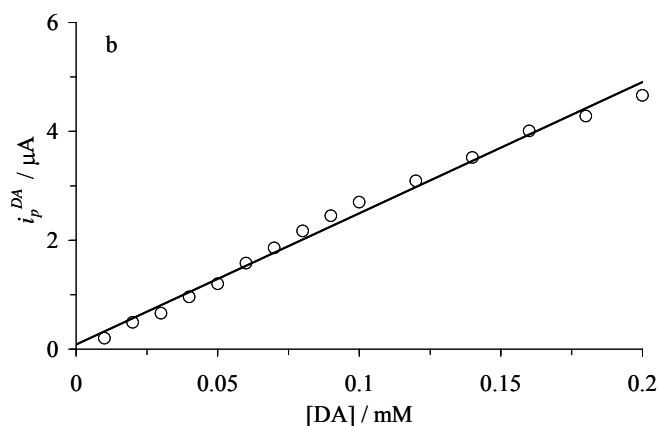


Figura 6.7 Variación de  $i_{DA}$  en función de la [DA] obtenida de los VDP correspondientes a la figura 6.7

**Tabla 6.2. Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibración de DA, para el sistema EPC /NaCl 0.1 M, AA 0.8 mM en función de [SDS].**

[SDS] / mM	Intervalo Lineal / $\mu\text{M}$	Límite de detección / $\mu\text{M}$	Sensibilidad / $\mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}$
1	10 – 200	12	0.0264
2	10 – 200	6	0.03812
3	10 – 200	5	0.04812
5	10 – 100	7	0.0402
10	10 – 100	7	0.0391

#### 6.4. Determinación de DA en un producto farmacéutico

El recobro fue estudiado en solución acuosa que contenía AA 0.8mM, SDS 3mM y NaCl 0.1M (pH 3), se hicieron tres soluciones con concentración de DA, 0.05, 0.1 y 0.2mM. para cada una de ellas se obtuvo el VDP, usando la regresión lineal  $i_p(-A) = 48.1 [\text{DA}] (\text{mM}) + 0.074$  obtenida de la curva de calibración correspondiente a la figura 6.7, se obtuvieron los siguientes valores 0.049, 0.098 y 0.19 mM. Así el recobro fue 97, 98 y 99%, respectivamente.

Para el fármaco se utilizó una solución inyectable de clorhidrato de DA (Laboratorios Kendrick, de contenido 200 mg de DA/5 ml) la muestra fue diluida tomando 100 $\mu\text{l}$  en 10ml de 0.1M NaCl solución acuosa a pH 3 ajustando con HCl, de ésta, se tomó una alícuota de 200 $\mu\text{L}$  y se adicionó a una celda electroquímica que contenía 10ml de NaCl 0.1M, SDS 3mM, AA 0.8mM (pH 3.0) en solución acuosa, posteriormente se obtuvo el VDP (figura 6.9) usando EPC, la concentración de DA fue determinada a partir del valor de  $i_{\text{DA}}$  del VDP de la figura 6.6 y usando la curva de calibración figura 6.7, este procedimiento se repitió 5 veces para el fármaco antes mencionado así como para el fármaco obtenido de laboratorios Tecnofarma. Los resultados se muestran en la tabla 6.3.

**Tabla 6.3. Recobro de DA y determinación en fármacos en presencia de AA.**

DA muestra / inyectable	DA concentración /etiqueta / M	DA encontrada / M	Recobro %
Kendrick	0.21	0.204 ± 0.005	98%
Tecnofarma	0.21	0.203 ± 0.003	97%

Los resultados son expresados como un valor de  $\pm$  S.D. basado sobre 5 repeticiones. Con un intervalo confianza: 95%.

### 6.5 Conclusiones

Estos resultados fueron satisfactorios y mostraron que este método puede ser eficazmente utilizado para la detección de DA en fármacos como los inyectables.

Con este estudio se mostró que las micelas de SDS pueden actuar como un agente enmascarante para la determinación selectiva de DA en presencia de AA. Las micelas de SDS hacen posible la separación de las señales de AA y DA, esto puede ser asociado con un efecto catalítico de la AA sobre la DA, lo cual favorece la separación electroquímica de las señales y facilita la determinación de la DA cuando el AA está presente en solución.

Los resultados se muestran favorables para el uso de este método en determinación de DA en fármacos.

## CAPÍTULO 7

### ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA DOPAMINA SOBRE UN ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO

#### 7.1. Introducción.

En las últimas décadas muchas de las investigaciones se han enfocado a mejorar la determinación de la Dopamina (DA), [7.1] por lo que diversos métodos se han empleado para la detección y determinación de dicho neurotransmisor, los métodos cromatográficos [7.2, 7.3, 7.4, 7.5] y electroquímicos [7.6, 7.7] son los más utilizados, siendo estos últimos los más acertados por su alta sensibilidad y selectividad, otra de las ventajas que poseen estos métodos, es que las mediciones pueden ser hechas de manera directa, por otra parte el empleo de electrodos permite diseñarlos convenientemente para determinaciones “*in situ*”.

Otras de las ventajas que ofrecen los métodos electroquímicos en la determinación de este tipo de moléculas, es que pueden resolver el problema de las interferencias que se tenga con otros analitos, esto es gracias al desarrollo de electrodos modificados [7.8], los cuales se busca que tenga alta conductividad, un amplio intervalo de potencial de trabajo, alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad.

Los electrodos de carbón son a la fecha los más utilizados por sus propiedades electroquímicas, ya que son inertes químicamente, tienen un amplio intervalo de potencial, baja corriente en el blanco y son apropiados para diversos tipos de analitos [7.9-7.12], dentro de éstos, los más populares son los electrodos de carbón vítreo (ECV) y pasta de carbón (EPC), es por ello que diversas investigaciones se han enfocado al desarrollo de métodos analíticos basados en técnicas electroquímicas y en el desarrollo de electrodos modificados, para el estudio de biomoléculas como lo es la DA.

Es por ello que en este capítulo, se estudia el comportamiento electroquímico de la Dopamina (DA) y del Ácido Ascórbico (AA) por voltamperometría cíclica (VC), se

hace la detección de DA por amperometría, se analiza la respuesta de DA en presencia de AA por VC, empleando primero, un electrodo de carbón vítreo (ECV) y posteriormente modificándolo con nanotubos de carbón de multipared (MWCNT).

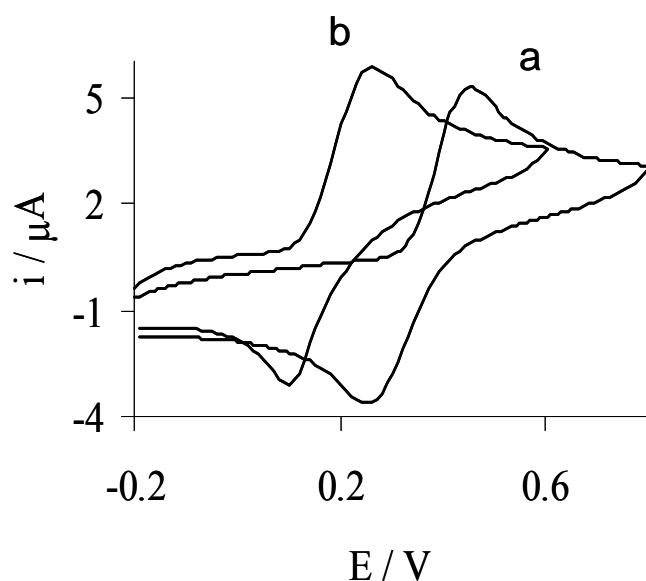
Este estudio tiene como propósito caracterizar el comportamiento electroquímico de las especies DA y AA con el fin de diseñar un método de análisis cuantitativo para DA en presencia de AA.

El estudio electroquímico de la DA se presenta para valores de pH 3.4 y 7.4, a estas condiciones esta presente la especie totalmente protonada ( $H_3DA^+$ ), sin embargo como se ha estudiado en el capítulo 3.1, la especie es más inestable a medida que se incrementa el pH, considerando lo anterior se decide trabajar a pH 3.4 donde la especie es más estable, además de que la mayoría de las investigaciones frecuentemente se hacen a este valor de pH ya que puede resultar ventajoso cuando se realiza el estudio con algunos interferentes como el ácido ascórbico. Por otra parte ya que las condiciones fisiológicas son a pH 7.4, se analiza el comportamiento electroquímico a estas condiciones para decidir el que ofrezca ventajas en la determinación analítica.

## **7.2. Estudio electroquímico DA en Electrodo de Carbón Vítreo (ECV).**

### **7.2.1. Comportamiento Voltamperométrico, pH 7.4 y 3.4.**

La figura 7.1 muestra el VC de la DA, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, a pH =3.4 y pH = 7.4, obtenido con el ECV, como electrodo de referencia un electrodo Ag/AgCl y como contra electrodo un alambre de platino (Anexo B). La DA muestra un comportamiento cuasi-reversible en ambos casos, la diferencia entre del potencial del pico anódico ( $E_{pa}$ ) y el potencial del pico catódico ( $E_{pc}$ ) a pH 3.4 es de  $\Delta E_p = 262\text{mV}$  y a pH 7.4 es de  $\Delta E_p = 151\text{mV}$ , a la velocidad de barrido de  $0.1\text{Vs}^{-1}$ , por lo que el proceso es más reversible a pH 7.4 que a pH 3.4.



**Figura 7.1.** Voltamperogramas cíclicos de 0.2 mM de DA en 0.01 M solución amortiguadora de fosfatos a) pH=3.4 y b) 7.4, ECV, pretratamiento con 10 barridos sobre el blanco y adicionando DA

La tabla 7.1 muestra los valores de los potenciales de pico anódico y catódico, así como la razón entre las corrientes de pico, de esta tabla se puede observar que a pH 7.4 el proceso de transferencia de electrones es más rápido, ya que el pico de oxidación se presenta a potenciales más negativos que a pH 3.4.

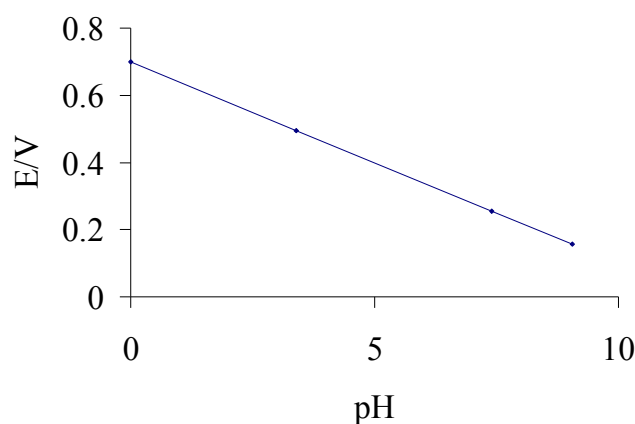
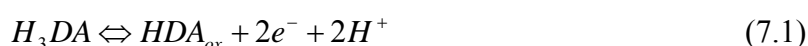
**Tabla 7.1.** Valores de potenciales del pico anódico y catódico de 0.1mM de DA a pH = 3.4 y pH 7.4 con ECV.

pH	$E_{pa}$ / mV	$E_{pc}$ / mV	$\Delta E$ / mV	$I_{pa}/I_{pc}$
3.4	495	233	262	0.982
7.4	253	102	151	0.781

El comportamiento electroquímico de la DA a pH de 3.4, muestra que el potencial del pico anódico se encuentra en un valor de 495 mV, mientras que para pH 7.4 es de 253 mV, este comportamiento puede ser debido a que como la reacción electroquímica depende del pH cuando este aumenta se favorece el proceso de oxidación.

Si se traza el diagrama de Pourbaix para este intervalo considerando el valor de potencial obtenido a pH 3.4 se obtiene el comportamiento de la figura 7.2 con una pendiente de 0.06 V por década de pH y una ordenada al origen de 0.699 V, en este

gráfico se obtiene un potencial de 0.255V para el pH de 7.4 que es prácticamente igual al obtenido experimentalmente, lo que corrobora la hipótesis de que el potencial disminuye a medida que el pH se incrementa, correspondiente al equilibrio 7.1., los cálculos sólo consideran el  $E_{pa}$ , ya que pareciera que la especie química que se encuentra en la superficie del electrodo al reducirse no corresponde a la formada en el primer proceso electroquímico de oxidación, porque al calcular este comportamiento con el potencial de equilibrio de los dos sistemas (semisuma de potenciales de pico de oxidación y reducción), no se obtiene la pendiente de 0.03 V.



**Figura 7.2. Diagrama de Pourbaix para la especie de H<sub>3</sub>DA<sup>+</sup>**

Con el fin de caracterizar el proceso que sigue la DA se realiza el estudio de velocidad de barrido de potencial.

Los VC en función de la velocidad de barrido ( $v$ ) de la DA a pH 3.4 y 7.4 se presentan en la figura 7.3, donde se observa que la velocidad influye sobre la posición del pico de oxidación  $E_{pa}$ , ya que se desplaza hacia potenciales más positivos a medida que aumenta la velocidad de barrido, mientras que el pico de reducción,  $E_{pc}$ , se desplaza hacia potenciales más negativos en ambos casos, el desplazamiento de los picos es de 30 mV y 170 mV a pH 3.4 y 7.4 respectivamente, cuando la velocidad se incrementa 10 veces.

La corriente de pico anódico se incrementa linealmente con la raíz de la velocidad. El coeficiente de correlación lineal es de 0.992 a pH 3.4, así el proceso está controlado por difusión.

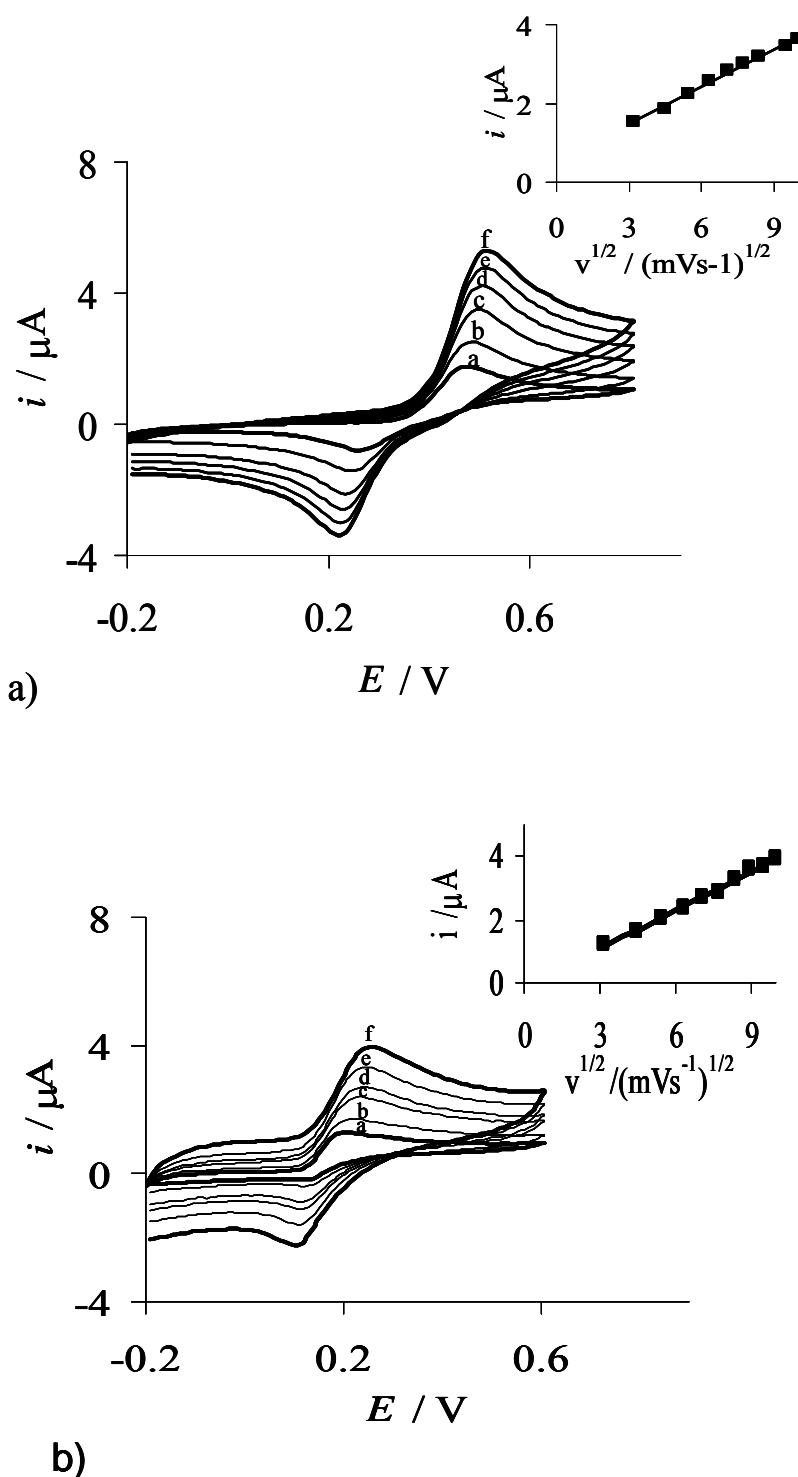
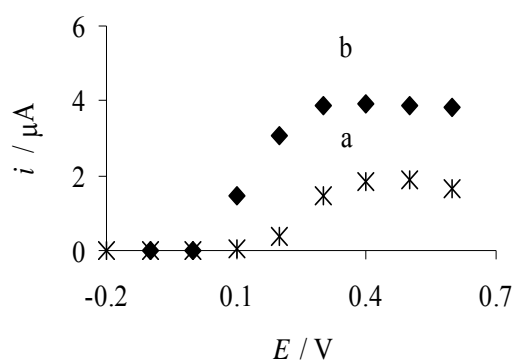


Figura 7.3. Voltamperogramas cíclicos típicos de DA 0.1 mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a) pH 3.4 y b) 7.4 a diferentes velocidades de barrido: a=0.01, b=0.02, c=0.04, d=0.06, e=0.08, y f=0.1V. Electrodo de trabajo: ECV. Los gráficos en los recuadros muestran la relación funcional de la corriente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.



Por otra parte, la voltamperometría hidrodinámica para la DA a 0.1 M a pH 3.4 (figura 7.4a) y 7.4 (figura 7.4b), obtenida con el ECV, muestra que a potenciales menores de 200 mV (pH 3) y 100 mV (pH 7) no hay procesos electroquímicos, sin embargo a potenciales mayores existe un incremento gradual en la respuesta, por lo que el electrodo ECV responde a la oxidación de DA en un intervalo de potencial entre 200-400 mV a pH 3.4 y 100-300 mV a pH 7.4, lo que concuerda con el comportamiento en la VC. Por lo que para la detección amperométrica se aplicará un potencial de 0.3 V, donde la respuesta del electrodo alcanza el máximo y se mantiene estable.

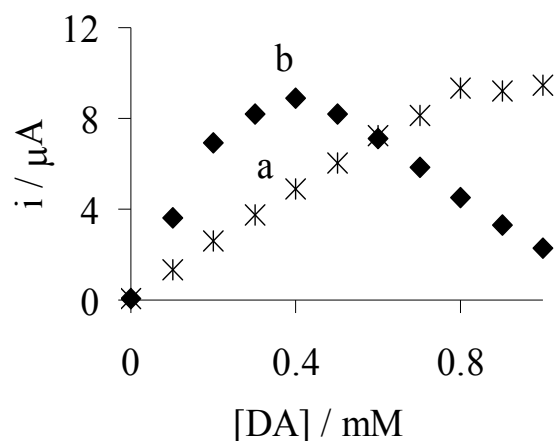


**Figura 7.4.** Voltamperogramas hidrodinámicos de 0.1 mM de DA con ECV a) pH = 3.4 y b) pH=7.4 en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mM.

### 7.2.2 Cuantificación amperométrica de DA con ECV.

El ECV fue usado para la determinación de DA a pH = 3.4 y pH = 7.4, la respuesta amperométrica a la oxidación de DA fue estudiada, ésta se presenta en la figura 7.5, donde se muestra la curva típica de corriente-concentración para adiciones continuas de DA en el intervalo de 0.01 mM a 0.1 mM, donde es posible apreciar como la respuesta a pH = 7.4 decae drásticamente después de una concentración de 0.04 mM, mientras que a pH = 3.4 se tiene una mejor respuesta, sin embargo para concentraciones de DA 0.8 mM el electrodo se pasiva.

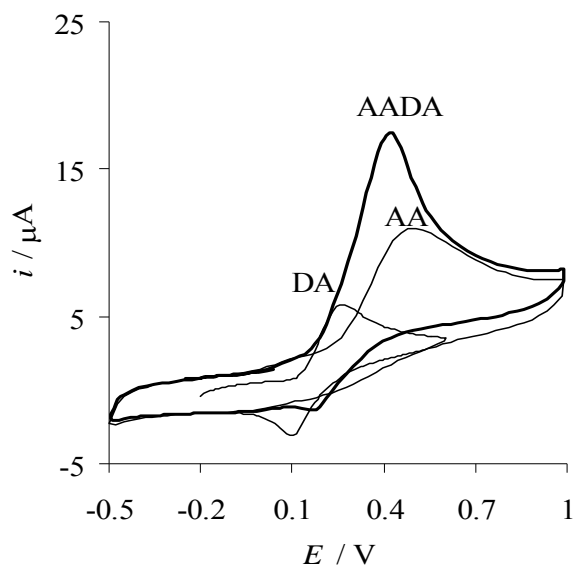
En el intervalo de concentraciones de estudio no hay una correlación lineal en ambos valores de pH, por lo que la detección para DA resulta complicada, sin embargo en el intervalo de concentraciones por debajo de 0.05 mM el coeficiente de correlación mejora y llega a ser del 0.99 para ambos valores de pH.



**Figura 7.5** Curva de Calibración obtenida por amperometría con ECV a) pH = 3.4 el potencial aplicado 0.5 V y b) pH = 7 con potencial aplicado de 0.3 V para adiciones sucesivas de 0.01 mM DA, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M.

### 7.2.3. Estudio de la interferencia DA con AA.

El análisis de DA es frecuentemente afectado por la presencia de otras especies electroactivas, especialmente el ácido ascórbico (AA), el cual se encuentra presente en fluidos biológicos, frecuentemente 10 veces más concentrada que la de la DA, por esta razón es importante estudiar la determinación de DA en presencia de AA. Así se diseñó un experimento donde se estudia la interferencia entre los analitos a pH = 7.4 sobre electrodo de carbón vítreo este estudio se inicia por VC para caracterizar las señales de ambas especies.



**Figura 7.6. Voltamperogramas cíclicos de DA ( $1 \times 10^{-4}$  M), AA ( $8 \times 10^{-4}$  M), Mezcla de DA+AA a concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M (M/M = 1/8) en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH = 7.4 usando un electrodo: ECV**

Los VC de DA  $1 \times 10^{-4}$  M, AA  $8 \times 10^{-4}$  M y la mezcla de DA+AA (M/M = 1/8) usando ECV, se observan en la figura 7.6. Los resultados muestran el pico de oxidación ( $E_{pa}$ ) del AA aparece en  $E_{pa} = 504$  mV, mientras que la DA en  $E_{pa} = 273$  mV. El VC de DA en presencia de AA ocho veces más concentrado muestra un solo pico en  $E_{pa} = 431$  mV. La presencia de AA hace imposible la detección de DA con el uso de este electrodo, cabe señalar que para la determinación de DA en presencia de AA el uso de una técnica amperométrica no sería conveniente, pues ambas especies se oxidan en potenciales muy cercanos.

En resumen, el empleo de ECV para el estudio de DA presentó dificultades, ya que este electrodo requiere de un tratamiento especial de limpieza, pues es fácilmente contaminado con las especies oxidadas que se analizan, lo que no hace viable la determinación de DA, además los límites de detección son altos considerando que en muestras biológicas la DA se encuentra en concentraciones por debajo de  $10 \mu\text{M}$  ya que el electrodo tiende a pasivarse. Por otra parte la determinación de DA en presencia de AA no es posible con este electrodo debido a que las señales de DA y AA se traslapan.

Con el fin de poder determinar DA en presencia de AA se propone modificar la superficie del electrodo con materiales nanoestructurados como nanotubos de carbón de

multipared (MWCNT) y  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), ya que estos permiten mejorar las propiedades electroquímicas como transferencia de electrones, mientras que la presencia de  $\beta$ -CD servirá como agente de reconocimiento a DA, lo que ayudará a resolver el problema con las interferencias.

### 7.3. Electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT/ $\beta$ -CD.

La purificación fue hecha con una solución de 2 M ácido nítrico por 24 hrs. A 25°C de acuerdo al procedimiento descrito por Pérez

El estudio de la pureza de los MWCNT se hizo analizando las trazas de metales mediante la técnica de SEM con sonda de rayos X y se hierro (Fe) níquel (Ni) y potasio (K) 0.5, 1.6, 1.5 % respectivamente, después del tratamiento con ácido nítrico hubo una disminución en el contenido de los metales concerniente a 0.1, 0.9, y 0.4% para cada uno de ellos.

#### 7.3.1. Caracterización de los materiales por SEM

La formación de la película de  $\beta$ -CD-MWCNT (figura 7.7), se realizó con la dispersión de 1 mg de MWCNT en un mililitro de  $\beta$ -CD de concentración  $1 \times 10^{-2}$  M por ultrasonido, esta dispersión se colocó por goteo (30  $\mu$ l) sobre el electrodo de carbón vítreo (ECV), el electrodo se mantuvo a 60°C durante 24 hrs, finalmente se utilizó para hacer la medición.

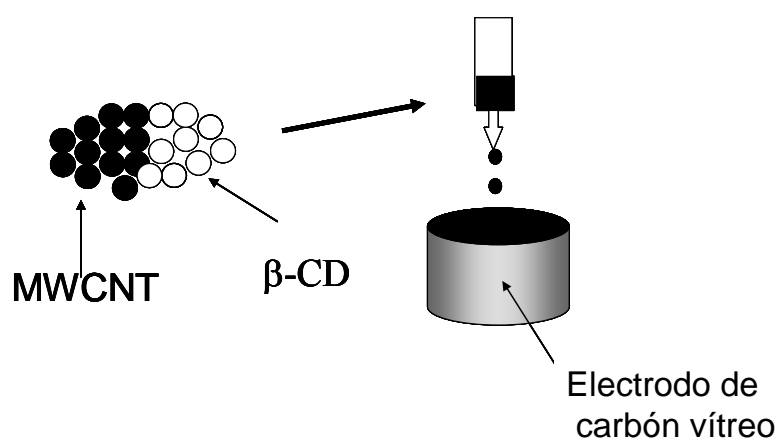


Figura 7.7. Esquema de la preparación del electrodo modificado con MWCNT/ $\beta$ -CD.

La figura 7.8 muestra las imágenes obtenidas por SEM de MWCNT,  $\beta$ -CD, MWCNT/ $\beta$ -CD. Es posible observar la morfología (A) de los MWCNT como tubos, (B) la  $\beta$ -CD como láminas, (C) MWCNT/ $\beta$ -CD como aglomerados, este aspecto puede ser ocasionado a que los MWCNT son cubiertos por la  $\beta$ -CD debido a interacciones electrostáticas [7.20].

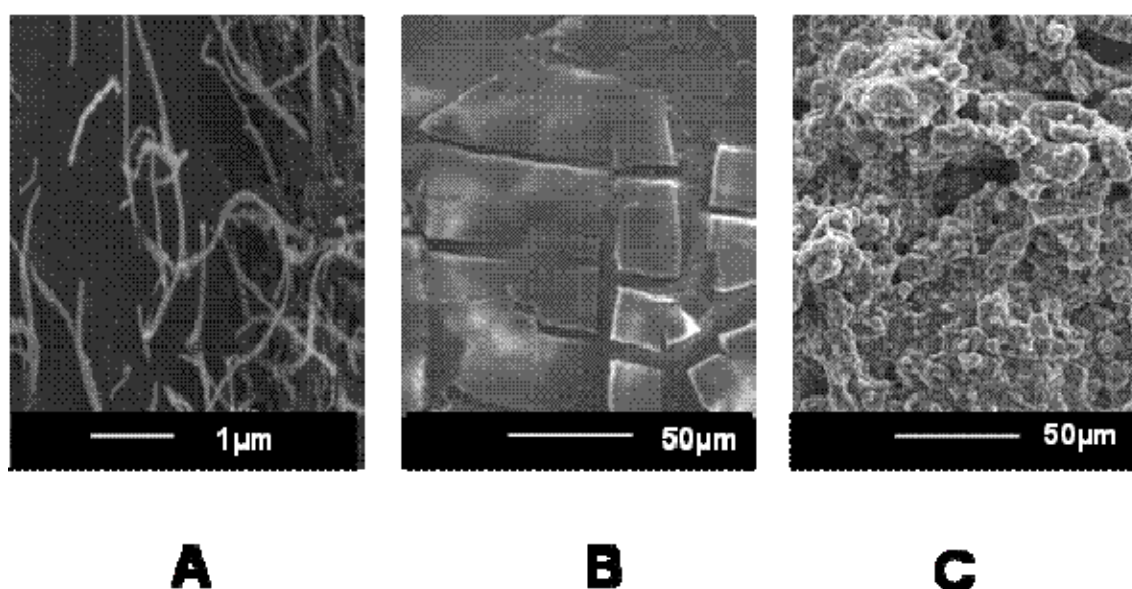


Figura. 7.8. Imágenes SEM de A) MWCNT, B)  $\beta$ -CD y C) MWCNT/ $\beta$ -CD.

La figura 7.9, es un esquema del electrodo usado, es importante mencionar que cantidad de los MWCNT dispersos en  $\beta$ -CD, sobre la superficie del electrodo, es tal, que aún después de lavar el electrodo con agua la película formada permanece. Esto debido a la presencia de MWCNT que permite la adsorción sobre el electrodo.

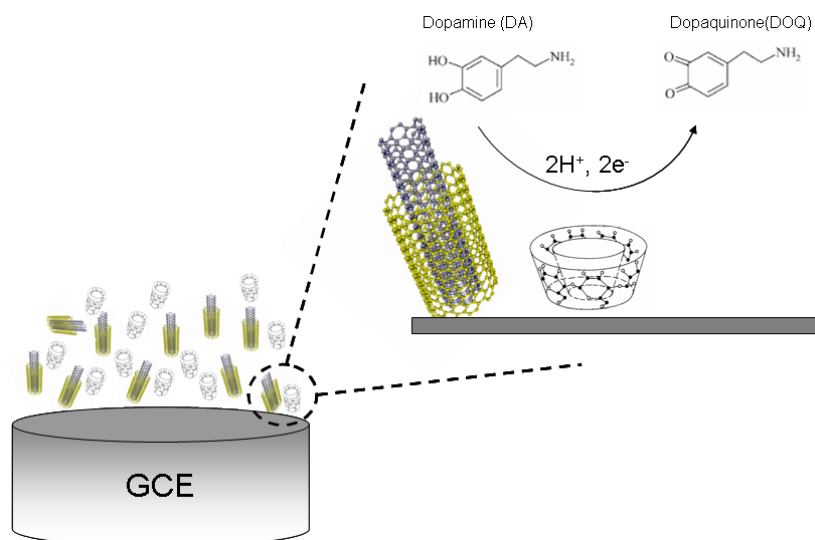


Figura 7.9. Esquema del electrodo modificado con MWCNT/β-CD, y reacción de oxidación de la DA.

### 7.3.2 Estudio de Voltamperometría cíclica para los electrodos modificados con nanotubos de carbón.

Con el fin de mejorar la respuesta de DA, se modificó la superficie del electrodo de carbón vítreo con una película de nanotubos de carbono y β-ciclodextrina (MWCNT/β-CD). En la figura 7.10, se muestra el VC para 0.1 mM DA con el ECV/MWCNT/β-CD en solución amortiguadora de fosfatos a pH =3.4 y 7.4, a la velocidad de barrido de 0.1 V\*s<sup>-1</sup>.

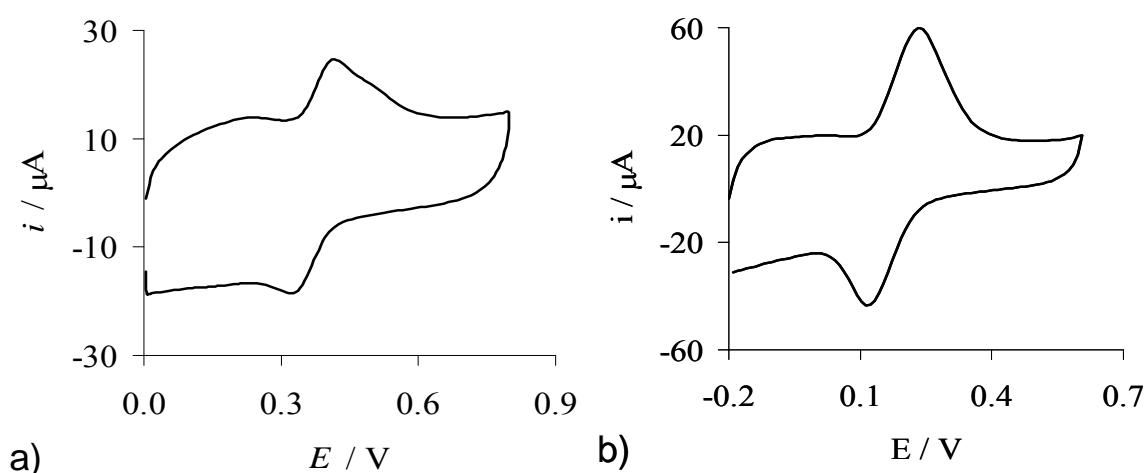


Figura 7.10. Voltamperometría cíclica de 0.1 mM de DA a) pH 3.4 y b) pH 7.4 en solución amortiguadora fosfatos 0.01 M, velocidad de barrido 0.1 Vs<sup>-1</sup>. Electrodo de trabajo: ECV/MWNT/β-CD.

El pico de oxidación de la DA con el electrodo ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD, se presenta a potenciales más negativos comparado con el electrodo ECV, y la diferencia entre el potencial del pico anódico ( $E_{pa}$ ) y el potencial del pico catódico ( $E_{pc}$ ) es  $\Delta E_p = 83$  mV a pH = 3.4 y a pH = 7.4 de  $\Delta E_p = 63$  mV, mientras que la razón entre los picos es de  $i_a/i_c = 0.714$  y  $0.5446$  para pH=3.4 y pH=7.4 respectivamente (ver tabla 7.2), por lo que la película de ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD incrementa el proceso de transferencia de electrones cabe mencionar que la corriente incrementa 10 veces su valor comparada con el electrodo ECV, es decir a pH mayor el  $E_{pa}$  se presenta a potenciales más negativos, por lo que el proceso de transferencia de electrones es más rápido a pH 7.4 que a 3.4. Este comportamiento también se debe al efecto del pH sobre el proceso electroquímico, como se mencionó se presenta en 7.1.1. ya que se calculan los cambios del potencial en función del pH tanto con el  $E_{pa}$  como con el potencial de equilibrio y en ambos casos se obtiene el comportamiento nernstiano con una pendiente de 0.03 V y los valores obtenidos son prácticamente iguales a los obtenidos experimentalmente, esto sería indicativo que con la presencia de los nanotubos de carbón la especie oxidada en el proceso electroquímico es la misma que se reduce al invertir el potencial de barrido de potencial y también a esto se puede atribuir la disminución de diferencia de picos anódico y catódico para cada valor de pH.

**Tabla 7.2. Parámetros electroquímicos obtenidos de la VC de la DA 0.01 mM usando un ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD**

<b>pH</b>	<b><math>E_{pa}</math> / mV</b>	<b><math>E_{pc}</math> / mV</b>	<b><math>\Delta E</math> / mV</b>	<b><math>I_{pa}/I_{pc}</math></b>
3.4	417	336	83	0.714
7.4	185	122	63	0.5446

La figura 7.11, muestra los VC a diferentes velocidades de barrido de la DA a pH = 3.4 (figura 7.11a) y 7.4 (figura 7.11b),  $E_{pa}$  y  $E_{pc}$  se mantienen sin cambios significativos con el aumento de la velocidad, la diferencia entre los picos es de 60 mV a 90 mV, cuando la velocidad se incrementa 10 veces, la razón de la corriente entre los picos es de 0.7. Es por ello que el proceso puede describirse como cuasi-reversible.

La corriente de pico incrementa linealmente con la raíz de la velocidad (figura 7.11a y 7.11b), a pH 3.4 la ecuación lineal correspondiente es  $i(\mu A) = 8.623 v^{1/2} + 0.3539$  y

presenta un coeficiente de correlación de 0.997, y b)  $6.95v^{1/2} - 8.3154$  con  $r^2 = 0.995$  para pH 7.4 por lo que ambos procesos están controlados por difusión.

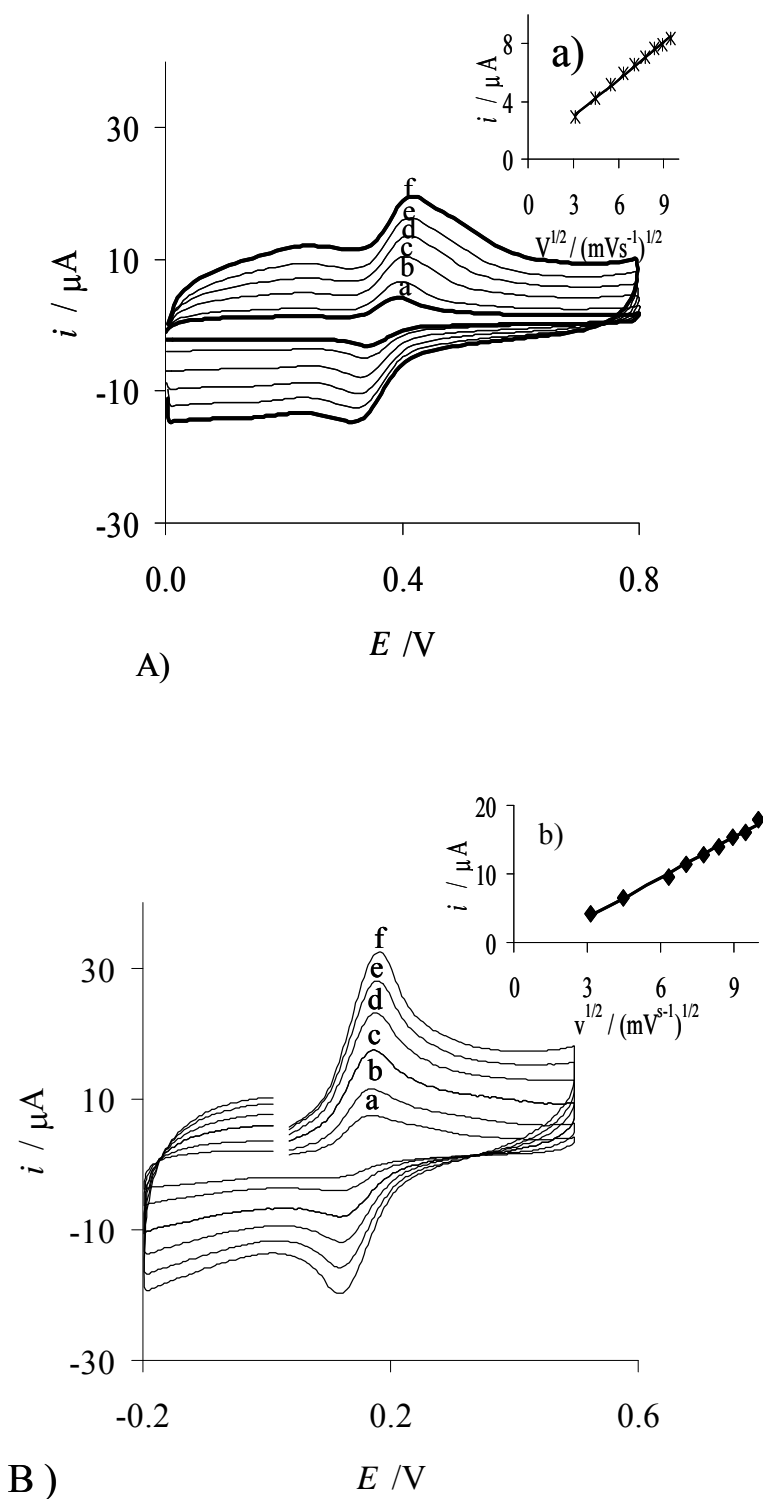
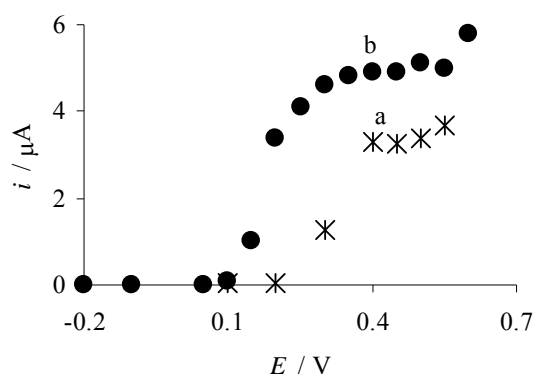


Figura 7.11. Voltamperogramas cíclicos de DA 0.1mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a) pH 3.4 y b) 7.4 a diferentes velocidades de barrido: a=0.01,b=0.02,c=0.04, d=0.06,e= 0.08, y f=0.1 V., Electrodo de trabajo: ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD.



La voltamperometría hidrodinámica se realizó con el fin de poder seleccionar el potencial de trabajo para la detección amperométrica de DA, en la figura 7.12 se puede observar la actividad redox cuando se varía el potencial en el intervalo de -0.2V a 0.6 V, así el electrodo ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD, responde a la oxidación de DA a potenciales mayores de 0.2 V cuando se tiene un pH de 7.4 mientras que a pH 3.4 la oxidación ocurre a potenciales por arriba de 0.3 V mientras que la señal de corriente anódica aumenta rápidamente entre 0.1 y 0.2 V, además se muestra que con el electrodo ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD se tiene mayor respuesta a pH 7.4 en contraste con pH 3.4, esto permite la determinación amperométrica de la DA a bajos potenciales.

Este comportamiento es consistente con el obtenido por VC. Por lo que se aplicará como potencial de trabajo para la detección de DA  $E_{pa}$  = 0.3 y 0.5 V para pH 3.4 y 7.4 respectivamente.



**Figura 7.12.** Voltamperogramas hidrodinámicos de 0.1 mM de DA con ECV MWCNT/ $\beta$ -CD a) pH 3.4 y b) pH 7.4 en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mM.

### 7.3.3 Cuantificación amperométrica de DA con ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD

La respuesta amperométrica de DA obtenida con ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD para pH 7.4 y 3.4 son comparadas en la figura 7.13 donde la respuesta de la corriente del pico oxidación de DA a pH 3.4 es proporcional a la concentración, en el intervalo de concentraciones de 0.02 mM a 0.1 mM y la ecuación obtenida es:  $i(\mu\text{A}) = 117.91 - 2.529$  con  $r^2 = 0.9954$ . Por otro lado para pH 7.4 es proporcional a la concentración, en el intervalo de concentraciones de 0.01 mM a 0.8 mM y la ecuación lineal para este caso corresponde a  $i(\mu\text{A}) = 116.63[\text{DA}] + 0.8024$ , el coeficiente de correlación en este

intervalo es de 0.9905, sin embargo para concentraciones de 0 a 0.3 mM el coeficiente de correlación mejora y llega a ser de 0.999 la ecuación correspondiente es  $i(\mu\text{A}) = 145.25[\text{DA}] + 0.3546$ . Por lo que la sensibilidad con ECV/ MWCNT/ $\beta$ -CD es mayor a pH 7.4 que a pH 3.4.

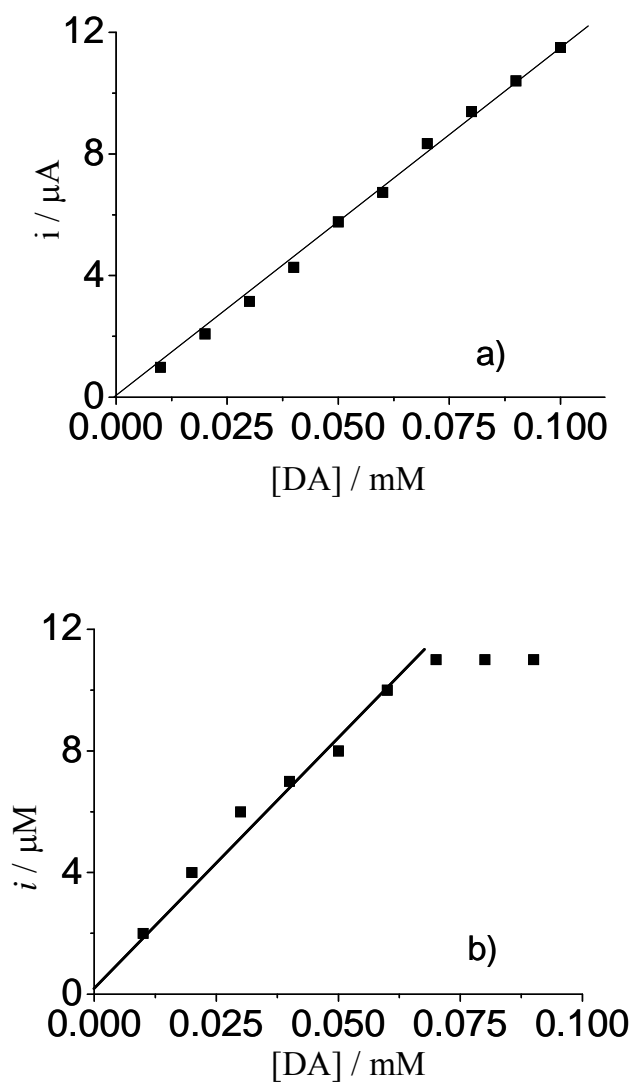


Figura 7.13. Curva de Calibración obtenida por amperometría con ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD a) pH 3.4 el potencial aplicado 0.5 V y b) pH 7 con potencial aplicado de 0.3 V para adiciones sucesivas de 0.01 mM DA, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M

Con la película de MWCNT/ $\beta$ -CD, el intervalo de detección de DA es mayor y se incrementa la sensibilidad respecto a ECV, además el proceso de transferencia de electrones es más rápido y el proceso se vuelve más reversible.

### 7.3.4. Interferencia de DA con AA utilizando el ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD.

La figura 7.14 muestra los voltamperogramas obtenidos, de una mezcla de AA 0.8 mM con diferentes concentraciones de DA, donde la señal del AA se ubica en  $E_{pa} = 104$  mV, mientras que la DA puede seguirse en la señal ubicada en  $E_{pa} = 290$  mV. El análisis de la  $i_{pDA}$  en función de la concentración de DA es lineal el coeficiente de correlación es de 0.992 correspondiente a la ecuación lineal  $i$  ( $\mu$ A) = 451.29 [DA]+0.53. El límite de detección con el uso del electrodo ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD es de 37  $\mu$ M DA, calculado con la respuesta del blanco más tres veces su desviación estándar ( $3\sigma$ ), de la curva de calibración obtenida por el gráfico de  $i_{pDA}$  en el intervalo de concentración de 0 a 0.5 mM

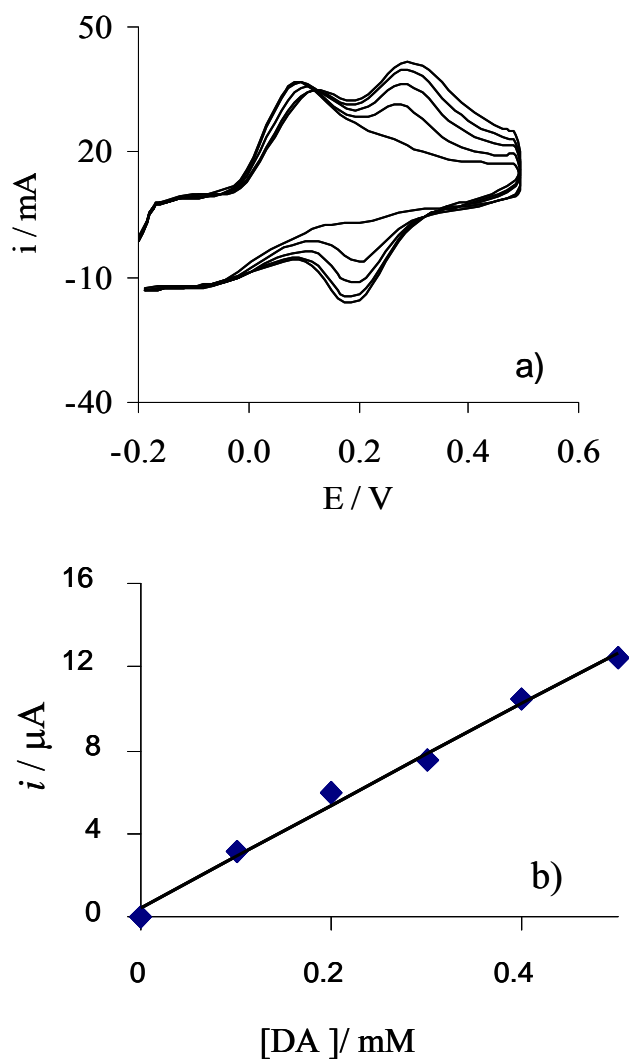


Figura 7.14. a) Voltamperogramas cíclicos de AA ( $8 \times 10^{-4}$  M) con diferentes concentraciones de DA en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH 7.4 usando un electrodo: ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD, b) Curva de calibración para el  $i_{pDA}$  de los VC del inciso a.

#### 7.4. Conclusiones.

El comportamiento electroquímico de la DA a pH de 3.4 y a 7.4 sobre un ECV sin modificar, mostró que el potencial del pico anódico se desplaza a valores mas negativos cuando el pH es mas básico, esto puede ser debido a que la desprotonación favorece el proceso de oxidación, siendo así y dado que la primer desprotonación tiene un valor de pKa de 9.05, el proceso de oxidación se favorece a pH 7.4, este comportamiento también se observa cuando se utiliza el electrodo modificado con MWCNT/ $\beta$ -CD.

Mediante el estudio de velocidad se encontró que para la DA a pH ácido y neutro, el transporte de masa esta controlado por difusión, lo que beneficia a la determinación de DA, pues es posible hacer la ésta de manera directa.

La interferencia de DA con AA fue estudiada y con el ECV sin modificar, no fue posible separar las señales de las especies. Sin embargo el uso del electrodo modificado basado en sistemas supramoleculares (MWCNT/ $\beta$ -CD/DA), fue favorable para la determinación de DA en presencia de AA, ya que por las características de la  $\beta$ -ciclodextrina, ésta puede actuar como agente de reconocimiento. Así la determinación de DA con el uso de VC y el ECV/MWCNT/ $\beta$ -CD, puede ser llevada a cabo para muestras como fármacos.

Sin embargo en la búsqueda de mejorar las propiedades de los electrodos en su relación costo benéfico, fabricación y manejo, propone utilizar en este trabajo un electrodo de pasta de carbón, un electrodo de pasta de carbón modificado con MWCNT/ $\beta$ -CD, y un electrodo de pasta de carbón modificado electroquímicamente con  $\beta$ -CD, en el siguiente capítulo se presenta el estudio electroquímico de Dopamina por VC, y con base al conocimiento adquirido en este capítulo se realiza por voltamperometría diferencial de pulso la determinación de DA y el estudio de la interferencia de AA.

## CAPÍTULO 8

# CARACTERIZACIÓN DE EPC MODIFICADOS CON $\beta$ -CD Y MWCNT

### 8.1. Introducción.

El interés en el desarrollo de métodos electroquímicos va en aumento y es que dependiendo del tratamiento de los electrodos pueden ser selectivos a un analito específico, también pueden ser fabricados en miniatura, lo que permite el estudio in situ, sin embargo, día a día se está en la búsqueda de un electrodo que sea de alta sensibilidad y selectividad, estable químicamente, reproducible y además de bajo costo, en esta búsqueda se ha intentado modificar electrodos de oro, carbón vítreo, pasta de carbón, grafito, entre otros, con materiales como polímeros y enzimas [8.1, 8.2], recientemente se usa la aplicación de sistemas supramoleculares basados en el uso de surfactantes o ciclodextrinas los cuales pueden ayudar a mejorar el método de análisis, por otra parte desde el descubrimiento de los nanotubos de carbón CNT en 1991 [8.3], los nanotubos de carbón han tomado gran interés para la creación y modificación de electrodos [8.1.-8.6], debido a las características que presentan como alta conductividad eléctrica, y estabilidad química.

Brito [8.7] en 1996 estudió la oxidación de la DA con el empleo de MWCNT y encontró que se mejora la reversibilidad del proceso, lo cual facilita la determinación, sin embargo el mayor problema se tiene cuando existe la presencia de ácido ascórbico pues éste causa interferencia con la señal de DA [8.11, 8.12], ya que ambas especies se oxidan en potenciales similares lo cual produce un traslapamiento en las señales [8.13]. Por lo que en este capítulo se hace el diseño experimental para modificar un electrodo de pasta de carbón, no sólo para mejorar sus características catalíticas sino también para mejorar la selectividad con el fin de facilitar el análisis de DA en presencia de AA, en este sentido, se considera que macromoléculas como la  $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -CD [8.14] puede operar como un agente de reconocimiento, basado en el hecho de que Fukuda y col. [8.15], han reportado que derivados de  $\alpha$ -amino ácido 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) pueden ser incluidos en la cavidad de  $\alpha$ -CD. A partir de esta información ,

Fragoso y col. [8.16], desarrollaron una estrategia para detectar DA en presencia de AA a pH 7.0, que consiste en la modificación de electrodos de oro con mezclas de monocapas de  $\beta$ -CD y ácido tióctico (TA), ellos argumentan que este electrodo posee un reconocimiento molecular ( $\beta$ -CD) y además aumenta la atracción electrostática por el TA, sin embargo Fragoso y col [8.16], asumen de los datos de la literatura [8.14, 8.15], que la  $\beta$ -CD forma un complejo de inclusión mas fuerte con la DA que con AA ( $K_{DA} \sim 2000 \text{ M}^{-1}$  [8.15],  $K_{AA} = 130 \text{ M}^{-1}$  [8.14]), así la presencia de  $\beta$ -CD con TA incrementa la sensibilidad y la selectividad para la determinación de DA por el efecto inducido sobre las interacciones electrostáticas anfitrión-huésped. Sin embargo, cuando es claro que esta es una buena idea, los valores de la constante aparente (K) mencionada por Fragoso y col. [8.16], son erróneas como se puede ver en la referencia original [8.14, 8.15] la constante aparente  $K_{AA}$  tiene un valor de  $(2900 \pm 200) \text{ M}^{-1}$  a pH 6.9 [8.14], mientras que la  $K_{DA}$  para DA no se reporta en esta referencia [8.15].

Considerando lo antes mencionado en este capítulo se estudiará el comportamiento electroquímico de la DA y AA a pH 3.0, por voltamperometría cíclica VC y diferencial de pulso VDP, usando como electrodos de trabajo un electrodo de pasta de carbón, EPC, un EPC modificado con MWCNT, un EPC modificado con  $\beta$ -CD, un EPC modificado con MWCNT y  $\beta$ -CD. Posteriormente se llevará a cabo la determinación analítica de la DA en presencia de AA con los electrodos modificados que tengan la mayor separación efectiva entre las señales, y la optimización de condiciones experimentales, con el fin de obtener los mejores parámetros analíticos tales como el límite de detección, sensibilidad e intervalo lineal, que permita su aplicación en muestras reales.

## 8.2. Método experimental

### 8.2.1. Reactivos.

Todos las soluciones de DA, AA, NaCl, HCl, HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y  $\beta$ -CD, fueron preparadas con reactivo grado analítico de la marca Merck, el HCl (37%) fue usado para ajustar el pH a 3.0. los nanotubos de carbón de multipared (MWCNT), (0.5-200  $\mu\text{m}$ ) fueron de Aldrich (Stenheim, Germany) al 95% MWCNT. Todas las soluciones fueron

preparadas con agua desionizada tipo 1 con resistividad de 18.2 M $\Omega$ , libre de materia orgánica, obtenida del equipo US Filter PURE- LAB Plus UV. El pH fue ajustado a pH 2.1 con HCl de Merck. Las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno y preparadas frescas para cada determinación. Estas también se protegieron de la luz durante toda la experimentación.

### **8.2.2 Instrumentación.**

Los experimentos electroquímicos, VC y VDP se llevaron a cabo con un Autolab PGSTAT 30, se utilizó una celda típica de tres electrodos, se empleó un electrodo de pasta de carbón, EPC, como electrodo de trabajo, éste fue preparado como se indica en capítulo 7, o modificado con los diferentes materiales. Un alambre de platino (BAS MW-1032) fue usado como contraelectrodo, mientras que como electrodo de referencia se utilizó Ag/AgCl (BAS MF-2052), al cual todos los potenciales están referidos en este trabajo. La amplitud en todos los VDP fue de 50mV.

### **8.2.3 Fabricación de los electrodos de trabajo.**

#### **8.2.3.1 EPC modificado con MWCNT**

Con el fin de eliminar las impurezas los MWCNT fueron dispersados en ácido nítrico 2M durante 24h a 25°C, estos se lavaron con agua desionizada para neutralizar y finalmente fueron secados de acuerdo al procedimiento descrito por Pérez y col. [8.21].

Los MWCNT fueron analizados por microscopía de barrido electrónico (SEM) JEOL JSM-6300 (SEM, JEOL LTD, Tokyo, Japan) con un X-Ray Energy Dispersive Spectrometer (EDS) (Link ISIS-200, England), para evaluar la cantidad de impurezas esto se realizó para los nanotubos sin y con tratamiento de ácido nítrico, es importante mencionar que los MWCNT no son solubles en HNO<sub>3</sub> y que el lavado con estos es para funcionalizarlos formando grupos carboxilo.

El EPC modificado con MWCNT se llevó a cabo con la dispersión de 1 mg de MWCNT en 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 ml de esta solución fue colocada por goteo sobre la superficie del electrodo EPC. El electrodo se dejó secar durante 24 hrs a 100°C y

después se lavó cuidadosamente con agua desionizada antes de ser utilizado, el electrodo modificado se mantuvo protegido del medio ambiente cuando no era utilizado.

#### **8.2.3.2 EPC modificado con poly- $\beta$ -CD.**

La  $\beta$ -CD fue polimerizada electroquímicamente sobre la superficie de un EPC, en una solución de  $\beta$ -CD 1M como lo describe Roa-Morales y col. [8.19], usando un programa de 10, 20, 30 ciclos de potencial en la ventana de potencial de 1.3 a -0.8 V, a velocidad de barrido de  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ , iniciando en el potencial de corriente nula ( $E_{i=0}$ ) = 0.24 V, en la dirección positiva.

#### **8.2.3.3 EPC modificado con MWCNT y $\beta$ -CD**

Un mg de MWCNT fueron dispersados en una solución de  $\beta$ -CD (2%). De esta solución se tomó 50  $\mu\text{L}$  y se colocó por goteo sobre la superficie del EPC, el electrodo se dejó secar por 24 hrs a 60 °C.

#### **8.2.3.4 EPC modificado con MWCNT, $\beta$ -CD y poly- $\beta$ -CD**

Un EPC modificado con MWCNT y  $\beta$ -CD fue obtenido de acuerdo a 5.2.3.3, este fue utilizado para hacer la modificación electroquímicamente con  $\beta$ -CD como se describe en 5.2.3.2, este electrodo es EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD. Cabe aclarar que en los estudios de velocidad se restó el blanco para eliminar la corriente capacitiva.

### **8.3. Resultados y discusión**

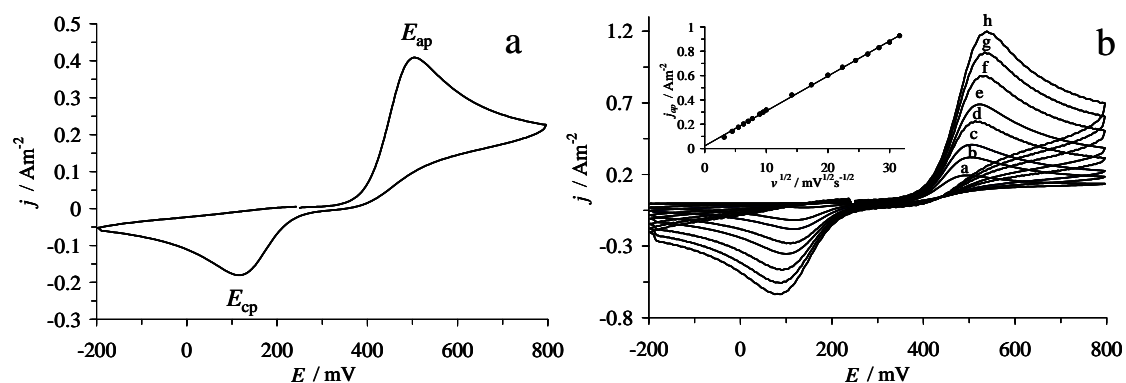
#### **8.3.1 Comportamiento electroquímico de la DA y AA sobre el EPC**

##### **8.3.1.1 Estudio VC de la DA.**

La figura 8.1a muestra los voltamperogramas obtenidos en el sistema EPC/DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0, en la ventana de potencial de -200 a 800 mV. El barrido se inició en el potencial de corriente nula ( $E_{i=0}$ ) en el sentido anódico, a velocidad de



barrido de  $100\text{mVs}^{-1}$ , donde se observa un proceso de oxidación en  $E_{pa}$  508 mV y un proceso de reducción en  $E_{pc} = 115$  mV. La relación entre la corriente del pico anódico y catódico es de  $I_{pa}/I_{pc} = 0.52$ , lo que indica que el mecanismo está asociado con una reacción EC, por otra parte la diferencia entre del potencial del pico anódico ( $E_{pa}$ ) y el potencial del pico catódico ( $E_{pc}$ ) es de  $\Delta E = 393$  mV, indicando que el proceso es no reversible.



**Figura 8.1** VCs típicos obtenidos de un sistema EPC/ DA0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 a velocidad de barrido de  $100\text{ mV s}^{-1}$ . b) influencia de la velocidad de barrido (a) 20 (b) 40 (c) 60 (d)100 (e) 400 (f) 600 (g) 800 (h) 1000  $\text{mV s}^{-1}$  El inserto muestra la variación de la densidad corriente,  $j_{ap}$ , como función de  $v^{1/2}$ , los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea,  $j_{ap}(\text{Am}^{-2}) = (0.028 \pm 0.002) \text{ Am}^{-2} \text{mV}^{1/2} \text{s}^{-1/2} v^{1/2} + (0.021 \pm 0.003) \text{ Am}^{-2}$ , es el resultado del ajuste lineal.

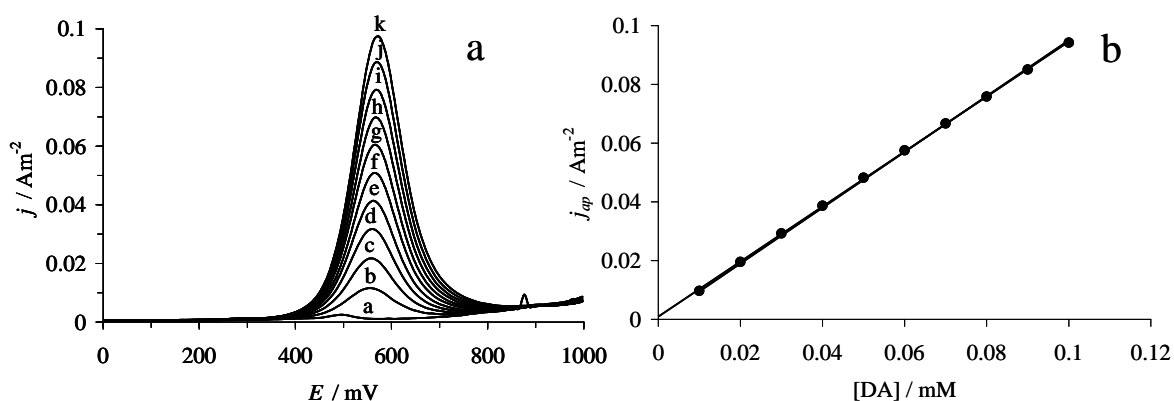
Con el fin de caracterizar el comportamiento electroquímico de la DA, se realizó el estudio de la respuesta analítica en función de la velocidad de barrido, para ello, se tomaron los voltamperogramas correspondientes al cambio de velocidad por una década.

La figura 8.1b muestran los VCs en función de la velocidad barrido, donde se observa que la velocidad influye sobre la posición del pico de oxidación, ya que se desplaza hacia potenciales más positivos a medida que aumenta la velocidad, mientras que el pico de reducción, se desplaza hacia potenciales más negativos, el desplazamiento de  $E_{pa}$  lo cual indica que cuando la velocidad incrementa el proceso se hace menos reversible. El inserto en la figura 8.1b muestra el gráfico de la densidad de corriente de pico anódico  $j_{pa}$  en función de la raíz cuadrada de la velocidad  $v^{1/2}$  donde se tiene una relación lineal entre 10 y 1000  $\text{mV s}^{-1}$ , indicando que la oxidación de la DA en este caso es un proceso controlado por difusión.

### 8.3.1.2. Estudio de VDP de DA

A partir del estudio anterior fue posible elegir algunos de los parámetros para realizar la detección de DA por VDP, se obtuvo empleando la técnica amperométrica.

La figura 8.2 muestra los VDPs obtenidos en el sistema EPC/DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 con diferentes concentraciones de DA, es posible notar un pico de oxidación correspondiente a la DA en 553 mV, el cual incrementa en  $j_{pa}$  a medida que se incrementa [DA], ver figura 8.2b.



**Figura 8.2. a) Curvas de voltamperometría diferencial de pulso (VDP) obtenido del sistema EPC/DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 con diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.01 (c) 0.02 (d) 0.03 (e) 0.04 (f) 0.05 (g) 0.06 (h) 0.07 (i) 0.08 (j) 0.09 (k) 0.10 mM. b) Variación de  $j_{ap}$ , los VDPs. Como función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal.**

Los valores de  $j_{pa}$  varían directamente con la [DA], la sensibilidad para este sistema está dada por  $(0.936 \pm 0.004) \text{ Am}^{-2} \text{ mM}^{-1}$  y la intercepción es  $(0.001 \pm 0.001) \text{ Am}^{-2}$  con  $r^2 = 0.9996$ , en el intervalo de 0.01 a 0.1 mM, el límite de detección calculado [23] para este sistema es de  $2.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ .

Considerando que en sistemas reales el principal interferente con la DA es el ácido ascórbico, ya que éste responde de manera similar a la dopamina y por lo general se encuentra al menos 10 veces más concentrado que la DA, se realiza en estudio del ácido ascórbico, para posteriormente estudiar la interferencia con la DA.

### 8.3.1.3 Estudio VC de AA.

En la figura 8.3 se muestra los VCs experimentales en el sistema EPC / NaCl 0.1 M a pH 3.0 con 1mM AA en la ventana de potencial de -200 a 1200 mV a diferentes velocidades de barrido, estos CVs muestran sólo un pico de oxidación, cuando se invierte el potencial de barrido no se presenta ningún pico de reducción, una primera conclusión es que el procesos es considerado como irreversible.

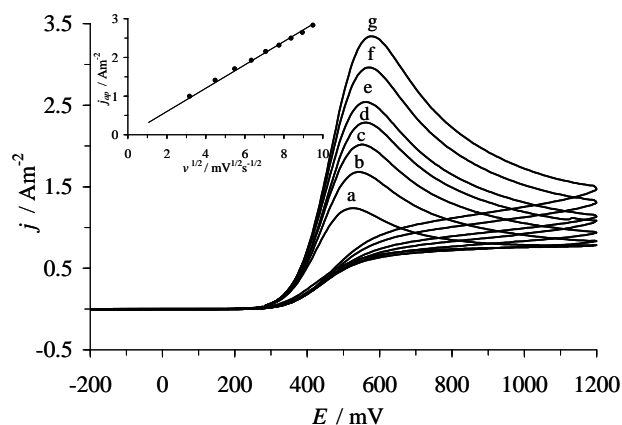


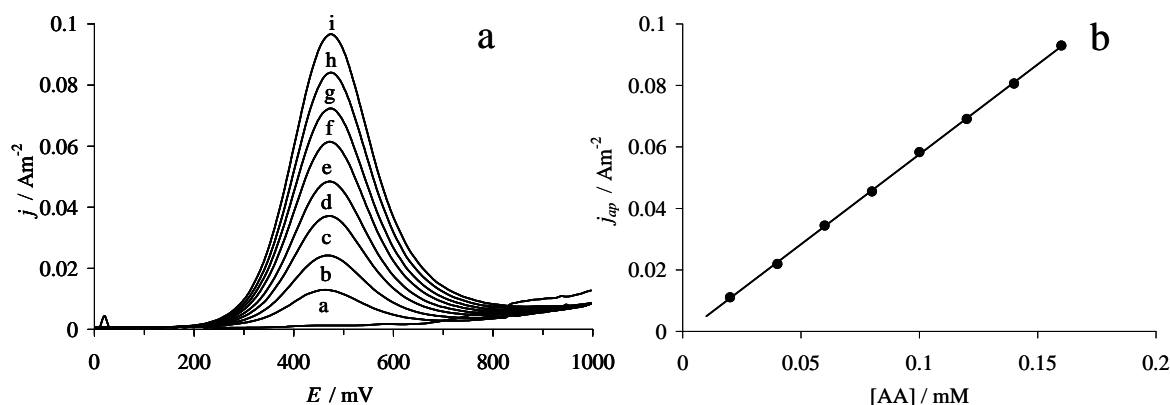
Figura 8.3 VCs obtenidos de un sistema EPC/ AA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 a diferentes velocidades de barrido (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 80 (g) 100  $\text{mV s}^{-1}$ . El inserto muestra la variación de la densidad corriente,  $j_{ap}$ , como función de  $v^{1/2}$ , los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea,  $j_{ap} (\text{Am}^{-2}) = (0.288 \pm 0.003) \text{Am}^{-2} \text{mV}^{-1/2} \text{s}^{-1/2} v^{1/2} + (0.13 \pm 0.02) \text{Am}^{-2}$ , es el resultado del ajuste lineal.

El estudio de velocidad ( $v$ ) muestra que el  $E_{pa}$  se desplaza hacia potenciales más positivos cuando  $v$  incrementa, el gráfico de  $j_{pa}$  como función de  $v^{1/2}$ , ver figura 8.3, muestra que la  $j_{pa}$  incrementa linealmente en función de la  $v^{1/2}$  indicando que el proceso es controlado por la difusión.

### 8.3.1.4. Estudio de AA por VDP.

La figura 8.4a muestra los VDPs obtenidos en el sistema EPC/ AA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 a diferentes [AA], se puede observar la oxidación del pico ubicada en 450 mV, el pico incrementa a medida que la [AA] aumenta. La figura 8.4b muestra el gráfico de  $j_{pa}$  como función de [AA] la relación es lineal en el intervalo de 0 a 0.16 mM; la ecuación que describe este comportamiento es  $j_{pa} (\text{Am}^{-2}) = (0.585 \pm 0.003) \text{Am}^{-2} \text{mM}^{-1} [\text{AA}] + (0.0004 \pm 0.0001) \text{Am}^{-2}$  con  $r^2 = 0.9995$ , a partir de este análisis se obtuvieron

los parámetros analíticos asociados a sistema el límite de detección fue  $3.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , tal valor es comparado con otros valores reportados recientemente [8.24, 8.25], donde se modifica un electrodo de carbón vítreo con poly(*p*-tolueno ácido sulfónico) [8.24], otro electrodo es el electrodo de grafito pirolítico plano [8.25] para los cuales el límite de detección es de  $50 \mu\text{M}$  y  $200 \text{ nM}$  respectivamente.



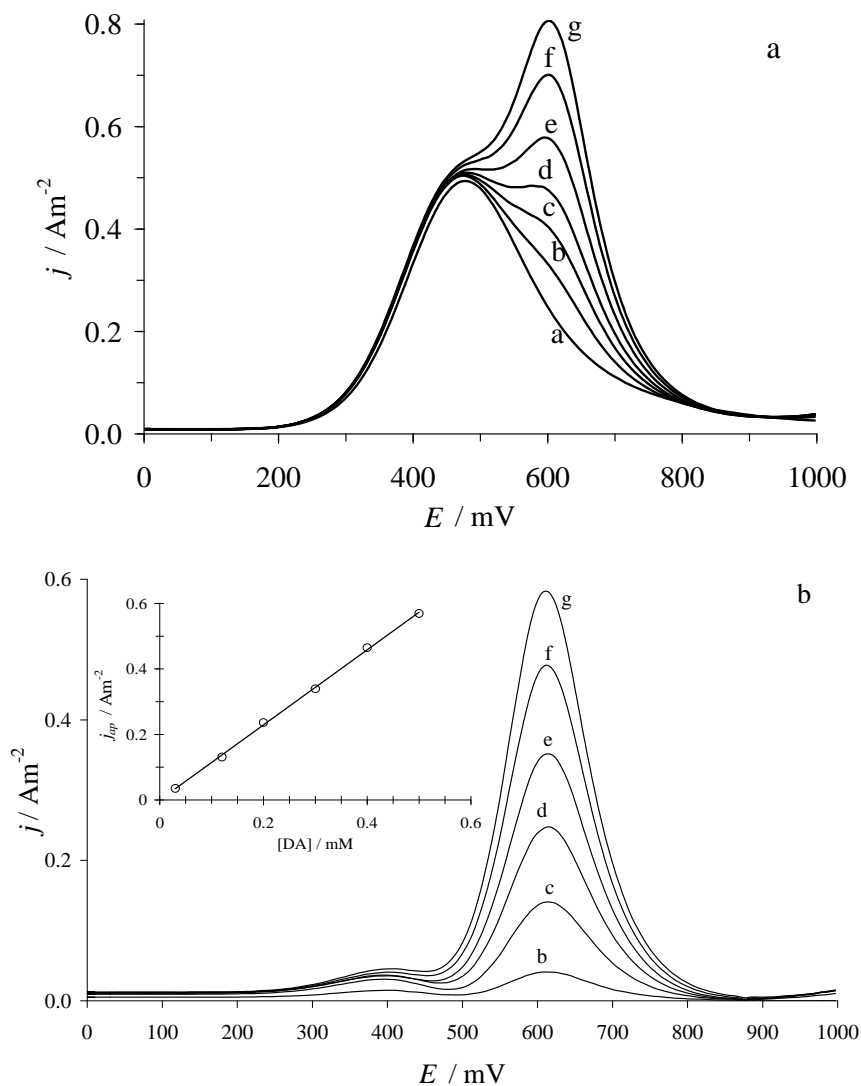
**Figura 8.4a)** Curvas VDPs obtenido del sistema EPC/ 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 con diferentes [AA]: (a) 0, (b) 0.02 (c) 0.04 (d) 0.06 (e) 0.08 (f) 0.10 (g) 0.12 (h) 0.14 (i) 0.16 (j) 0.10 mM. **b)** Variación de  $j_{ap}$ , los VDPs como función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal

A partir de los resultados obtenidos por VDP la localización del pico de oxidación de AA se encuentra en  $E_{pa} = 450 \text{ mV}$ , mientras que la DA  $E_{pa} = 553 \text{ mV}$  la separación entre los picos es de solo  $103 \text{ mV}$ . Sin embargo, esta observación es basada sobre los estudios diseñados para las especies por separado, por lo que ahora se realiza la evaluación del comportamiento electroquímico de la DA y AA presentes en la misma solución.

### 8.3.1.5. Determinación de la DA en presencia de AA.

La figura 8.5a muestra el VDP experimental obtenido del sistema EPC/NaCl 0.1 mM, AA 0.1 M, a pH 3.0 para diferentes [DA], es posible observar que la señal del máximo de AA se ubica en  $E_{pa} = 450 \text{ mV}$  (figura 8.5), el cual es prácticamente independiente de la [DA], cuando la concentración de DA incrementa en el sistema, un aumento en la señal es observado entre  $550$  a  $800 \text{ mV}$ , éste corresponde a la oxidación de DA, particularmente cuando  $[DA] > 0.3 \text{ mM}$  existe una buena resolución del pico observada en  $600 \text{ mV}$ . La figura 8.5b muestra los VDPs que resultan cuando se resta la señal del AA, a partir de esta figura se obtiene la curva de calibración (figura 8.5b), la

sensibilidad correspondiente es  $1.145 \pm 0.013 \text{ Am}^{-2} \text{ mM}^{-1}$  con un límite de detección de  $14 \pm 24 \mu\text{M}$ . esta sensibilidad es muy baja sin embargo el error asociado al límite de detección es muy grande, lo que indica que valores de [DA] bajos no pueden ser determinados adecuadamente en este sistema.



**Figura 8.5.a)** Curvas experimentales por VDP obtenidas en el sistema EPC/ NaCl 0.1 mM, AA 0.1 M, a pH 3.0 a diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.03 (c) 0.12 (d) 0.20 (e) 0.30 (f) 0.40 (g) 0.50 mM, a velocidad de barrido de  $20 \text{ mVs}^{-1}$ . **b)** VDP sin la contribución de AA. El inserto muestra la variación de  $j_{ap}$  como una función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal.

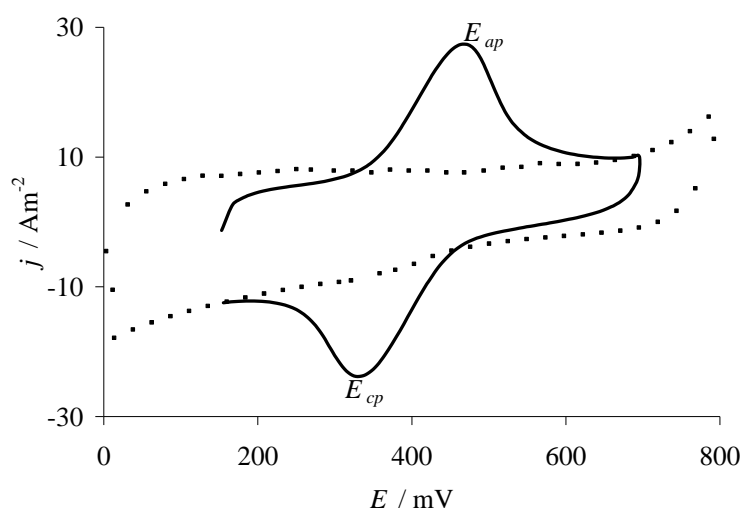
### 8.3.2 Comportamiento electroquímico de la DA y AA sobre EPC /MWCNT

#### 8.3.2.1 Estudio de DA por VC.

Con el fin de conocer el efecto de los MWCNT sobre el comportamiento electroquímico de la DA, se obtuvo el VC.

La figura 8.6 muestra el VC obtenido con un sistema EPC/MWCNT/ DA 0.1mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0). El  $E_{pa}$  de la DA fue a 465 mV mientras que el  $E_{pc}$  se localiza en 324 mV, lo que significa que  $\Delta E = 141$  mV este valor es más pequeño comparado con el obtenido con el electrodo sin modificar (figura 8.1) sin embargo el proceso sigue siendo cuasireversible.

Analizando la relación entre  $-j_{pa} / j_{pc}$  fue de 0.82 en este sistema, lo cual significa que la reacción química observada sobre el electrodo sin modificar esta siendo limitada, otra notable diferencia es que el VC mostrado en la figura 8.6 presenta un incremento en la corriente capacitaba lo cual indica que los MWCNT están presentes sobre la superficie del electrodo.



**Figura 8.6.** VCs obtenidos en el sistema EPC/MWCNT/ NaCl 0.1 M (pH 3.0) con diferente [DA], línea punteada 0 y línea continua 0.1 mM. La velocidad de barrido fue de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ .

Ya que el tema que nos ocupa es la determinación de DA en presencia de AA, se decidió probar el electrodo para ver el comportamiento voltamperométrico de ambas especies en la misma solución.

### 8.3.2.2 Estudio de DA en presencia de AA

El voltamperograma obtenido se muestra en la figura 8.7 para el sistema EPC/MWCNT/ DA 0.1 mM, AA 1 mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0), como se puede observar sólo se observa un pico cuando se tiene la mezcla de DA-AA, aún cuando se hace el VDP no es posible separar las señales.

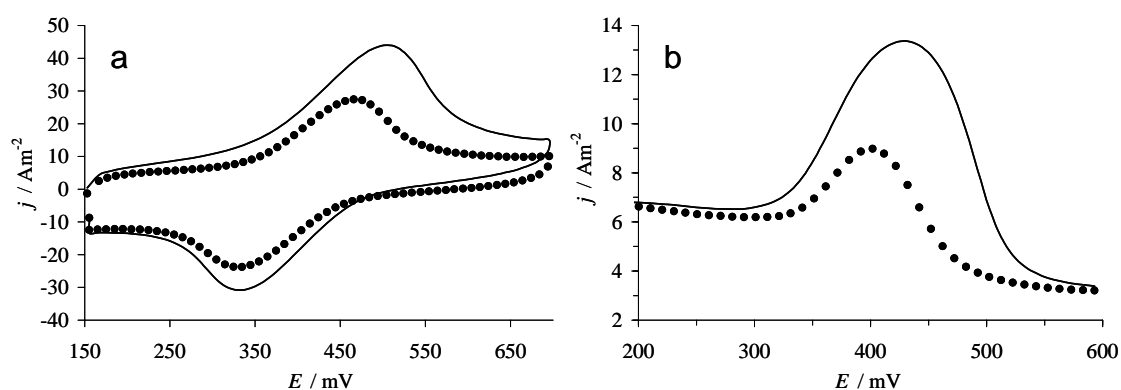


Figura 8.7. a) Comparación de los VCs en el sistema EPC/MWCNT/ DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0) con diferentes [AA]: (●) 0 y (○) 1 mM. La velocidad de barrido fue de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . b) El correspondiente VDP de los sistemas (a); obtenidos a velocidad de barrido de  $20 \text{ mVs}^{-1}$ .

Con estos resultados se prueba que el EPC modificado con MWCNT no favorece a la separación de las señales entre DA y AA, además no existe ninguna separación entre las señales de las sustancias.

Ahora se estudia la respuesta del EPC con un nuevo polímero, formado por la polimerización electroquímica de  $\beta$ -CD este electrodo se ha nombrado EPC/poly- $\beta$ -CD

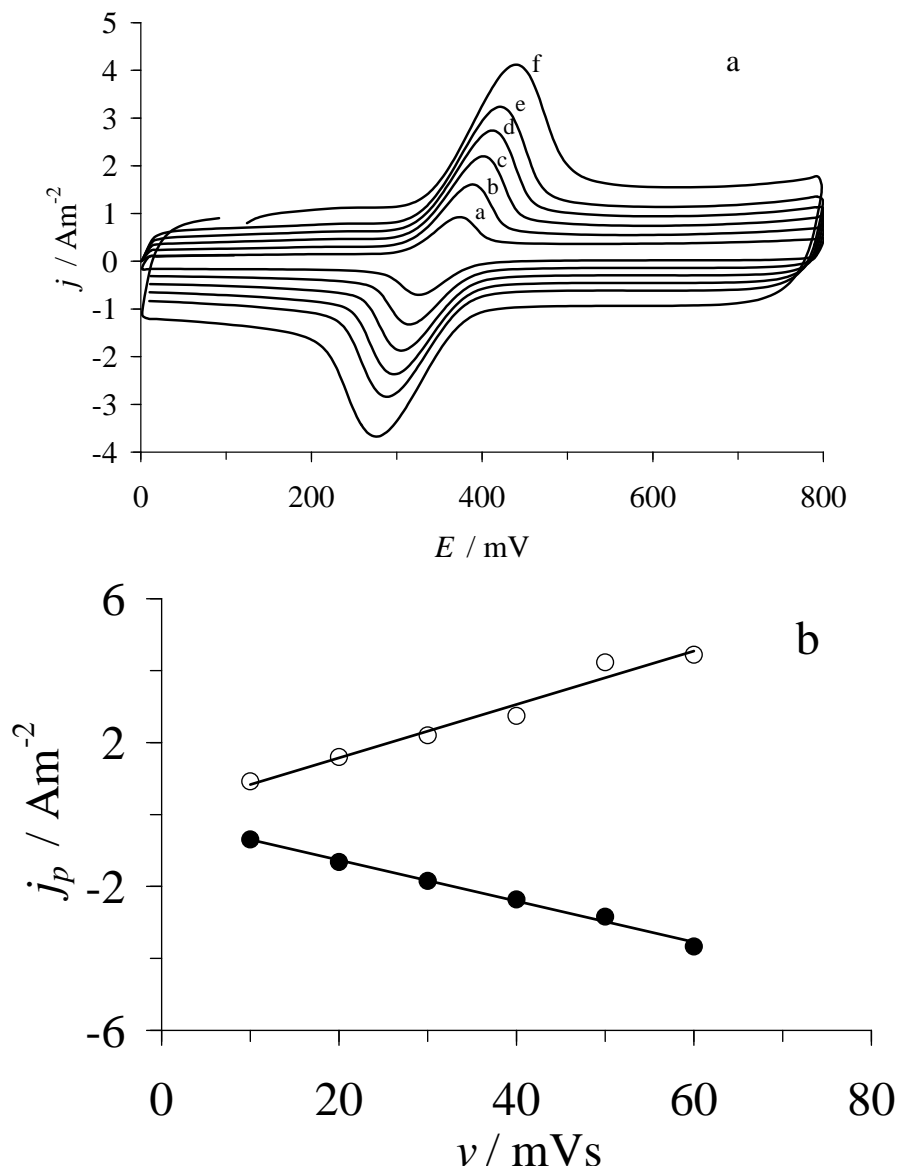
### 8.3.3 Comportamiento electroquímico de DA y AA sobre un EPC /poly- $\beta$ -CD.

#### 8.3.3.1 Estudio de DA usando VC.

En la figura 8.8a se muestran los VCs obtenidos para el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD NaCl 0.1 M/ DA 0.1M (pH 3.0), obtenidos a diferentes velocidades de barrido, en la figura 8.8b es posible observar que ambas densidades de corriente varían linealmente con la velocidad de barrido, este comportamiento podría indicar que tanto la oxidación como la reducción de DA está controlada por un proceso de adsorción, es importante resaltar que este comportamiento es muy similar al obtenido cuando se realizó el estudio con SDS, por lo que se usará la misma metodología empleada en el capítulo 5. para analizar el VC obtenido en la figura 8.8a, donde la velocidad de barrido fue de  $50 \text{ mVs}^{-1}$ , el potencial de oxidación del pico de ubica en  $E_{pa} = 434 \text{ mV}$  y la reducción en  $E_{pa} = 278 \text{ mV}$ , así la separación entre los picos dio de  $\Delta E = 156 \text{ mV}$ , lo cual indica que el proceso sigue siendo cuasireversible, comparando con el comportamiento obtenido con el EPC/MWCNT, se encuentra que el  $\Delta E$  es menor con el uso de este último, ahora bien comparando con el electrodo sin modificar la diferencia es menor, Por otra parte se observa que la corriente capacitiva incrementa esto es indicativo de que la  $\beta$ -CD está presente sobre la superficie del electrodo.

Otro parámetro de análisis es la relación entre  $-j_{pa} / j_{pa} = 0.93$ , este valor resulta ser mayor comparado con el EPC (0.52) o con el encontrado con el modificado con MWCNT (0.82).



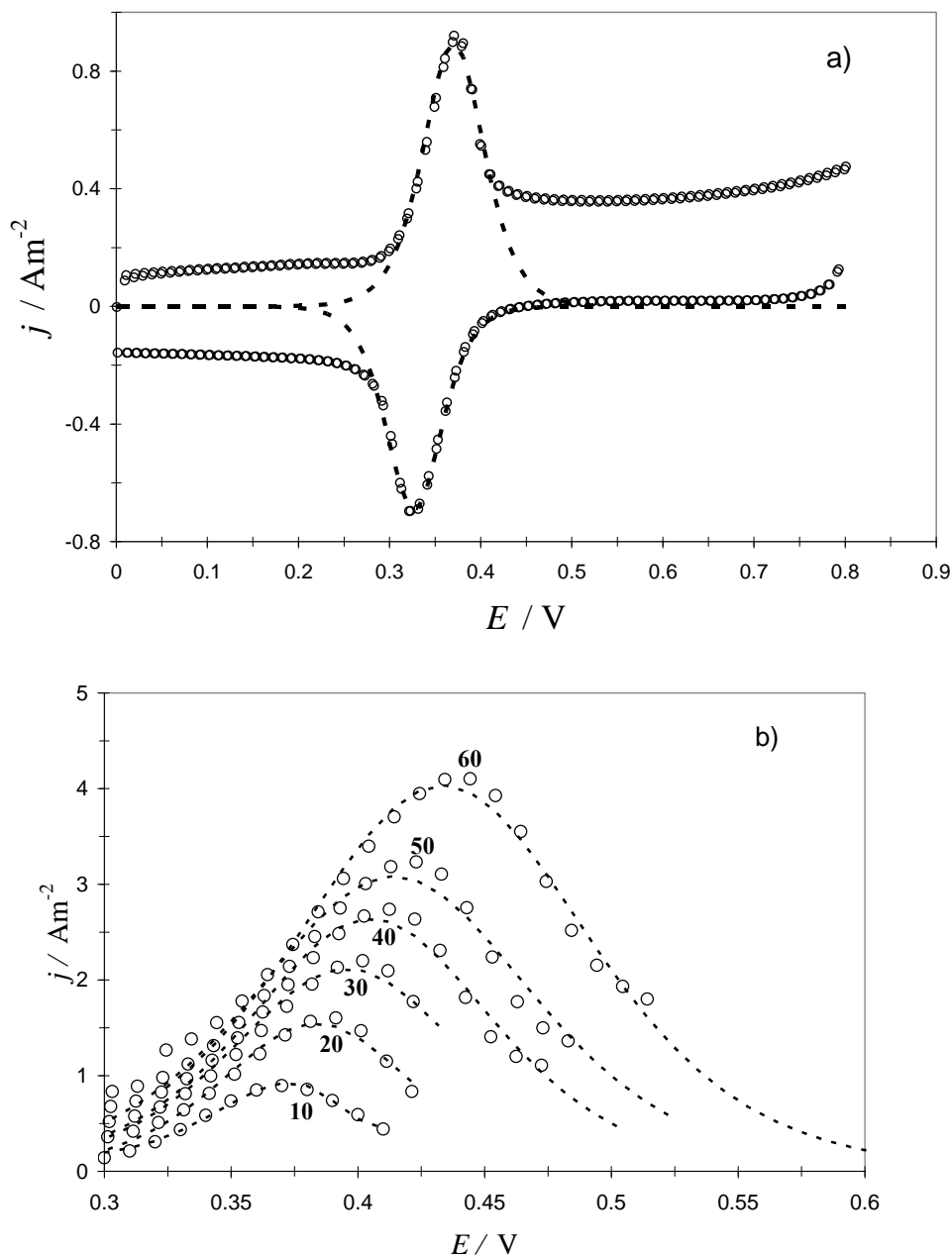


**Figura 8.8 a) CVs obtenidas en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0, a diferentes velocidades de barrido de potencial: (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 60  $\text{mVs}^{-1}$ . b) variación de la densidad de corriente de pico ( $j_p$ ), en función de  $v$ , los círculos corresponden a los datos experimentales (O) para el pico anódico y (●) para el pico catódico. Las líneas son el resultado de del ajuste lineal.**

Como se observa cuando la  $v$  incrementa el  $E_{pa}$ , se desplaza hacia valores más positivos, mientras que el  $E_{pc}$ , se desplaza a más negativos, lo que sugiere que el proceso se hace más reversible cuando la  $v$  incrementa.

Con el fin de verificar como es el control difusional en el sistema, se construye el gráfico de  $j_{pa}$  en función de la  $v^{1/2}$ , ver figura 8.8, Se puede observar que la  $j_{pa}$  y  $v^{1/2}$  son directamente proporcional, la ecuación que representa este comportamiento es  $j_{pa}(\text{Am}^{-2})$

$j = (0.432 \pm 0.017) \text{ Am}^{-2} \text{ mV}^{-1/2} \text{ s}^{-1/2} v^{1/2} + (0.22 \pm 0.12) \text{ Am}^{-2}$  con  $r^2 = 0.99$ , por lo que la oxidación esta controlada por la transferencia de masa.



**Figura 8.9.** a). presenta una comparación entre los datos experimentales en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 a velocidad de barrido de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  su correspondiente VC teórico generado a partir de un ajuste no lineal con la ecuación 5.15 del capítulo 5, b) ajustes de VC a diferentes velocidades.

A partir de la figura se puede concluir que el proceso está controlado por adsorción, el modelo en el cual se basó la ecuación 5.15 puede describir adecuadamente los datos experimentales correspondientes a la oxidación electroquímica de la DA (pico anódico) y a la reducción (pico catódico) sobre el electrodo modificado con poly-CD, es

importante mencionar que el ajuste es bueno, pues es independiente de la velocidad de barrido figura 8.9b, Para sistemas donde la adsorción es fuerte y los productos están involucrados, el potencial a media altura de la amplitud de pico (full peak width at half-height) ( $E_{FWHM}$ ) debe ser de  $90.6 / n$  donde es  $n$  el número de electrones transferidos durante la reacción electroquímica, esto fue encontrado a la velocidad de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

El  $E_{FWHM}$  corresponde a  $90 \text{ mV}$  para ambas corrientes de pico, las cuales indican que  $n$  es uno, en ambos casos, sin embargo, la constante de velocidad heterogénea,  $k^o$ , para la oxidación de dopamina fue  $0.35 \text{ cm s}^{-1}$ , ésta se determinó a partir de  $\Delta E = E_{ap} - E_{cp} = 134 \text{ mV}$ , como se describe en la ecuación. (5.7) del capítulo 5.

### 8.3.3.2 Estudio de DA por VDP.

La figura 8.10a muestra los VDPs para el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD NaCl  $0.1 \text{ M}$ / DA  $0.1 \text{ M}$  (pH 3.0), con diferentes [DA] los gráficos muestran el pico de oxidación el cual aparece cerca de  $372 \text{ mV}$ , donde  $j_{pa}$  aumenta a medida que aumenta la concentración de DA, graficando  $j_{pa}$  vs. [DA] se obtiene una línea recta como se muestra en la figura 8.10b; la expresión  $j_{pa} (\text{Am}^{-2}) = (8.245 \pm 0.048) \text{ Am}^{-2} \text{ mM}^{-1} [\text{DA}] + (0.0356 \pm 0.0031) \text{ Am}^{-2}$ , predice su comportamiento, con un coeficiente de correlación de 0.9998 en el intervalo de linealidad de  $0.01$  a  $0.1 \text{ mM}$  con límite de detección de  $(1.0 \pm 0.1) \mu\text{M}$ .

Comparando estos parámetros analíticos con los obtenidos previamente se encontró que estos son mejores.

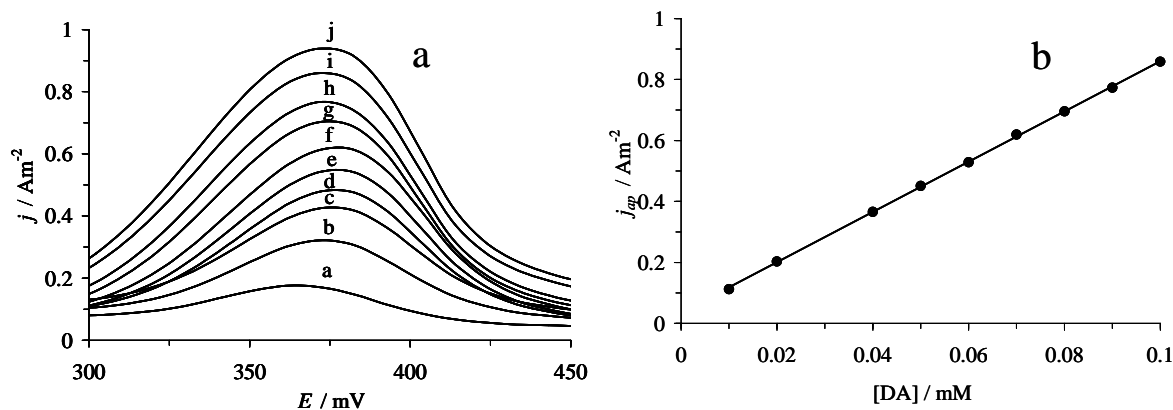
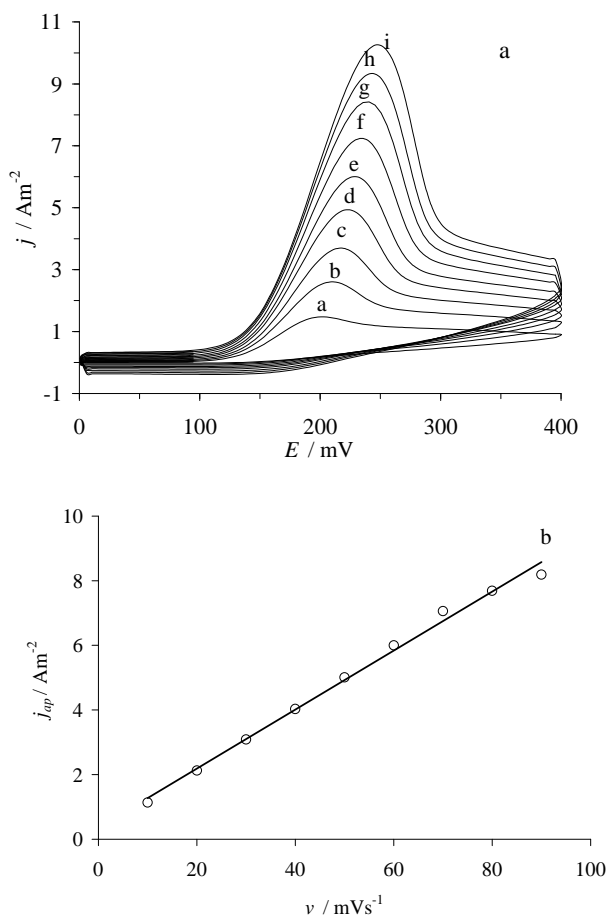


Figura 8.10.a) Curvas VDPs obtenidas del sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/NaCl 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0 con diferentes [DA]: (a) 0.01, (b) 0.02 (c) 0.03 (d) 0.04 (e) 0.05 (f) 0.06 (g) 0.07 (h) 0.08 (i) 0.09 (j) 0.10 mM b) Variación de  $j_{ap}$ , Como función de la [DA]. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde al ajuste lineal

### 8.3.3.3 Estudio de AA por VDP.

El estudio de velocidad de barrido para el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ AA 1 mM, NaCl 0.1 M a pH 3.0, ver figura 8.11, muestra un solo pico de oxidación en  $E_{pa} = 200$  mV, Sin embargo cuando,  $v$  incrementa hay un desplazamiento hacia potenciales mas positivos  $v = 100$  mVs $^{-1}$  el pico se encuentra en  $E_{pc} = 452$  mV. Cuando se invierte el potencial no se observa ningún pico, lo que indica que el proceso permanece como irreversible. Por otra parte, el gráfico de  $j_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$ , figura 8.11b, presenta un comportamiento lineal entre 10 y 100mV, es relevante decir que el proceso del AA es controlado por difusión, donde la correlación está dada por la ecuación  $j$  (Am $^{-2}$ ) =  $(1.564 \pm 0.052)$  Am $^{-2}$  mV $^{-1/2}$  s $^{-1/2}$   $v^{1/2} - (4.76 \pm 0.39)$  Am $^{-2}$  con  $r^2 = 0.9934$ .



**Figura 8.11a)** VCs obtenidas en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/AA 0.1 mM, NaCl 0.1 M, a pH 3.0, a diferentes velocidades de: (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 (f) 60 (g) 80 (h) 90 (i) 100  $\text{mVs}^{-1}$ . b) variación de la densidad de corriente de pico ( $j_p$ ), en función de  $\nu$ , los círculos corresponden a los datos experimentales (○) para el pico anódico y (●) para el pico catódico. Las líneas son el resultado de del ajuste lineal.

#### 8.3.3.4 Oxidación DA en presencia de AA

Después de caracterizar el comportamiento de las especies, es necesario verificar, con este electrodo las señales de la DA y AA, la figura 8.12 muestra los VDP obtenidos del sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ DA 0.03 mM, AA 1.8 mM, NaCl 0.1 M a pH 3.0 en la ventana de potencial de 0 a 800 mV donde se observa un pico de oxidación  $P_{AA}$  en 171 mV, mientras que el correspondiente a dopamina  $P_{DA}$ , está en 402 mV, así se establece una separación efectiva de 231 mV

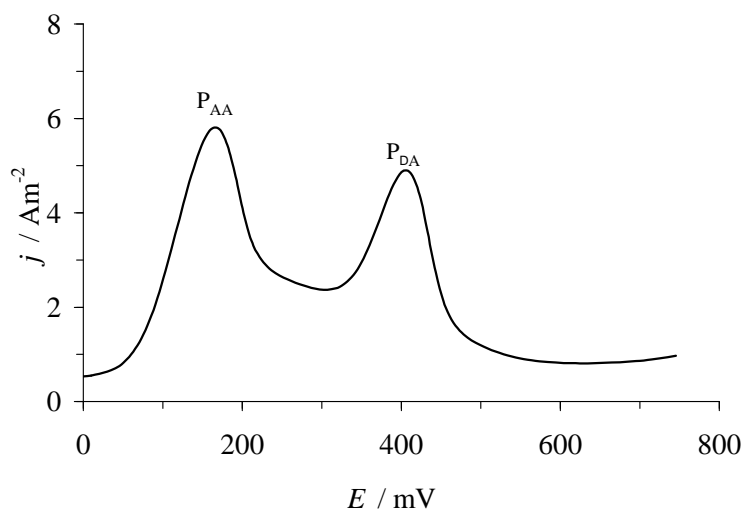


Figura 8.12. VDP en el sistema EPC/poly- $\beta$ -CD/ NaCl 0.1 M, AA 1.8 mM, DA 0.03 mM a pH 3.0, velocidad de barrida de  $50 \text{ mVs}^{-1}$  y amplitud 0.5.

Como se mostró previamente, el EPC modificado con el polímero  $\beta$ -CD formado con técnicas potenciodinámicas, hizo posible la separación de las señales de DA y AA, sin embargo, se analizan los efectos sobre el grosor de la película de  $\beta$ -CD para lo cual se varia el número de ciclos de la polimerización y se obtienen diferentes electrodos, la respuesta se analiza en función de los parámetros analíticos.

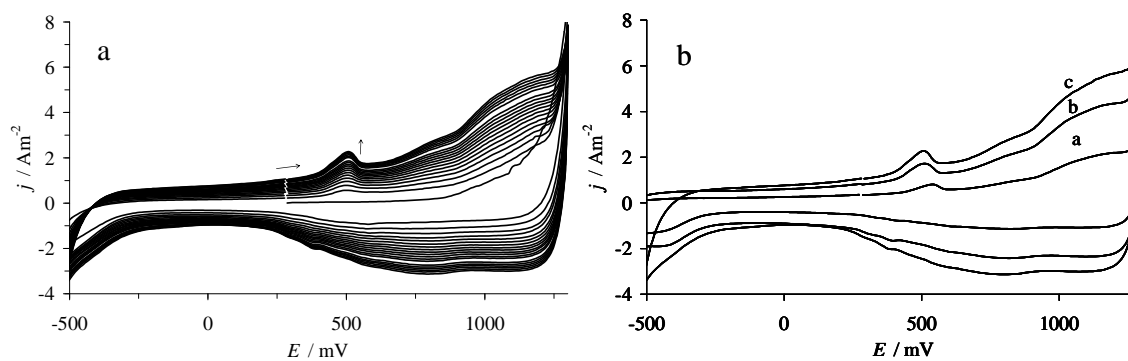
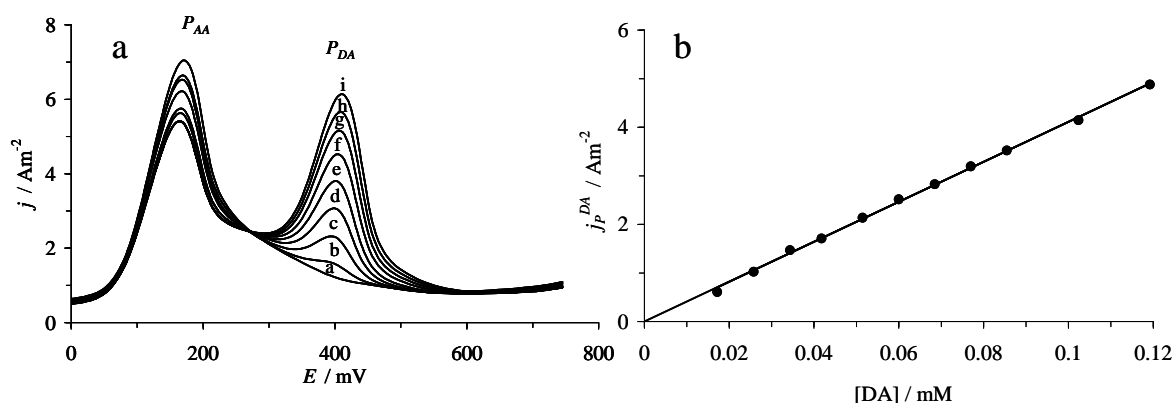


Figura 8.13. a) Gráfico de los primeros 20 ciclos consecutivos de VCs obtenidos durante la polimerización de  $\beta$ -CD sobre la superficie de EPC a partir de una solución de 0.01 M  $\beta$ -CD en  $\text{HClO}_4$  1 M. b) la respuesta electroquímica de la membrana obtenida con diferente número de ciclos voltamperométricos: (a) 10, (b) 20 y (c) 30, sumergida en una solución acuosa de  $\text{HClO}_4$  1 M. En todos los casos la velocidad de barrido de potencial aplicada fue de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ .

La figura 8.13b muestra la respuesta electroquímica de la película polimérica formada después de aplicar diferente número de ciclos voltamperométricos sumergida en una solución de  $\text{HClO}_4$  1M. Estos resultados confirman la presencia de la membrana de poly- $\beta$ -CD sobre la superficie del EPC.

### 8.3.3.4.1. Determinación de DA.

La figura 8.14a muestra los VDPs del sistema EPC / poly- $\beta$ -CD (después de aplicar 10 ciclos voltamperométricos)/AA 1 mM, NaCl 0.1M (pH 3.0) con diferentes [DA], el  $P_{DA}$  fue localizado a 453 mV mientras que para AA fue encontrado a 231mV, así, la separación fue de 222 mV. La figura 8.14b muestra la curva de calibración obtenida en este sistema. El análisis estadístico de la curva de calibración en la figura 8.14b está relacionada con la siguiente expresión para de una línea recta:  $j_p^{DA}$  ( $\text{Am}^{-2}$ ) =  $(14.83 \pm 0.18) \text{Am}^{-2}\text{mM}^{-1} [\text{DA}] + (0.003 \pm 0.001) \text{Am}^{-2}$ , con coeficiente de correlación de 0.99987. A partir de esta ecuación se obtuvo que el electrodo tiene una sensibilidad de  $14.83 \pm 0.18 \text{Am}^{-2}\text{M}^{-1}$  y un límite de detección de  $4.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ .



**Figura 8.14. a) Familia de VDPs del sistema EPC/poly- $\beta$ -CD (después de aplicar 10 ciclos voltamperométricos) / AA 1 mM, NaCl 0.1M (pH = 3.0) con diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.02, (c) 0.03, (d) 0.05, (e) 0.10, (f) 0.17, (g) 0.25, (h) 0.33, (i) 0.41 (j) 0.49 mM. En todos los VDPs la velocidad de barrido de potencial fue de  $20 \text{mVs}^{-1}$  y amplitud 0.5. b) Variación de  $j_p^{DA}$  en función de [DA] obtenida de las curvas mostradas en (a) La línea corresponde a el ajuste lineal de los datos experimentales (●).**

El mismo estudio se hizo para poly- $\beta$ -CD sintetizada después de 20 y 30 ciclos, para los cuales se obtuvieron los datos analíticos como: intervalo de linealidad, límite de detección y sensibilidad, éstos se presentan en la tabla 8.1.

**Tabla 8.1. Parámetros analíticos obtenidos de las curvas de calibración de DA, usando el sistema, EPC/poly- $\beta$ -CD (después de aplicar 10, 20 y 30 ciclos voltamperométricos)/AA 1 mM, NaCl 0.1M (pH 3.0), donde la poly- $\beta$ -CD fue sintetizada a diferentes números de ciclos voltamperométricos.**

Número de ciclos	Intervalo lineal / $\mu$ M	Límite de detección / $\mu$ M	Sensibilidad / $\text{Am}^{-2}\text{mM}^{-1}$
10	10 – 130	$4.10 \pm 0.05$	$14.83 \pm 0.18$
20	40 – 110	$8.06 \pm 0.07$	$11.18 \pm 0.15$
30	10 – 100	$22.81 \pm 0.10$	$10.71 \pm 0.92$

Como se puede observar en la tabla 8.1, la mejor sensibilidad y límite de detección se tiene usando el EPC con poly- $\beta$ -CD sintetizada después de 10 ciclos voltamperométricos.

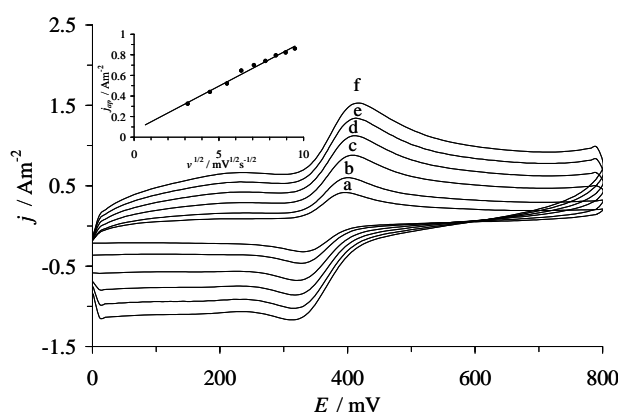
Con estos resultados es posible establecer que la modificación del EPC con poly- $\beta$ -CD da una muy buena separación de las señales de DA y AA, lo cual no ha sido posible obtener con los electrodos estudiados EPC, ni con el EPC modificado con MWCNT. Sin embargo, hay que mencionar que el uso de MWCNT favorece la reacción de oxidación de DA. Entonces, la modificación del EPC con MWCNT y poly- $\beta$ -CD mejoraría las propiedades electroquímicas y la selectividad, esto se consideró para crear un electrodo capaz de mejorar la separación entre las señales de DA y AA.

### 8.3.4 Comportamiento electroquímico de DA y AA sobre un EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD.

#### 8.3.4.1 Estudio de DA por VC.

La figura 8.15 muestra los VCs obtenidos en el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0), los VC obtenidos a diferentes velocidades de barrido muestran un pico de oxidación en  $E_{pa} = 417$  mV y su correspondiente pico de reducción en  $E_{pc} = 316$  mV, así,  $\Delta E = 101$  mV con  $-j_{pa}/j_{pc} = 0.9$ , lo que indica que el proceso puede ser considerado como cuasireversible. Además, a partir de estos resultados se puede probar que la transferencia de electrones con este electrodo es más rápido en comparación con el EPC, Es importante mencionar que el incremento en la corriente capacitiva es notable cuando se modifica el EPC con MWCNT y  $\beta$ -CD.



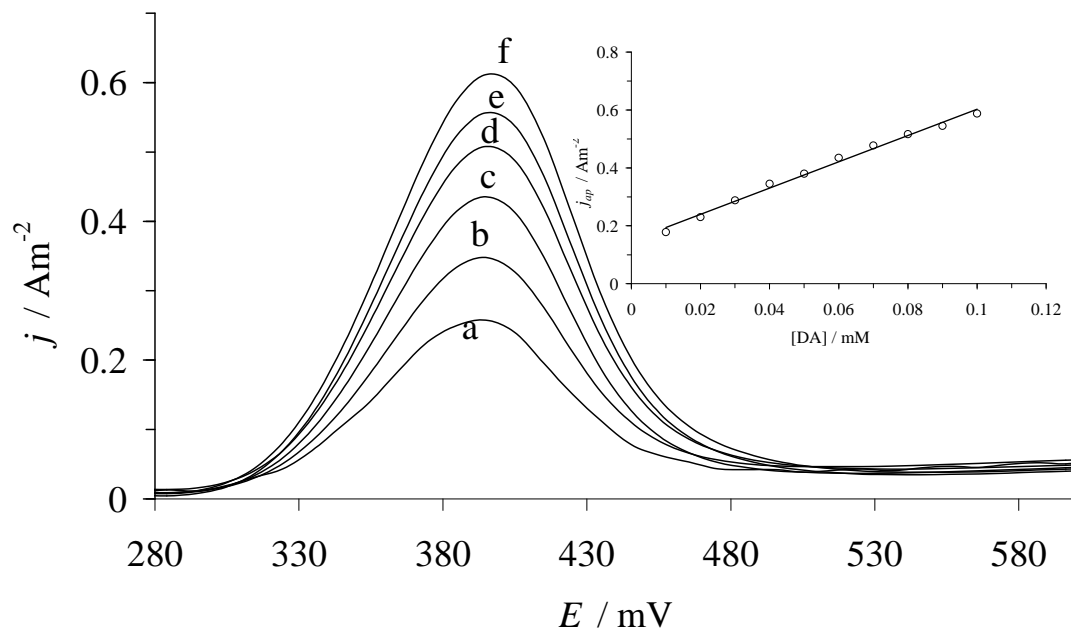


**Figura 8.15.** VCs obtenidos en el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0) a diferentes velocidades de barrido: (a) 10 (b) 20 (c) 40 (d) 60 (e) 80 (f) 100  $\text{mVs}^{-1}$ . El inserto muestra la variación de  $j_{\text{ap}}$ , en función de  $v^{1/2}$ , los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea:  $j \text{ (Am}^{-2}\text{)} = (0.086 \pm 0.001) \text{ Am}^{-2} \text{ mV}^{-1/2} \text{ s}^{-1/2} v^{1/2} + (0.063 \pm 0.007) \text{ Am}^{-2}$  con  $r^2 = 0.9881$ , es el resultado del ajuste lineal.

El análisis del comportamiento de DA a diferentes velocidades de barrido se presenta en el inserto de la figura 8.15, donde se observa que  $j_{\text{pa}}$  varía linealmente con  $v^{1/2}$  indicando que el proceso de la oxidación de DA permanece controlado por difusión. Una variación con respecto a los otros electrodos es que el pico de oxidación no presenta ningún desplazamiento en el potencial del pico de oxidación y reducción cuando la velocidad de barrido se incrementa.

#### 8.3.4.2. Estudio de DA por VDP.

La figura 8.16a muestra las curvas VDPs obtenidas con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/0.1 M NaCl (pH 3.0) a diferentes [DA]. El pico de oxidación se ubica en 394 mV, éste incrementa con la [DA]. El gráfico  $j_{\text{pa}}$  en función de la [DA], se muestra en la figura 8.16b, revela que la respuesta analítica es lineal en función de la concentración de DA, la ecuación lineal que describe este comportamiento es:  $j \text{ (Am}^{-2}\text{)} = (6.53 \pm 0.20) \text{ Am}^{-2} \text{ mM [DA]} + (0.014 \pm 0.013) \text{ Am}^{-2}$ ,  $r^2 = 0.9924$ . La sensibilidad fue de  $6.53 \pm 0.20 \text{ Am}^{-2} \text{ M}^{-1}$  con límite de detección de  $8.40 \pm 0.03 \text{ } \mu\text{M}$ .



**Figura 8.16.** VDPs del sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/NaCl 0.1 M (pH 3.0) a velocidad de barrido de potencial de  $20 \text{ mVs}^{-1}$  y amplitud 0.5, con diferentes [DA]: (a) 0.02 (b) 0.03 (c) 0.04 (d) 0.06 (e) 0.08 (f) 0.1 mM. b) Variación de  $j_p^{DA}$  en función de [DA] obtenida de las curvas mostradas en (a) La línea corresponde a el ajuste lineal de los datos experimentales (o).

Una vez que se ha caracterizado el comportamiento electroquímico de la DA, se realiza el estudio de AA, el cual se describe a continuación.

#### 8.3.4.3. Estudio de AA por VC.

La figura 8.17 muestra los VCs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/AA 1mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0), a diferentes barridos de potencial, cuando se impuso  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , un proceso de oxidación se observó en  $E_{pa} = 270 \text{ mV}$ , cuando el potencial es invertido no se observa ningún pico de oxidación, por lo que el proceso sigue siendo irreversible, se observa también el incremento en la corriente capacitiva lo que corrobora que el electrodo ha sido modificado.

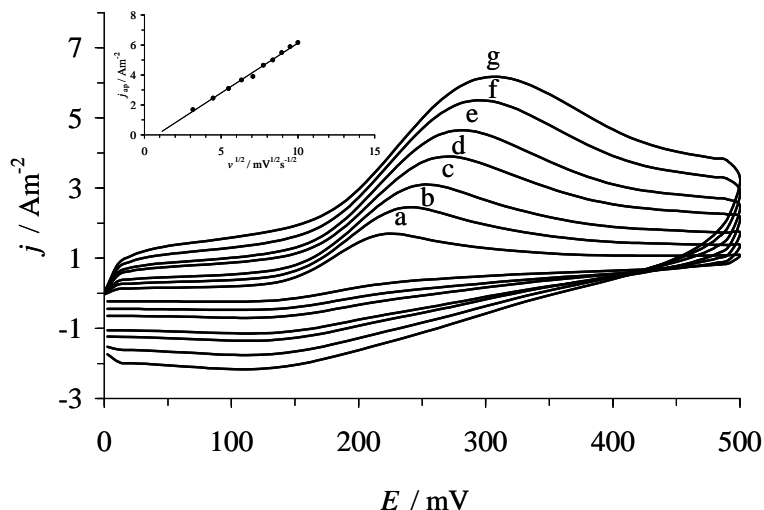


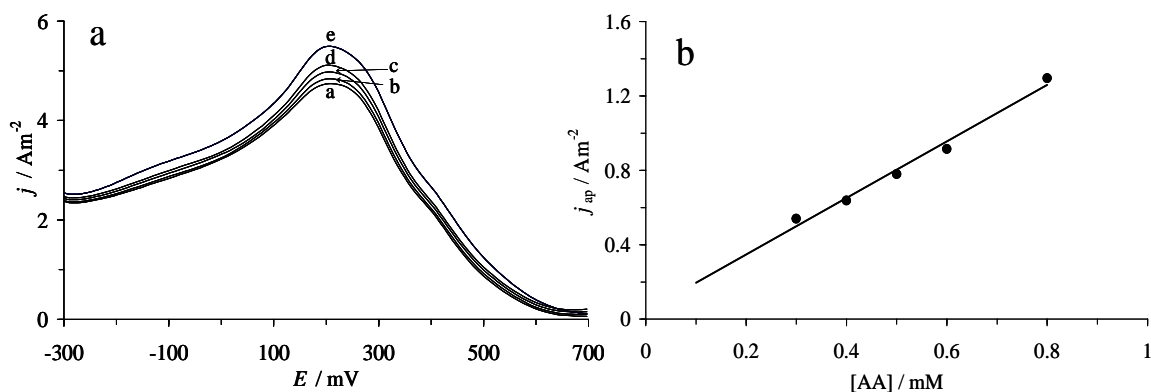
Figura 8.17. VCs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/AA 1mM, NaCl 0.1 M (pH 3.0), a diferentes velocidades de barrido: (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 50, (e) 60, (f) 80 and (g) 100 mVs<sup>-1</sup>.

Inserto gráfico de  $j_{ap}$ , como función de  $v^{1/2}$ , los círculos corresponde a los datos experimentales, mientras que la línea corresponde a el ajuste lineal,  $j$  (Am<sup>-2</sup>) = (0.007 ± 0.018) Am<sup>-2</sup>mV<sup>-1/2</sup> s<sup>-1</sup> v<sup>1/2</sup> - (0.53 ± 0.13) Am<sup>-2</sup> con  $r^2 = 0.9936$ .

Es posible observar que cuando la  $v$  incrementa, el pico de oxidación de AA se desplaza hacia potenciales más positivos. El análisis de la densidad de corriente  $j_{pa}$  muestra que es proporcional a  $v^{1/2}$ , lo que confirma que el proceso está controlado por difusión.

#### 8.3.4.4. Estudio de AA por VDP.

La figura 8.18a muestra los VDPs, obtenidos en el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ NaCl 0.1 M (pH 3.0), a diferentes [AA]. El pico de oxidación se encuentra en  $E_{pa} = 213$  mV. Sin embargo, aún cuando la señal se traslapa con la señal del electrodo existe la posibilidad de cuantificar AA, ver figura 8.18b, La curva de calibración se ajusta a la ecuación:  $j$  (Am<sup>-2</sup>) = (1.52 ± 0.11) Am<sup>-2</sup> mM<sup>-1</sup> [AA] + (0.043 ± 0.060) Am<sup>-2</sup>,  $r^2 = 0.9924$ . A partir de los datos calculados la sensibilidad fue 1.52 ± 0.11 Am<sup>-2</sup>M<sup>-1</sup> con límite de detección de 8.40 ± 0.03  $\mu$ M. El límite de detección y sensibilidad de este electrodo no son apropiados para una determinación analítica.



**Figura 8.18.** a) VDPs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/NaCl 0.1 M (pH =3.0), a la velocidad de barrido de  $20 \text{ mVs}^{-1}$  y amplitud 0.05V, con diferentes [AA] (a) 0.02 (b) 0.04 (c) 0.05 (d) 0.06 y (e) 0.07 mM. b) Variación de  $j_{\text{pa}}$ , en función de [AA]. Los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea a el ajuste lineal

Después de haber caracterizado el comportamiento electroquímico de las especies AA y DA, es posible resumir que cuando se utiliza VDP, la oxidación del pico de DA ( $P_{\text{DA}}$ ), es localizado en 394mV mientras que el de AA  $P_{\text{AA}} = 213 \text{ mV}$ , teniendo una separación efectiva de 181 mV, lo que indica que este electrodo es capaz de separar la señales electroquímicas de DA y AA, para corroborar este hecho se estudia la DA en presencia de AA y se presenta a continuación.

### 8.3.4.5 Estudio de DA en presencia de AA

En la figura 8.19 se presentan los VDPs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/DA 008 mM, AA 1 mM, NaCl 0.1 M, (pH 3.0), donde observan dos picos  $P_{\text{AA}} = 212 \text{ mV}$  correspondiente a la oxidación de AA y  $P_{\text{DA}} = 433 \text{ mV}$ , asociado a la oxidación DA, La separación entre la señales fue de 221 mV, la cual es más grande que la obtenida con los sistemas por separado.

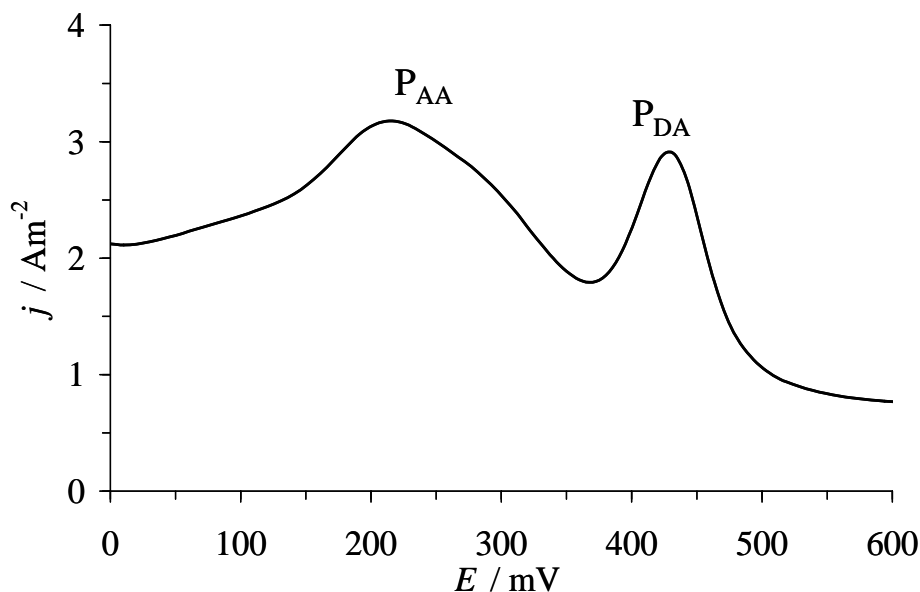


Figura 8.19. VDPs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/DA 008 mM, AA 1 mM, NaCl 0.1 M, (pH 3.0), a velocidad de barrido de  $20 \text{ mVs}^{-1}$  y amplitud 0.05 V.

La figura 8.20a muestra los VDPs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/AA 1 mM, 0.1 M NaCl, (pH 3.0) para varias [DA]. la figura 8.20b muestra la curva de calibración obtenida para este sistema, donde es claro la tendencia lineal con la [DA] en el intervalo de concentración de 0.01 a 0.13 mM, la ecuación que correlaciona este comportamiento es:  $j_p^{DA} (\text{Am}^{-2}) = (14.71 \pm 0.81) \text{Am}^{-2} \text{mM}^{-1} [\text{DA}] + (0.147 \pm 0.033) \text{Am}^{-2}$  con  $r^2 = 0.9921$ . A partir de estos resultados se obtuvieron los siguientes parámetros analíticos: límite de detección  $5.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ , sensibilidad =  $14.71 \pm 0.81 \text{Am}^{-2} \text{mM}^{-2}$ .

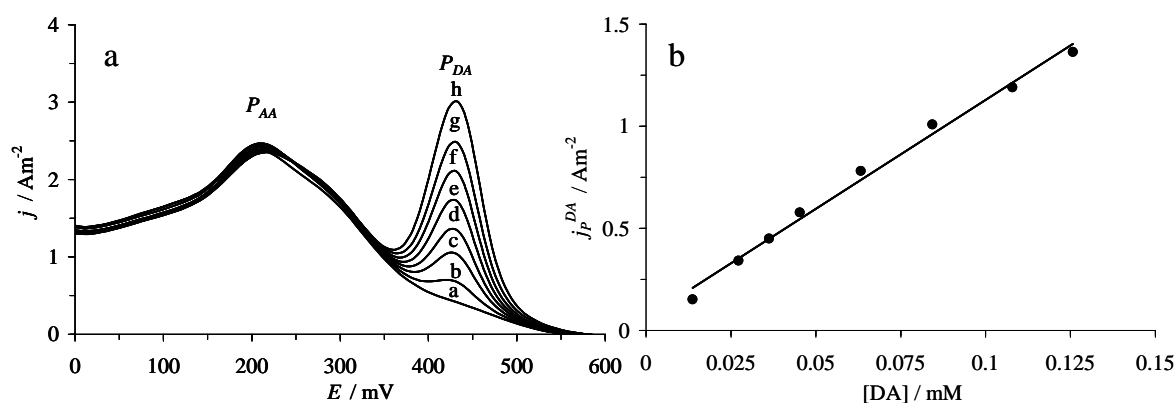


Figura 8.20. a) VDPs obtenidos con el EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/AA 1 mM, NaCl, (pH 3.0) 0.1 M para varias [DA]: (a) 0, (b) 0.02 (c) 0.05 (d) 0.08 (e) 0.01 (f) 0.14 (g) 0.16 (h) 0.2 mM. En todos los casos la velocidad de barrido de potencial fue  $20 \text{ mVs}^{-1}$  y amplitud 0.05 V. b) Variación de  $j_p^{DA}$  como función de la [DA] obtenida de los DPVs mostrados en a). Los círculos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea el ajuste lineal.

### 8.3.5 Comportamiento electroquímico de DA y AA sobre un EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD.

#### 8.3.5.1 Modificación del electrodo EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD.

Considerando los resultados mostrados para el EPC/poly- $\beta$ -CD y EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD, se propone formar el polímero de  $\beta$ -CD sobre el EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD para mejorar la respuesta del electrodo, para ello se prepara el EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD y se sumerge en la solución ( $\beta$ -CD (0.01M) –HClO<sub>4</sub> (1M)), para formar el poly- $\beta$ -CD sobre los nanotubos, sin embargo al iniciar el proceso se observa que los CNT se disuelven y no se puede formar la membrana, considerando que esto se debe al valor de pH de la solución se cambian las condiciones de síntesis utilizando una solución ( $\beta$ -CD (0.01M) –HClO<sub>4</sub> (0.1M)).

El crecimiento de la membrana de  $\beta$ -CD (figura 8.21) se hizo sobre el electrodo de pasta de carbón modificado con MWCNT/  $\beta$ -CD, en la ventana de potencial de -800 a 1600 mV a velocidad de barrido de 100 mV/s, el perfil de la membrana muestra un pico de oxidación en 0.4, éste es asociado con la membrana de MWCNT/ $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD además se presenta otro pico de oxidación en 1.146 V y un pico de reducción en 0.46 V, con el incremento del número de ciclos se observa que tanto el pico anódico y catódico, tienen un incremento en la intensidad de la corriente, y que la corriente capacitiva crece, sin embargo es más evidente el efecto sobre los picos de oxidación y reducción, antes mencionados.

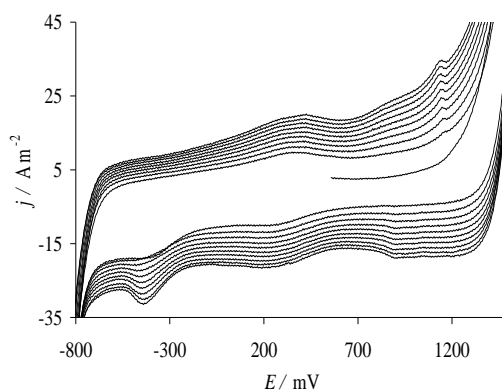
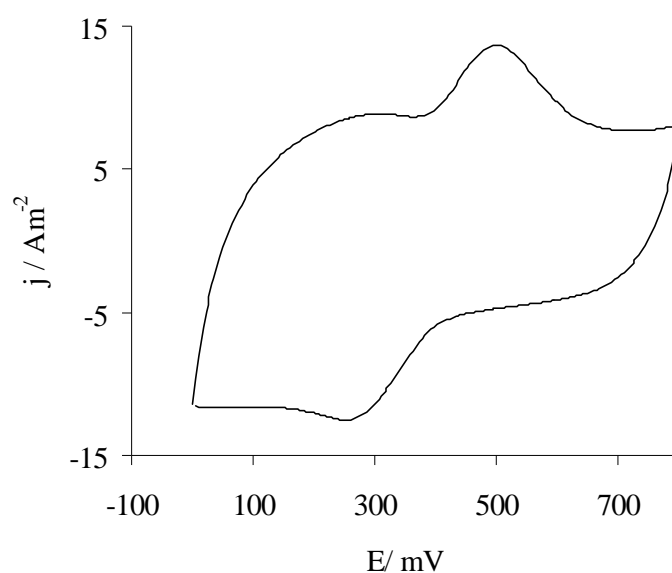


Figura 8.21. VCs del sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD /poly- $\beta$ -CD 0.01 M/HClO<sub>4</sub> 0.1 M, después de 10 ciclos a velocidad de barrido de 100 mVs<sup>-1</sup>.

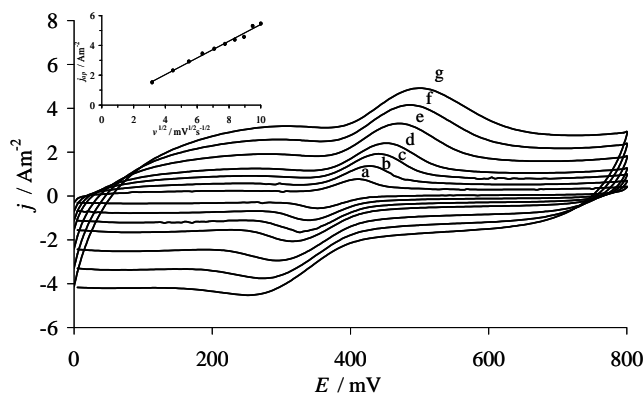
### 8.3.5.2 Comportamiento electroquímico de EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD

En la figura 8.22 se muestra el VC para el sistema EPC /MWCNT / $\beta$ CD /poly- $\beta$ CD NaCl 0.1 M (pH 3.0) para DA 0.1 mM, en una ventana de potencial de 0 a 800 mV; a  $100\text{mVs}^{-1}$  en el sentido anódico se observa un proceso de oxidación cuyo potencial ( $E_{ap}$ ) se ubica en 498 mV y un proceso de reducción cuyo potencial ( $E_{cp}$ ) está en 256 mV. La relación entre la corriente del pico anódico y catódico ( $-j_{ap}/j_{cp}$ ) es de 0.91, por otro lado la diferencia entre del potencial del pico anódico y catódico ( $E_{ap} - E_{cp} = \Delta E$ ) es de 242 mV, este valor indica que el proceso es cuasi reversible.



**Figura 8.22.** VCs obtenidos con el sistema EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD NaCl 0.1 M (pH 3.0) para DA 0.1 mM, a velocidad de barrido de  $100\text{ mVs}^{-1}$ .

La familia de VC en función de la velocidad para DA 0.1 mM en NaCl 0.1 M (pH 3.0), en la ventana de potencial de 0 a 800 mV (Figura 8.23a), muestra que a medida que aumenta la velocidad  $\Delta E$  es mayor, lo que implica que el proceso es cuasireversible. Este comportamiento es similar al obtenido para el EPC/poly- $\beta$ -CD.



**Figura 8.23. (a) VCs obtenidos con el sistema EPC /MWCNT / $\beta$ CD /poly- $\beta$ CD para DA 0.1 mM (pH 3.0) a diferentes velocidades de barrido (a) 10 (b) 20 (c) 40 (d) 60 (e) 80 (f) 100  $\text{mVs}^{-1}$ . Inseto: Variación de  $j_{ap}$ , en función de  $v^{1/2}$  los círculos corresponde a los datos experimentales y la línea al ajuste lineal.**

Al analizar la  $j_{ap}$  en función de la velocidad, se encontró que  $j_{ap}$  proporcional al cambio en la  $v$ , al graficar  $j_{ap}$  vs  $v^{1/2}$  (figura 8.23b) se muestra que la  $j$  tiene un incremento lineal en función de la  $v^{1/2}$ , la ecuación obtenida de esta regresión lineal es  $j_{ap} = 0.20 + 0.56 v^{1/2}$  y el coeficiente de correlación lineal es de 0.9912, por lo que el proceso está controlado por difusión.

A partir de los resultados se muestra que electrodo EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD, hace que el potencial de oxidación se presente a potenciales mas negativos, y favorece la reversibilidad del proceso en comparación con el EPC sin modificar, sin embargo, la respuesta electroquímica es mucho mejor cuando se trabaja con un electrodo de EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD.

Esto quizá sea debido a que la polimerización de la  $\beta$ -CD sobre los MWCNT/CD, desfavorezca las propiedades catalíticas de los CNT, pues la película de  $\beta$ -CD cubre los sitios activos de éstos. No obstante y dado a que el carácter de la  $\beta$ -CD indica que es el factor que da la selectividad a los electrodos se realizó el estudio para la cuantificación de DA, donde se realiza una curva de calibración para DA y posteriormente el estudio con ácido ascórbico.

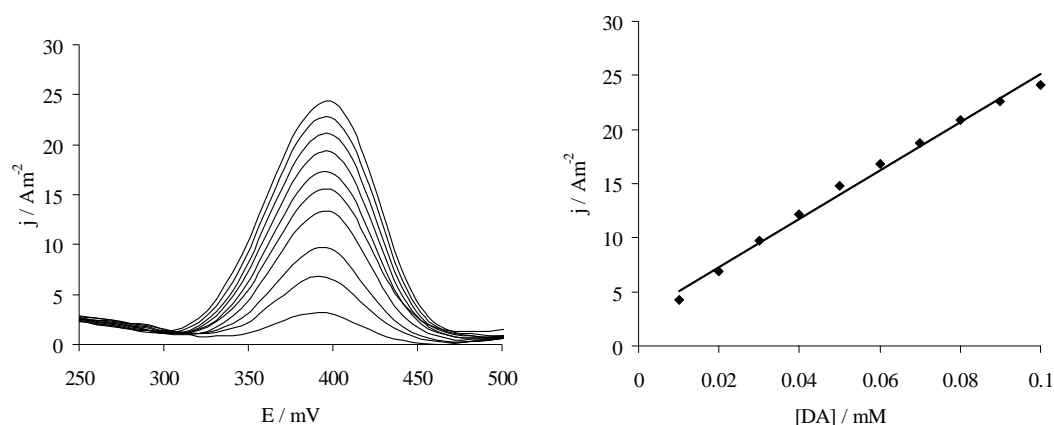
### 8.3.5.3 Estudio de la DA sobre EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD.

La figura 8.24a muestra los DPV para el sistema EPC/MWCNT- $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD a diferentes [DA] en NaCl 0.1 M (pH 3.0) en la ventana de potencial de 250 a 600 mV. El



pico de oxidación se ubica en 396 mV, el cual se incrementa conforme la [DA] aumenta en el sistema.

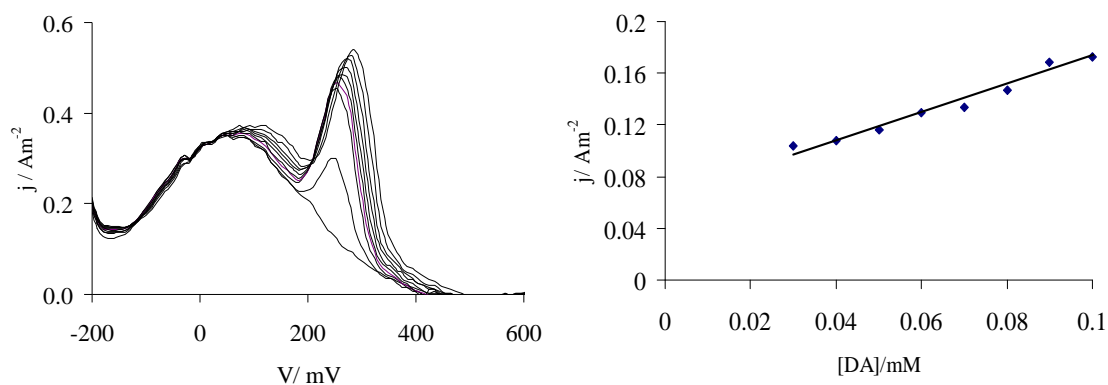
Graficando la  $j_{pa}$  en función de la [DA] (figura 8.24b) se observa que la respuesta analítica es lineal en función de la concentración en el intervalo de estudio, la ecuación lineal que describe el comportamiento es  $j_{ap} (\text{Am}^{-2}) = (9.99 \pm 0.32) \text{Am}^{-2} \text{mM}^{-1} [\text{DA}] + (0.018 \pm 0.020) \text{Am}^{-2}$ , con límite de detección de  $15 \pm 1.9 \mu\text{M}$ .



**Figura 8.24.** a) Curvas VDP para el sistema EPC/MWCNT- $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD en NaCl 0.1 M (pH 3.0) para [DA] de (a) 0.01 (b) 0.02 (c) 0.03 (d) 0.04 (e) 0.05 (f) 0.06 (g) 0.07 (h) 0.08 (i) 0.09 (j) 0.10 mM. Velocidad de barrido  $20\text{mVs}^{-1}$ , amplitud 0.05 V b) Análisis estadístico para la curva del inciso a). los círculos corresponde a los datos experimentales y la línea al ajuste lineal.

#### 8.3.5.4 Estudio VDP de la DA con AA en EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD/ poly- $\beta$ -CD

En la figura 8.25 se muestran los VDP para el sistema EPC/MWCNT- $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD NaCl 0.1 M (pH 3.0) para 1 mM AA a diferentes [DA], en la ventana de potencial de -200 a 600 mV, en este estudio es posible observar que la señal que predomina es la correspondiente al del AA (61 mV), al incrementar la [DA] en el sistema se observa el pico de oxidación asociado a la señal en 243 mV, a medida que aumenta la concentración de DA éste tiene un desplazamiento de 40mV hacia potenciales más positivos, sin embargo las señales de DA y AA se traslapan por lo que la DA no puede ser cuantificada, el gráfico (figura 8.25b) muestra que el comportamiento de  $j_{pa}$  en función de la concentración de dopamina es lineal, aún cuando la señal es la contribución de las dos especies.



**Figura 8.25. Curvas VDP para el sistema EPC/MWCNT- $\beta$ -CD/poly- $\beta$ -CD NaCl 0.1 M (pH 3.0) para AA 1 mM a diferentes [DA]: (a) 0, (b) 0.03 (c) 0.04 (d) 0.05 (e) 0.06 (f) 0.07 (g) 0.08 (h) 0.09 (i) 0.1. Velocidad de barrido  $20\text{mVs}^{-1}$ , amplitud 0.01 b) Análisis estadístico para las curvas del inciso a) los círculos corresponde a los datos experimentales y la línea al ajuste lineal**

A partir del gráfico mostrado en la figura 8.25b, se obtuvieron los parámetros de sensibilidad  $0.167 \pm 0.056 \text{ Am}^{-2}\text{mM}^{-1}$  y límite de detección  $492 \pm 210 \mu\text{M}$ . Este límite de detección es muy alto por lo que la DA no puede ser determinada con este electrodo en presencia de AA.

La tabla 8.2 y 8.3 se resumen las características de los electrodos empleados en este capítulo para la determinación de DA en presencia de AA. A partir de los datos de la tabla 8.2, se encuentra que el mejor electrodo diseñado, en términos de límite de detección fue EPC/poly- $\beta$ -CD. La sensibilidad por otra parte puede ser analizada en función de la constante heterogénea de reacción ( $k^\circ$ ), ya que cuando el valor de  $k^\circ$  incrementa, la sensibilidad también. Sin embargo, esta característica no se observa en el límite de detección. Por otra parte, este electrodo y el EPC /MWCNT/ $\beta$ -CD fueron los mejores para la determinación de DA en presencia de AA, ver tabla 8.3. Ambos electrodos mostraron una sensibilidad y límite de detección similar para DA, La capacidad para la detección de DA en muestras reales es evaluada a continuación.

**Tabla 8.2. Parámetros analíticos para cada electrodo estudiado para la determinación de DA**

Electrode	$E_{ap}$ /mV *	$E_{cp}$ /mV *	$\Delta E$ /mV *	$-j_{cp}/j_{ap}$ *	Sensibilidad /Am <sup>-2</sup> mM <sup>-1</sup> **	Límite de detección /μM **	10 <sup>2</sup> k° /cm s <sup>-1</sup> ***
EPC	508	115	393	0.52	0.936 ± 0.004	2.0 ± 0.1	0.015
EPC/poly-β-CD	471	258	213	0.93	8.245 ± 0.048	1.53 ± 0.3	4.56
EPC /MWCNT/β- CD	417	316	101	0.90	6.53 ± 0.20	8.40 ± 0.03	6.54
EPC/MWCNT/β- CD/ poly-β-CD	498	256	242	0.91	9.99 ± 0.32	15 ± 1.9	—

\* Medidas experimentales obtenidas de VCs a  $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ . \*\* Medidas obtenidas de los VDPs a  $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ . \*\*\* Constante de velocidad heterogénea,  $k^\circ$ , de la oxidación de dopamina oxidación fue determinada de los datos experimentales  $E_p = f(\ln \nu)$  para cada electrodo en una solución acuosa de DA 0.1 mM, NaCl 0.1 M a pH = 3.0 usando usando la metodología del capítulo 5.

**Tabla 8.3. Parámetros analíticos para cada sistema donde la DA fue determinada en presencia de AA. Los valores fueron obtenidos de los VDPs.**

Electrodo	$E_{AA}$ /mV *	$E_{DA}$ /mV *	$E_{DA}-E_{AA}$ /mV *	Sensibilidad /Am <sup>-2</sup> mM <sup>-1</sup>	Límite de detección /μM
EPC	450	600	150	1.145 ± 0.013	14 ± 24
EPC/poly-β-CD	171	402	231	14.83 ± 0.18	4.10 ± 0.05
EPC /MWCNT/β-CD	212	433	221	14.71 ± 0.81	5.7 ± 0.3
EPC/MWCNT/β- CD/ poly-β-CD	61	243	182	0.167 ± 0.056	492 ± 210

\* Medidas a partir de los VC experimentales obtenidos a  $100 \text{ mV s}^{-1}$

### 8.3.6 Recobro y determinación de DA en fármacos.

El recobro fue estudiado en solución acuosa, en una muestra que contenía 1 mM AA y 0.1M NaCl (pH 3.0), y se prepararon dos soluciones con concentraciones de [DA]: 0.08 y 0.1 mM. Los VDPs fueron obtenidos para cada [DA] empleando: EPC /poly-β-CD, EPC/MWCNT/β-CD, a partir de la curva de correspondiente a los sistemas EPC/poly-β-

CD y EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD in figura 8.14b y 8.20b respectivamente; los siguientes valores fueron obtenidos:

El recobro para el EPC/poly- $\beta$ -CD fue del 93 y 90%, para las concentraciones de 0.075 y 0.09 mM, mientras que para el EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD fue entre el 99 y 100.5% para concentraciones de 0.079 y 0.105mM.

Para esta determinación analítica, se emplea la solución inyectable clorhidrato de DA (Laboratorios Kendrick, 250mg/5mL), de la cual se toma 100  $\mu$ L y se diluye en a 10 mL de 0.1 M NaCl, 1mM AA a pH 3.0, a partir de esta solución se hace una dilución de 220  $\mu$ L 10 mL de 0.1 M NaCl, 1mM AA a pH =3.0, y con los electrodos modificados: EPC/poly- $\beta$ -CD y EPC /MWCNT/ $\beta$ -CD se obtuvieron los VDPs en y con cada uno de los electrodos modificados se obtiene el VDP, La [DA] del fármaco fue determinada con el respectivo valor de  $j_p^{DA}$  obtenido de la curva de calibración presentada en la figura 8.14b y 8.20b, este procedimiento fue llevado a cabo 3 veces con el fármaco mencionado. Los principales resultados de este estudio se presentan en la tabla 8.4. Estos resultados son satisfactorios y muestran que este método con el empleo de los electrodos modificados puede ser eficiente para la determinación de DA en una producto inyectable.

**Tabla 8. 4. Resultados obtenidos de la determinación de DA en fármacos en presencia de AA del laboratorio Kendricks usando los mejores electrodos diseñados en este capítulo.**

DA (muestra) / Laboratory Kendricks Tipo de Electrodo	[DA] Etiqueta/ concentración / M	[DA] Encontrada / M
EPC/poly- $\beta$ -CD	0.21	0.198 $\pm$ 0.010
EPC/MWCNT/ $\beta$ -CD	0.21	0.200 $\pm$ 0.008

<sup>a</sup> Los resultados son expresados con  $\pm$  D.S. basado en 3 réplicas en el intervalo de confianza de 95%.

### 8.3.7. Conclusiones

Los sistemas supramoleculares han sido desarrollados basados en el desarrollo de electrodos de pasta de carbón modificados con nanotubos de carbón de multipared y  $\beta$ -ciclodextrina. Estos electrodos fueron usados para el estudio de la determinación cuantitativa de dopamina con y sin ácido ascórbico presente en solución. Se encontró

que el uso de EPC modificado con un polímero conductor como  $\beta$ -ciclodextrina, la dopamina puede ser determinada electroquímicamente. Se encontró también que estos sistemas son prácticos y eficientes para la cuantificación de dopamina en muestras farmacéuticas.

## CAPÍTULO 10

### DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ DE AZOMETINA-H MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

#### 10.1 Introducción

La Azometina-H es utilizada para la determinación de micronutrientes como Boro en plantas y vegetales [10.1-10.3], estas determinaciones se hacen basadas en la formación de complejos, sin embargo, en la literatura revisada, pocos son los trabajos que reportan la formación de este complejo, mientras que del comportamiento químico no se encontró ningún trabajo sobre dicha molécula.

Por lo que conocer las propiedades químicas de los colorantes permite relacionar de una mejor manera sus características estructurales con su aplicación.

En este capítulo se analiza el comportamiento químico de la Azometina-H, mediante estudios espectrofotométricos, el primer paso es el estudio sobre la estabilidad de la molécula, considerando que algunos azo-compuestos son sensibles a las influencias ambientales como aire y luz, se analiza en primera instancia el efecto del oxígeno del aire y el contacto de la molécula con la luz sobre la estabilidad de la misma, para posteriormente hacer la determinación de las constantes de acidez de la Azometina-H.

Sin embargo la determinación de las constantes de acidez para compuestos del tipo de las Azometinas resulta complicada, pues este tipo de moléculas pueden presentar equilibrios tautoméricos [10.4-10.6].

Por otra parte la tautomerización y los procesos de transferencia de protones que pueden formar este tipo de moléculas son de gran interés científico debido a su importancia fundamental en muchos procesos químicos y bioquímicos y su papel en diferentes mecanismos.

En los últimos años se ha generado un interés y esfuerzo particular en el entendimiento de los factores básicos a nivel molecular que dictan los equilibrios tautoméricos, el papel de las propiedades electrónicas, y las propiedades geométricas así como también la influencia de factores estéricos sobre los equilibrios tautoméricos y la velocidad de transferencia de protón en los sistemas biológicos.

Ya que los diferentes estados tautoméricos son muy similares en energía, (solo pocas Kcal/mol de una a otra estructura), la interacción con el medio ambiente podría tener un efecto significativo sobre las propiedades cinéticas y termodinámicas de tales sistemas tautomerizados.

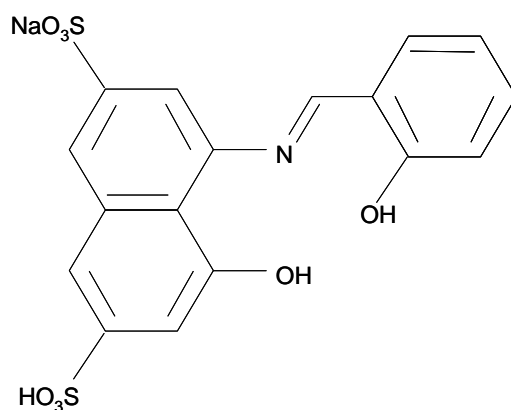
Considerando lo anterior es necesario establecer las condiciones en las cuales se tienen las especies de la Azometina-H sin evolucionar a tautómeros, o tener reacciones de otro tipo, para poder determinar adecuadamente las constantes de acidez asociadas a esta molécula, es por ello que se pretende estudiar la estabilidad de la Azometina-H considerando los siguientes factores:

- Presencia de oxígeno en el sistema
- Contacto del sistema con la luz
- Variaciones del pH en el sistema

Analizados los factores que influyen en la estabilidad de la Azometina-H, se establecen las condiciones de estudio y el siguiente paso será la determinación de las constantes de acidez.

## **10.2. Estudio de estabilidad de Azometina-H.**

**Hipótesis:** La figura 10.1 muestra la molécula de Azometina-H (4-hidroxi-5-[salicilideneamino]-2-7-ácido naftalenedisulfónico monosódico), de acuerdo con la estructura molecular pueden existir más de tres constantes de acidez asociadas a protones ácidos de la molécula, correspondientes al grupo amino y los grupos hidroxilo.



**Figura 10.1 Estructura molecular Azometina-H**

Con el fin de conocer el comportamiento de la Azometina-H y como se ve afectada la estabilidad de ésta, se realizó un estudio, el cual está basado en tomar espectros de absorción de la especie en pH ácido y básico a diferentes tiempos, por otra parte se analiza el comportamiento en condiciones ambientales donde se tienen factores como son el contacto del sistema con la luz y el oxígeno.

El análisis de estabilidad se hará sobre el seguimiento de una de las bandas del espectro de absorción de la Azometina-H, la metodología puede ser consultada en el apéndice A.

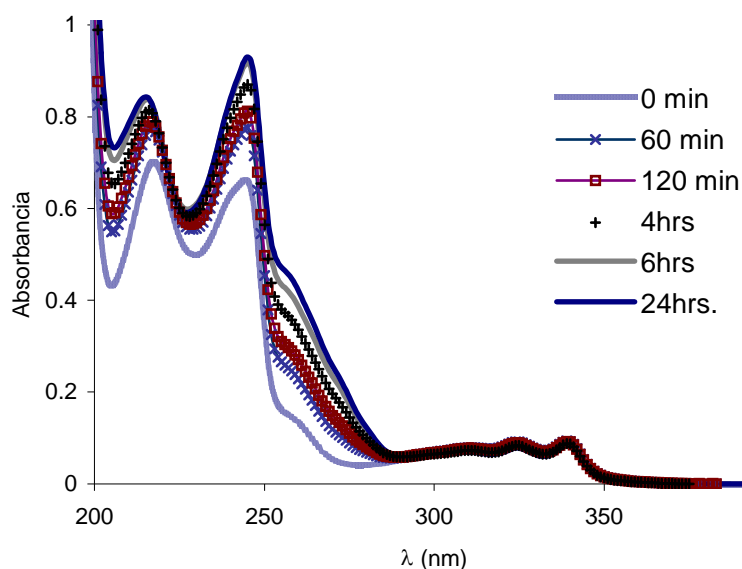
### **10.2.1. Estudio de estabilidad de la Azometina-H a pH 1.5.**

Para realizar este estudio se prepara una solución de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M a pH 1.5, éste se ajusta con una solución 0.1M de HCl, y se toman sus espectros de absorción a diferentes tiempos, esto se hará con el fin de encontrar el tiempo o el intervalo de tiempo en el que la Azometina-H alcanza el equilibrio.

El comportamiento espectrofotométrico en el tiempo de la Azometina-H se presenta en la figura 10.2.



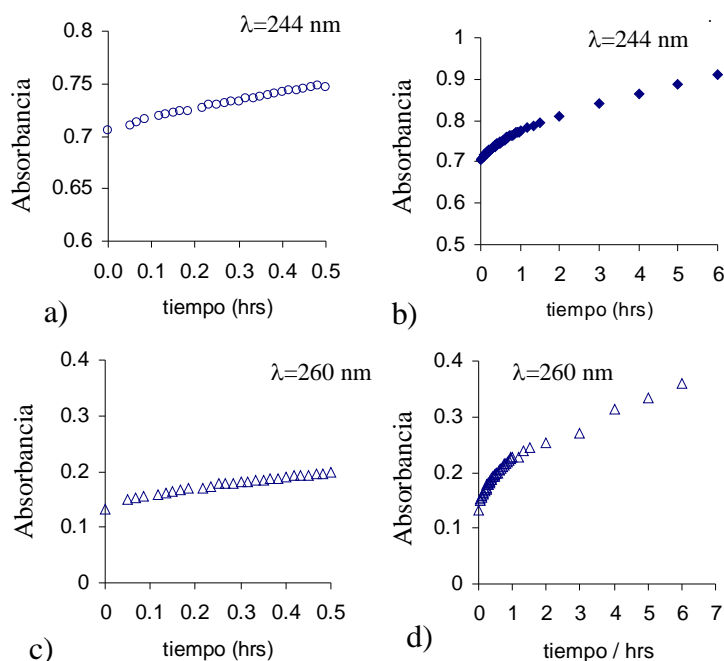
La familia de espectros de Azometina-H en pH ácido presenta dos bandas cuyos máximos de absorción corresponden a la longitud de onda de 217 nm y 244 nm, además presenta un hombro alrededor de 260 nm, en la región de 300 a 350 se tiene una banda, el máximo de absorción corresponde a la longitud de onda de 338 nm.



**Figura 10.2.** Espectros de absorción de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en 0.1M de HCl a diferentes tiempos de disolución, en condiciones ambientales.

La presencia de las bandas en la región de 200 a 250 nm puede ser asignada a la transición de los electrones  $\pi \rightarrow \pi^*$  del anillo aromático, mientras que la banda ubicada en la región de 300 a 350 nm es debido a la excitación de los electrones del grupo Azometina (C=N).

Conforme transcurre el tiempo los máximos en 217 y 244 nm presentan un efecto hipercrómico, mientras el hombro de 260 nm aumenta hasta casi presentarse como una nueva banda, estos cambios se pueden apreciar mejor en el gráfico de la variación de la absorbancia de la banda de 260 y 244 nm en función del tiempo de la figura 10.3.



**Figura 10.3.** Gráfico del comportamiento de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en 0.1M de HCl, en función del tiempo en condiciones ambientales a,b) 244 nm, c,d) 260 nm.

Como puede observarse en la figura 10.3a la banda ubicada en 244 nm, en los primeros 30 min. ha incrementado su absorbancia el 10% respecto a su valor inicial, sin embargo transcurridas 6 hrs (figura 10.3b) la absorbancia aumenta 0.2 unidades y transcurridas 24h rs la absorbancia aumentó un 38% más.

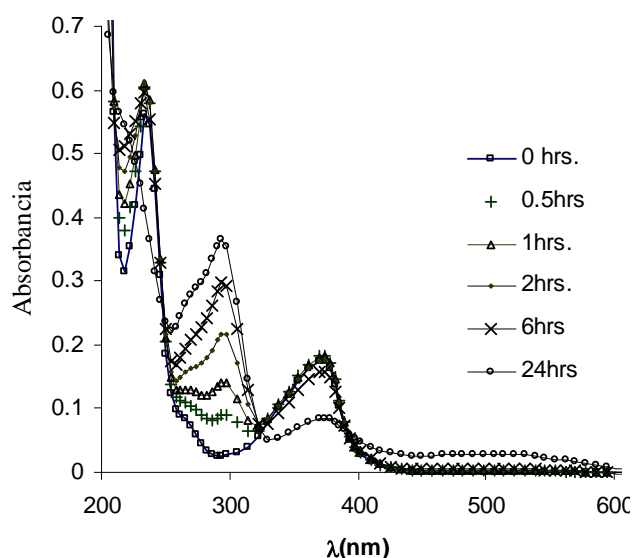
Por otra parte en 260 nm el incremento en absorbancia que presenta la Azometina-H, se ve reflejado a lo largo de toda la experimentación, para los primeros 30min transcurridos la absorbancia incrementa al doble (figura 10.3c), y después de 6 horas la absorbancia es 3 veces la inicial (figura 10.3d).

De acuerdo con el comportamiento espectral de la Azometina-H se observa que la molécula presenta cambios significativos en 244 nm y 260 nm, la primer señal puede ser asociada con la evolución del anillo aromático correspondiente al fenol del grupo salicildenamino y la segunda asociada quizá a una posible descomposición de este fenol.

Cabe mencionar que la señal de 300 a 350 nm asociada con el grupo azometino, se mantiene sin cambios durante toda la experimentación, indicativo de la estabilidad de éste.

### 10.2.2 Estudio de estabilidad de la Azometina-H a pH 11.5

En la figura 10.4 se presenta la familia de espectros de absorción obtenidos a diferentes tiempos, de una solución de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M a pH 11.5, el pH se ajustó con 0.1M NaOH, el sistema se mantuvo en atmósfera de oxígeno y presencia de luz.

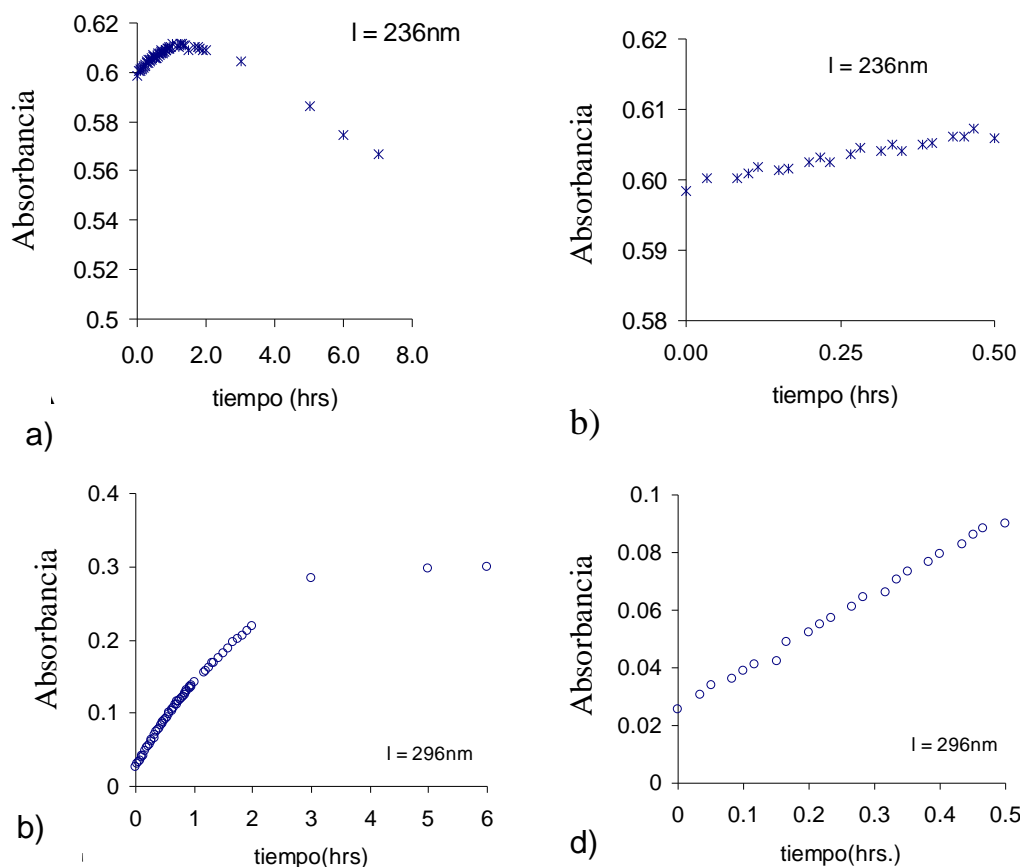


**Figura 10.4.** Comportamiento espectral en el tiempo de  $1 \times 10^{-5}$  M Azometina-H a pH 11.5 ajustado con 0.1M NaOH en condiciones del medio ambiente (luz y oxígeno).

El espectro de absorción de la Azometina-H presenta una banda de absorción en 373 nm ésta es asignada frecuentemente a la transferencia de carga intramolecular, también se observa una banda en 235nm, ésta corresponde a las transiciones de los electrones  $\pi \rightarrow \pi^*$  del anillo aromático, con el paso del tiempo la Azometina-H evoluciona y se observa la formación de la banda en 296 nm que puede ser asociada a la transición de los electrones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de baja energía [10.6].

El análisis de la evolución de la Azometina-H en el tiempo se presenta en la figura 10.5a, donde la evolución se ve reflejada con el incremento en absorbancia de las bandas y la formación de la banda en 296 nm, la cual sigue su evolución hasta alcanzar

un valor en absorbancia de 0.36 unidades, transcurridas 24 hrs se presenta una banda en el visible en 450nm, la banda ubicada en 273 nm sufre un efecto hipocrómico, por otra parte la banda ubicada en 235 nm desaparece.



**Figura 10.5. Comportamiento de la absorbancia en  $\lambda = 236$  y  $296$  nm en función del tiempo. A partir de los espectros de absorción de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en 0.1M de NaOH, en condiciones del medio ambiente.**

El comportamiento de las bandas de la Azometina-H a pH básico en función del tiempo se observa en la figura 10.5a, donde se puede observar que para la banda ubicada en 236 nm la molécula sufre un efecto hipercrómico durante 2 hrs., después de tres horas la Azometina-H en esta longitud de onda presenta el efecto contrario pues la absorbancia empieza a disminuir y al cabo de 24 hrs esta banda desaparece, sin embargo durante la primera media hora la Azometina-H permanece prácticamente sin cambios (figura 10.5b).

Por otra parte la formación de la banda ubicada en 296 nm presenta un efecto hipercrómico de tal forma que al cabo de 30 min la banda presenta un valor de

absorbancia de 0.09 figura (10.5d), y al cabo de dos horas la banda presenta un valor en absorbancia de 0.2, en 24 hrs la banda alcanza un valor de 0.3 (figura 10.5d).

Con base al estudio del comportamiento espectral se sabe que la Azometina-H presenta cambios considerables en 235 nm donde se presenta el incremento en absorbancia, en 296 nm donde se forma una nueva banda, y en la región de 300 a 400 nm la Azometina-H permanece sin cambios, cabe mencionar que en esta región absorbe el grupo azometino, y en 235 nm absorbe uno de los grupos aromáticos presentes en la molécula, por otra parte la banda en 296 nm puede ser asociada con la evolución del uno de los anillos aromáticos de la molécula, se reporta que el grupo naftaleno absorbe alrededor de 300 nm, por lo cual quizá esta banda sea asociada a la evolución de la Azometina-H por la influencia de este grupo.

Con los estudios realizados hasta el momento podemos concluir que la molécula de Azometina-H permanece sin cambios espectrales por un periodo de tiempo corto, esto es en los primeros 8 min, ya que los espectros de absorción así lo muestran, después de este tiempo la evolución de la molécula está asociada con los procesos que pueden sufrir los grupos funcionales que la conforman.

Por otra parte como ya se mencionó la Azometina-H puede presentar equilibrios tautoméricos de tipo ceto-enol, por lo que quizá la presencia de esta tautomerización esté también relacionada con el comportamiento espectral de la molécula.

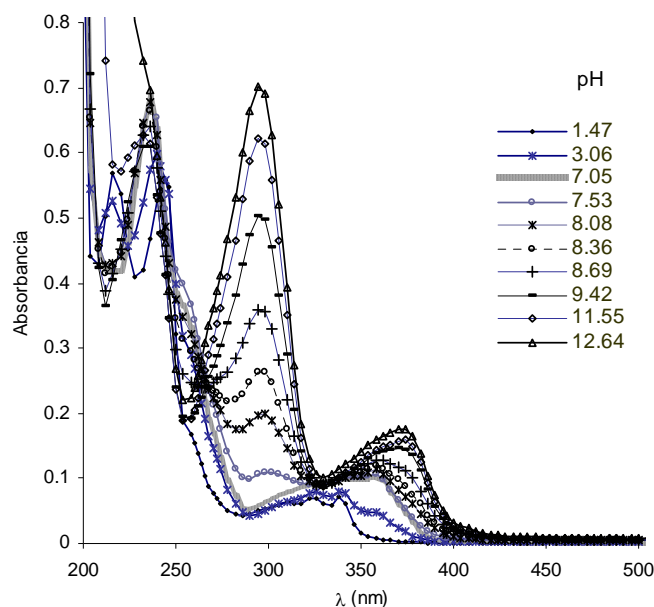
El estudio de la Azometina-H por UV-Vis no es suficiente para asegurar o concretar los procesos que sufre la Azometina-H.

Considerando lo anterior se analiza el efecto del pH para lo cual se realizan titulaciones ácido base. Con el estudio espectrofotométrico en función del pH de la Azometina-H es posible determinar las constantes de acidez.

### 10.2.3 Titulación ácido base

Para conocer el comportamiento espectral y las posibles especies ácido base de la Azometina-H se realizó una valoración, con este estudio se pretende analizar si con los cambios de pH, las especies presentes en el sistema se mantienen, además de analizar los cambios espectrales en diferentes valores de pH.

La titulación ácido base se llevó a cabo a partir de una solución fresca de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  AZ en 0.1M de HCl y realizando adiciones de 0.1M de NaOH. Para cada adición se tomó el espectro de absorción y las lecturas de pH, la experimentación se llevó a cabo en condiciones ambientales, sólo se controló la temperatura a 25°C.



**Figura 10.6.** Cambio espectral en función del pH de Azometina-H  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  en 0.1M HCl en condiciones ambientales (luz y oxígeno), obtenidos a partir de una valoración ácido base.

En la figura 10.6, se pueden observar los espectros de absorción de la Azometina-H en el intervalo de pH 1.5-12.6, los cuales presentan tres bandas características ubicadas en  $\lambda_{\text{máx.}} = 200-250 \text{ nm}$  la cual frecuentemente es asignada a la transición de los electrones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de anillos aromáticos, la banda a  $\text{pH} \leq 3.5$  con  $\lambda_{\text{máx.}} = 300-350 \text{ nm}$  se debe a la excitación de electrones  $\pi \rightarrow \pi$  del grupo Azometino, mientras que la banda producida a partir de  $\text{pH} \geq 8$  en  $\lambda = 250-320 \text{ nm}$ , es debido a la transición de baja energía de  $\pi \rightarrow \pi^*$ , por último la banda en  $\lambda_{\text{máx.}} = 330-400 \text{ nm}$  puede ser asociada a los electrones de

transición dentro de la molécula, esta banda también se atribuye a la posible existencia de tautomerismo NH/OH [10.7-10.9].

Las bandas  $\lambda_{\text{máx.}} = 217 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{máx.}} = 244 \text{ nm}$  desaparecen y en  $\text{pH} = 4$  sólo presenta un máximo en  $233 \text{ nm}$ , éste sufre un desplazamiento batocrómico a medida que aumenta el pH, mientras que la banda ubicada en  $\lambda_{\text{máx.}} = 320\text{-}340 \text{ nm}$  a pH ácido, sufre también un desplazamiento batocrómico, ubicándose en  $\lambda_{\text{máx.}} = 330\text{-}400 \text{ nm}$ . El incremento de pH también propicia la aparición de la banda en  $\lambda_{\text{máx.}} = 250\text{-}320 \text{ nm}$  así como un efecto hiperacrómico.

Los espectros de absorción muestran tres puntos isobésticos en  $\lambda = 214, 255$  y  $300 \text{ nm}$ , estos evidencian la presencia de equilibrios ácido base, las curvas de absorbancia pH se presentan en la figura 10.7.

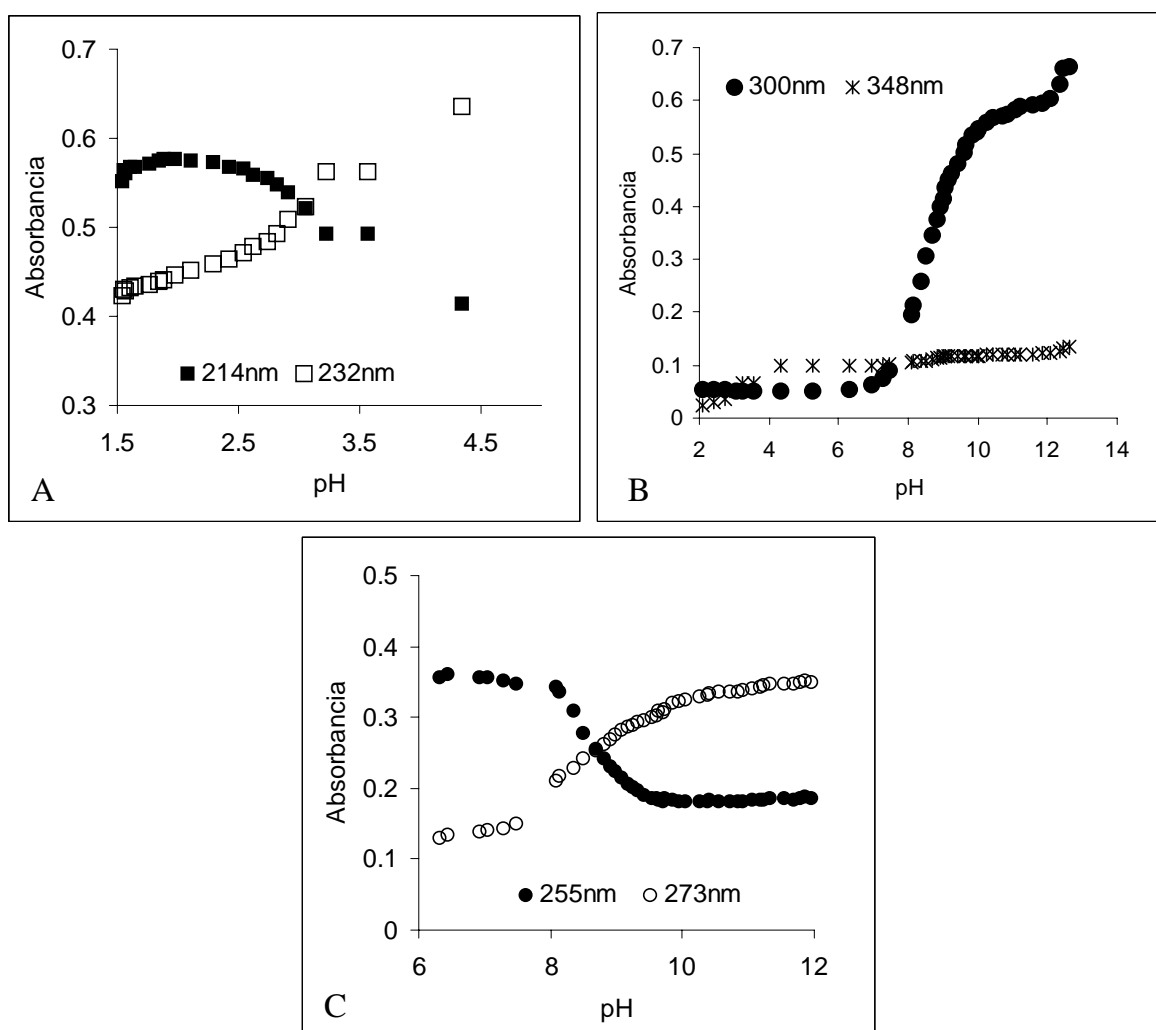


Figura 10.7. Curvas de absorbancia-pH de Azometina-H  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , obtenidas a partir de la Titulación ácido base.

A partir de los puntos isobéuticos y el intervalo de pH, es posible estimar las especies de Azometina-H protonadas, la especie de  $AzH_3^+$  muestra una banda en  $\lambda_{m\acute{a}x.} = 214$  nm, mientras que la especie  $AZ^-$  presenta una banda en  $\lambda_{m\acute{a}x.} = 255$  nm. La zona de predominio para  $AzH_3^+$  es en un intervalo de pH 1.5 a 3.2 (figura 10.7A), la especie de  $AzH_2$  predomina en  $pH > 3.2$  a 7.4 (figura 10.7B), mientras que la especie de  $AzH^-$  predomina  $pH > 7.4$  (figura 10.7C), y hasta pH 8.6 (figura 10.7D).

Aún cuando es posible sugerir el intervalo de pH donde se presentan las diferentes especies ácido base de la molécula, la determinación de las constantes de acidez, resulta no viable por este método, pues no hay que olvidar que la especie formada no solo implica un cambio en el pH sino también una evolución en el tiempo.

### 10.3 Estudio de estabilidad de azometina-H en medio amortiguado

Los estudios realizados hasta el momento sobre la estabilidad de la Azometina-H muestran que ésta se ve influenciada por factores del medio ambiente como luz y oxígeno, de tal manera que en medio ácido la evolución de la Azometina-H se refleja con la formación de un hombro en 260 nm (figura 10.8)

Aún cuando se han controlado factores como luz y oxígeno, el comportamiento espectral de la Azometina-H evidencia que ésta, es estable solo en los primeros minutos; en pH ácido 12 min y 8 min para pH básico.

Sin embargo, un factor importante es el cambio en el pH, en los estudios realizados se ha observado que existen variaciones importantes, sobre todo en medio básico donde el pH llega a variar hasta 0.6 unidades, por lo que este factor podría también influir sobre la estabilidad de la Azometina-H.

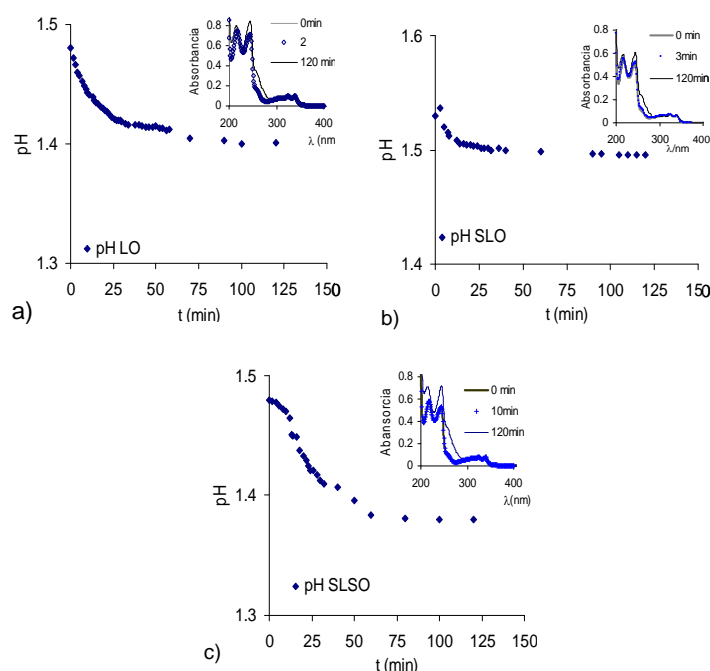
El análisis de la variación del pH en función del tiempo para la Azometina-H en medio ácido, muestra cambios de  $\Delta pH = 0.1$  unidad (figura 10.8), generalmente el pH disminuye a medida que transcurre el tiempo.



Para el sistema donde se tienen condiciones de medio ambiente, es decir con la presencia de luz y oxígeno en el sistema, el pH presenta una disminución con el tiempo desde los primeros minutos y llega a mantenerse casi constante durante 10 minutos en el minuto 34 (figura 10.2.1a), el comportamiento espectral de la Azometina-H sigue este patrón, pues se mantiene sin variaciones en los primeros 2 minutos (figura 10.8aII).

En el sistema donde se ha eliminado el efecto de la luz el pH disminuye desde el inicio y se estabiliza a partir del minuto 32, la variación  $\Delta\text{pH} = 0.04$  (figura 10.8b). El cambio espectral de la molécula también se ve reflejado desde los primeros minutos, ya que después del minuto 3 la Azometina-H presenta cambios importantes sobre la región de 200 a 300 nm (figura 10.8bII).

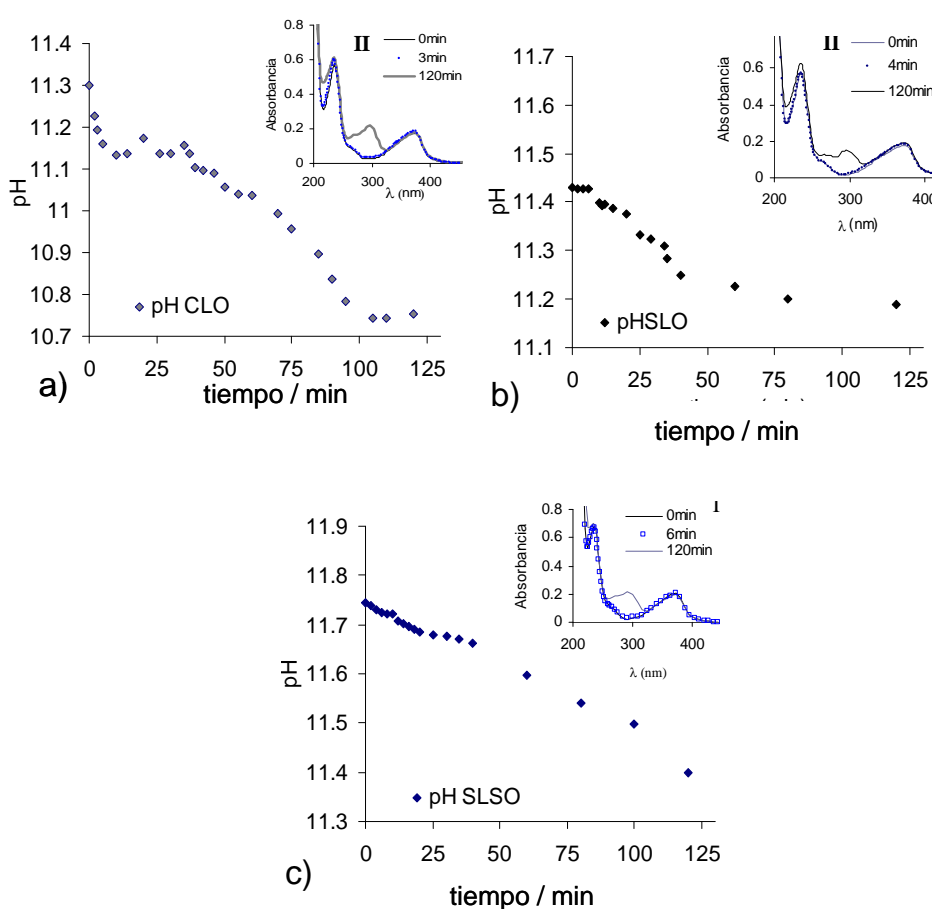
Si se elimina el efecto de la luz y del oxígeno, el pH es estable en los primeros 10 minutos y después inicia la disminución de este. Los cambios en el pH concuerdan con los cambios espectrales ya que en los primeros minutos la Azometina-H tiene el mismo comportamiento espectral (figura 10.8c inserto).



**Figura 10.8.** Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en a) HCl con luz y con oxígeno, b) HCl sin luz y con oxígeno, c) HCl sin luz y sin oxígeno

Con base a lo anterior es posible asociar los cambios en el pH con la formación de las nuevas especies de la Azometina-H, ya que una variación en el pH implica un cambio espectral y por tanto un cambio en la especie química de Azometina-H.

Analizando el comportamiento del pH en función del tiempo (figura 10.9) para los diferentes sistemas se observa que en medio básico el pH disminuye a medida que transcurre el tiempo, de tal manera que para el sistema con luz y oxígeno la variación es de 0.6 (figura 10.9a).



**Figura 10.9** Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en a) Ano con luz y con oxígeno; aII) Espectros de absorción a  $t=0$ ,  $t=3$  y  $t=120$  min, b) NaOH sin luz y con oxígeno; bII) Espectros de absorción a  $t=0$ ,  $t=4$  y  $t=120$  min, c) NaOH sin luz y sin oxígeno cII) Espectros de absorción a  $t=0$ ,  $t=6$  y  $t=120$  min

En el sistema donde se cubrió de la luz, el pH presenta una disminución en función del tiempo y después de 40 min este se estabiliza. Aún cuando la fluctuación es no mayor a

la unidad, estos cambios podrían influir en la formación de otra especie asociada con la evolución de la banda ubicada en 296 nm (figura 10.9bII).

Para el sistema donde se ha eliminado los efectos de la luz y del oxígeno figura 10.9, se presenta el mismo comportamiento en cuanto al pH, es decir presenta una disminución a medida que transcurre el tiempo, sin embargo el pH es más estable en los primeros 8 min, donde la variación es de 0.02 unidades así que permanece prácticamente constante. Por lo que ahora se puede asociar el cambio en el pH con la evolución de la molécula figura (10.9cII), pues en los primeros 8 minutos se mostró que la Azometina-H no presenta cambios espectrales.

A partir de los resultados anteriores se puede proponer que la evolución de las especies de la Azometina-H tienen un efecto muy grande en el cambio de pH de la solución con respecto al tiempo, este comportamiento podría llevar a la hipótesis de que si controlamos el pH de la solución es posible controlar la evolución de las especies de Azometina H.

### **10.3.1 Estudio de estabilidad de la Azometina-H a pH ácido en medio de amortiguado.**

En la figura 10.10, se muestra el comportamiento de la Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en función del tiempo, en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M a pH 1.5. en el gráfico de pH contra tiempo es posible observar la variaciones del pH, el cual sufre una disminución a partir del minuto 12, después del minuto 25 se mantiene constante, este comportamiento concuerda con los cambios espectrales donde los primeros 12 minutos la Azometina-H permanece sin cambios.

La figura 10.10II muestra los espectros de absorción de la Azometina-H, donde los primeros cambios se dan después de 12 min, estos se observan en 217, 244 y 260 nm, el valor de absorbancia en estas longitudes de onda aumenta conforme transcurre el tiempo.

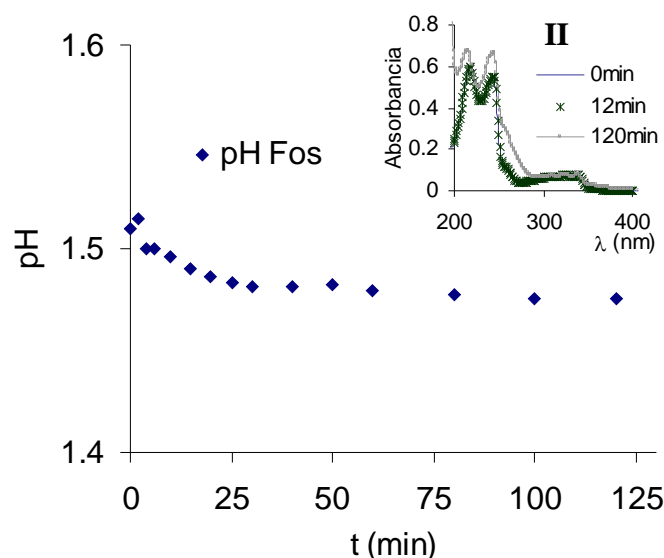


Figura 10.10). Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en fosfatos 0.01 M con luz y con oxígeno; II) Espectros de absorción a  $t=0$ ,  $t=12$  y  $t=120$  min.

Por otra parte, la zona entre 290 y 350 nm permanece prácticamente sin cambios.

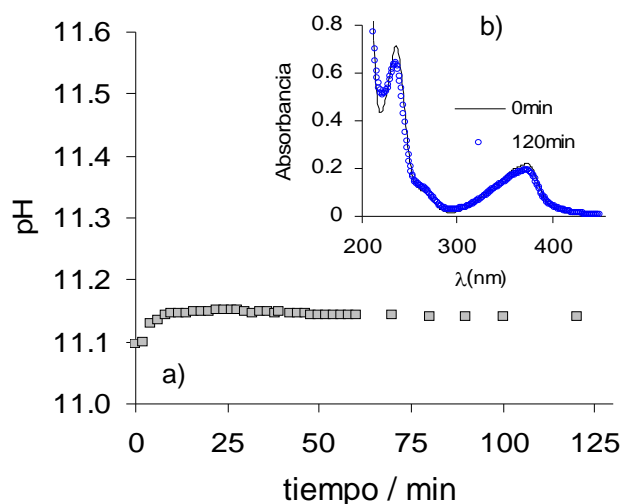
La banda en 260 nm, permanece constante durante los primeros minutos, después de transcurridas dos horas esta banda evoluciona hasta alcanzar  $\Delta A^{260} = 0.16$ .

### 10.3.2 Estudio de estabilidad de la Azometina-H a pH básico en medio amortiguado.

La figura 10.11, muestra el comportamiento de la Azometina-H de concentración  $1 \times 10^{-5}$  M, en medio amortiguado básico, el pH de la solución fue de 11.5 al inicio, este fue ajustado con solución amortiguadora fosfatos 0.01 M.

El espectro de absorción de Azometina-H (figura 10.11b) muestra al inicio dos bandas de absorción una en 235 nm y otra en 370 nm, ambas bandas permanecen a la misma longitud de onda durante dos horas, sin embargo se presentan cambios en el valor de su absorbancia de  $\Delta A^{235} = 0.07$  y  $\Delta A^{370} = 0.03$ , respectivamente.

El cambio en el pH durante toda la experimentación fue de 0.05 unidades, el pH después de 25 m en permaneció prácticamente constante (figura 10.11a).



**Figura 10.11. a) Gráfico de pH contra tiempo de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en a) medio amortiguado fosfatos 0.01M sin luz y sin oxígeno; b) Espectros de absorción al  $t=0$  y  $t=120$  min**

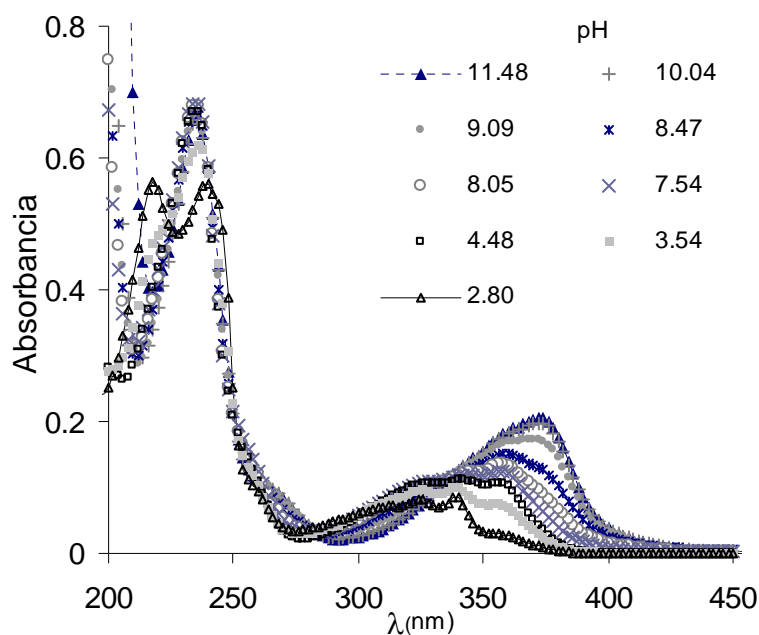
Es claro que en estas condiciones la especie de Azometina-H permanece sin cambios (figura 10.11), si se compara con el sistema sin amortiguamiento (figura 10.5b), donde aún cuando se han eliminados luz y oxígeno se tiene la formación de la banda en 292nm, así la evolución de la Azometina-H parece detenerse en la solución amortiguada..

Con base a los resultados mostrados se realiza una valoración para la determinación de las constantes de acidez de la Azometina-H, controlando los factores que afectan la estabilidad de la molécula como son luz y oxígeno, además el sistema se trabajara en una solución amortiguada.

### 10.3.3 Titulación de Azometina-H en medio amortiguado.

En muchos trabajos para la determinación de constantes de acidez se realizan titulación ácido base para analizar el comportamiento de las moléculas, en este caso se hace la valoración a partir de azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M Para cada cambio en el pH se tomó el espectro de absorción.

La familia de espectros de absorción tomados a partir de la titulación ácido base se muestra en la figura 10.12.



**Figura 10.12. Comportamiento espectral a diferentes pH de la Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M, obtenidos mediante valoración.**

En el espectro de absorción se presenta a pH ácido una banda entre  $\lambda = 215-250$  nm, esta banda presenta dos máximos uno en 240 nm y otro en 218 nm, el espectro también presenta una banda en  $\lambda = 280-350$  nm, en pH básico la Azometina-H presenta 2 bandas la primera ubicada en  $\lambda_{\text{máx.}} = 236$  nm y la segunda en  $\lambda_{\text{máx.}} = 372$  nm.

El comportamiento espectrofotométrico de la Azometina-H. es el mismo en el intervalo de pH de 2.5 a 3.1. Al llegar a pH 3.2 se observa un cambio en el comportamiento de la banda de 218 nm, ésta disminuye bruscamente en absorbancia e inicia el aumento de la banda 240 nm, ahora ubicada en 234 nm. Al llegar a pH 4.2 se presenta otro cambio en el comportamiento espectrofotométrico de Azometina-H donde la banda en 219 nm ha desaparecido por completo, para dar paso solo a la formación de la banda en 234 nm, la cual permanece durante todo el intervalo de pH entre 4.2 y 11.7.

Por otra parte la banda alrededor de 350 nm sufre un efecto batocrómico e hipercrómico a medida que el pH aumenta, siendo mas evidente en pH 8, desplazándose de 350 nm a 372 nm

### 10.3.4 Cálculo de Constantes de Acidez de Azometina-H en medio de amortiguado.

El cálculo de las constantes de Azometina-H se realizó mediante el programa computacional SQUAD [10.12], este programa se alimentó con los espectros de absorción con sus respectivos valores de pH obtenidos de la titulación ácido base, y la concentración de trabajo del analito, además de un modelo químico.

Los valores para las constantes de equilibrio encontradas para Azometina-H se encuentran en la Tabla 10.1.

**Tabla 10.1. Valores de  $\log \beta$  de Azometina-H obtenidas de la valoración espectrofotométrica**

Especie	$\log \beta$
Haz	8.429±0.012
H <sub>2</sub> Az	15.370±0.016
H <sub>3</sub> Az	18.626±0.017

\*Se alimentaron 24 espectros de absorción cada uno con 50 longitudes de onda al programa computacional SQUAD, la desviación estándar fue de  $\sigma=3.52 \times 10^{-2}$ ,  $U=6.68 \times 10^{-5}$

Los valores de pKa obtenidos concuerdan con la hipótesis establecida ya que la existencia de 3 pKa concuerda con la estructura de la molécula.

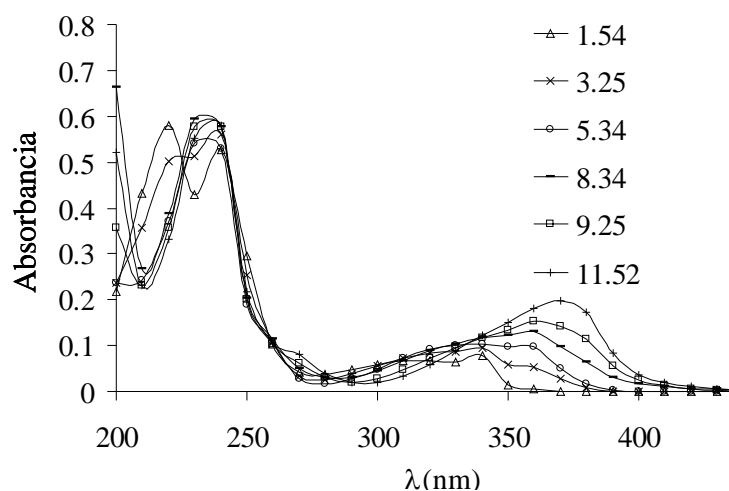
Por lo tanto los valores de pK's calculados podrían ser asociados solo a tres equilibrios ácido base el primero corresponde al grupo más ácido NH (3.26) los valores de 6.95 y 8.43 corresponden a la desprotonación que proviene de los grupos OH.

Esta asignación concuerda con los datos obtenidos mediante el programa ACD/pKas, ya que para el grupo OH del fenol se encontró un valor de 8.64, semejante al calculado mediante SQUAD.

## 10.4 Análisis punto por punto

Para estar asegurado que estas constantes de acidez, sean debidas sólo a cambios en el pH, es decir especies ácido base y evitar la presencia de cualquier otra especie formada por factores como luz, oxígeno, se realiza ahora un análisis punto por punto, donde se asegura que la especie de Azometina-H, no estará afectada por su evolución en el tiempo, ya que esta metodología permite analizar cada especie en tan solo dos minutos. Con esta metodología es posible asegurar que las constantes de acidez de la Azometina-H pertenecen a especies ácido-base.

Los espectros obtenidos mediante la metodología punto por punto se presentan a continuación en la figura 10.13.

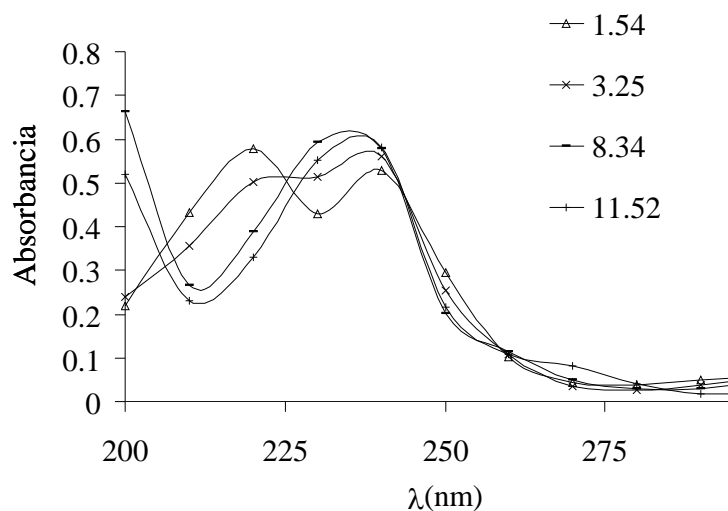


**Figura 10.13** Espectros de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M a diferentes pH (puntual) en solución amortiguadora de fosfatos.

En el espectro de absorción se presenta a pH ácido una banda entre  $\lambda = 215-250$  nm, esta banda presenta dos máximos uno en 245 nm y otro en 219 nm, el espectro también presenta una banda en  $\lambda = 280-350$  nm, para pH básico la Azometina-H presenta 2 bandas la primera ubicada en  $\lambda_{\text{máx}} = 236$  nm y la segunda en  $\lambda_{\text{máx}} = 341$  nm.

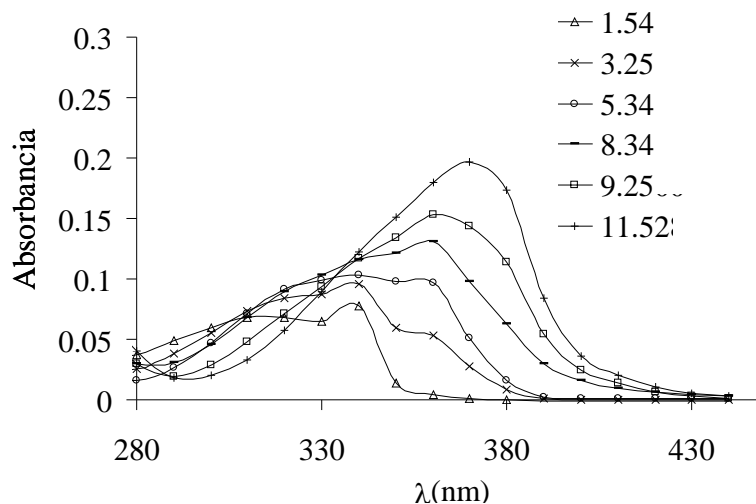


El comportamiento espectrofotométrico de la Azometina-H figura 10.14. es el mismo en el intervalo de pH de 1.5 a 2.9. Al llegar a pH 3.2 se observa un cambio en el comportamiento de la banda de 219 nm, esta disminuye bruscamente en absorbancia e inicia el aumento de la banda 245 nm, ahora ubicada en 238nm. Al llegar a pH 4.2 se presenta otro cambio en el comportamiento espectrofotométrico de Azometina-H donde la banda en 219 nm ha desaparecido por completo, para dar paso solo a la formación de la banda en 237 nm, la cual permanece durante todo el intervalo de pH entre 4.2 y 11.7.



**Figura 10.14** Espectros de absorción de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M en medio de fosfatos. En la región de 200 a 300nm obtenidos por la metodología punto por punto.

Por otra parte el espectro de azometina-H presenta una banda entre 300 y 450nm, la cual presenta dos máximos uno en 328nm y otro en 341nm, figura 10.15, la banda presenta una evolución marcada a pH 4.2. Esta banda sufre un desplazamiento hacia longitudes más altas, ubicándose en 376nm cuando se tiene pH de 11.7.



**Figura 10.15.** Espectros de Azometina-H  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  para valores de pH entre 1 y hasta 11.5 en el intervalo de longitudes de onda de 275 a 425 nm.

Como se observa en el espectro de Azometina-H en el intervalo de pH entre 1 y 11 podemos observar 4 posibles puntos isobéuticos ubicados en  $\lambda = 225$ ,  $\lambda = 262$ ,  $\lambda = 288$  y  $\lambda = 334$  nm.

#### 10.4.1. Cálculo de Constantes de Acidez de Azometina-H

El cálculo de las constantes de Azometina-H se realizó mediante el programa computacional SQUAD, este programa se alimentó con los espectros de absorción con sus respectivos valores de pH obtenidos del análisis puntual, y la concentración de trabajo del analito, además de un modelo químico.

Los valores para las constantes de equilibrio encontradas para Azometina-H se encuentran en la tabla 10.2.

**Tabla 10.2. Valores de pKa's de Azometina-H obtenidos del análisis puntual**

<b>Especie</b>	<b>Valor pKa</b>
<b>H<sub>3</sub>AZ</b>	<b>3.393 ± 0.106</b>
<b>H<sub>2</sub>AZ</b>	<b>7.364 ± 0.104</b>
<b>H<sub>1</sub>AZ</b>	<b>8.733 ± 0.054</b>

\*Se alimentaron 24 espectros de absorción cada uno con 48 longitudes de onda al programa computacional SQUAD, la desviación estándar fue de  $\sigma = 8.25 \times 10^{-3}$ ,  $U = 4.85 \times 10^{-6}$

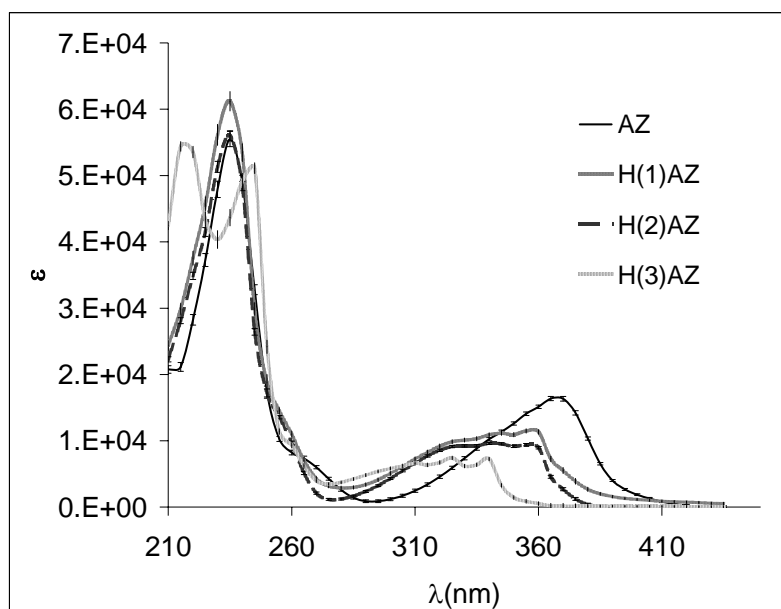
Los valores de pKa obtenidos concuerdan con la estructura de la molécula, donde pueden existir tres posibles pKa's, asociados a la desprotonación de los grupos OH, y al grupo NH presentes en la molécula.

Los valores de pK's calculados se asocian a tres equilibrios ácido base el primero corresponde al grupo más ácido NH (3.388) para los siguientes valores (7.364 y 8.733) la desprotonación proviene de los grupos OH.

Esta asignación concuerda con los datos obtenidos mediante el programa ACD/pKas, ya que para el grupo OH del fenol se encontró un valor de 8.64, semejante al calculado mediante SQUAD.

Por otra parte los estudios realizados para este tipo de moléculas muestran que para compuestos similares se tiene un valor de pKa de 3 a 4 para el grupo azometino y el segundo pKa lo reportan en 8 para los grupos OH (Raafat SPT ACTA A 59 2003 723-728), por lo que los valores y la asignación de los pKa encontrados concuerda con lo reportado por otros autores y con el programa ACD/pKas.

El programa computacional SQUAD además de calcular las constantes de acidez de la Azometina-H, también calcula los coeficientes de absorptividad para cada especie. El gráfico de coeficientes molares se presenta en la figura 10.16.



**Figura 10.16. .Coeficientes molares de Azometina-H, obtenido a partir del refinamiento de constantes por el programa SQUAD.**

En el gráfico de los coeficientes de absorptividad se puede observar que estos presentan el comportamiento de las especies tanto ácida como básica de Azometina-H. Éste es comparable con el obtenido experimentalmente. Los marcadores que se observan en la figura 10.16 representan el valor de la desviación estándar para cada coeficiente de absorptividad.

A partir de los coeficientes obtenidos mediante el cálculo de pKa's de Azometina-H, es posible calcular las fracciones molares de cada especie, en la figura 10.17 se presenta el gráfico de fracciones molares para las diferentes especies de Azometina-H.

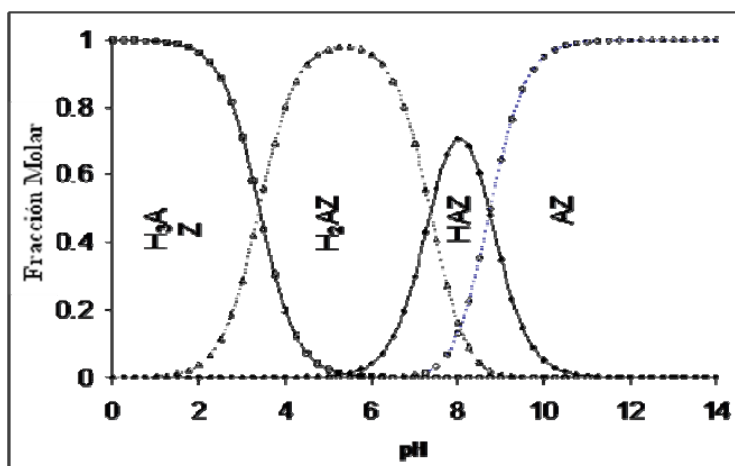


Figura 10.17. Diagrama de fracciones molares de Azometina-H, obtenido a partir de los coeficientes de absorptividad molar obtenido del refinamiento de constantes por el programa SQUAD.

Una vez refinadas las constantes de acidez de Azometina-H y con los coeficientes de absorptividad obtenidos, se realizó la simulación de los espectros de absorción de Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M comparables con los experimentales. La figura 10.17, muestra los espectros simulados que para efectos prácticos se realizó solo la simulación para los mas representativos.

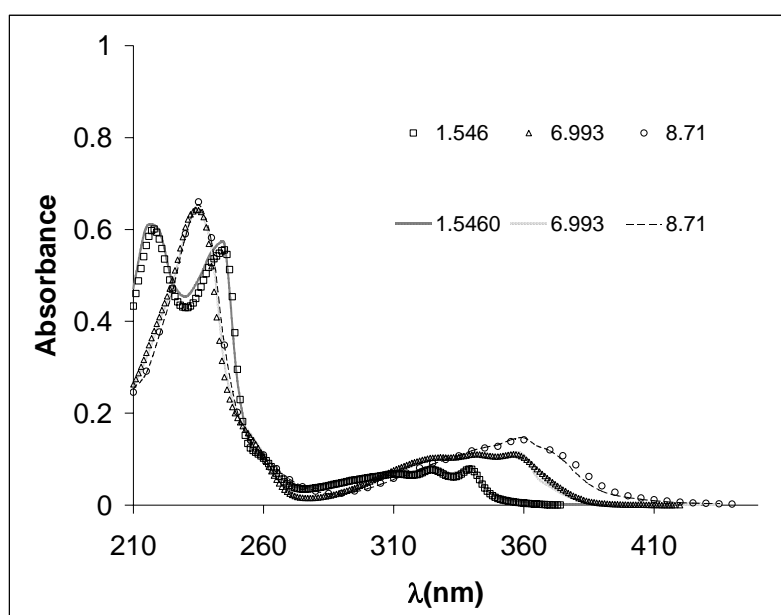


Figura 10.17.-Espectros de absorción Azometina-H  $1 \times 10^{-5}$  M simulados a partir de los datos Teórico (marcador) y comparados con los-Experimental (línea).

Como se puede observar en la figura los espectros simulados concuerdan con los obtenidos experimentalmente, este resultado es una base para proponer las constantes de acidez obtenidas para Azometina-H, como propias de esta molécula.

### **10.5 Conclusiones.**

La estabilidad de la Azometina-H se ve afectada por factores del medio ambiente como luz y oxígeno, y a pH básico la evidencia de la evolución de la molécula es la formación de una nueva banda.

De acuerdo al comportamiento espectral la Azometina-H es estable solo en los primeros minutos; en pH ácido 12 min y 8 min para pH básico.

Si bien es cierto, que la formación de la banda en 296 nm es por un proceso que ocurre en el tiempo, también lo es que, esta banda se produce por un cambio en el pH, donde las especies formadas interactúan, así lo refleja la Azometina-H cuando se realiza la valoración ácido base.

Por otra parte la formación de las especies de Azometina-H a los diferentes pH proviene de la desprotonación de ésta, los puntos isobéuticos presentes en comportamiento espectral son una evidencia mas de las especies ácido base que se encuentran en el sistema, sin embargo en el caso de existir un equilibrio tautomérico no podemos aún elucidar a que especies tautomérica pertenece.

El tiempo de análisis, el tiempo de exposición a la luz, la intensidad de la luz, el oxígeno del medio ambiente y el pH sobre todo en medio básico, afectan directamente a la molécula, por lo cual en las determinaciones de micro nutrientes es importante considerar estos factores, pues de no ser así la determinación estaría ligada a posibles errores.

Mediante el estudio cinético en medio amortiguado a pH ácido de la Azometina-H se encontró una evolución del hombro ubicado en  $\lambda = 260$  nm. mientras que a pH básico se presenta la evolución de una banda en  $\lambda = 292$  nm, por las razones anteriores se puede concluir que la Azometina-H no es estable para tiempos mayores a 10 min., aún eliminando los efectos por la luz y oxígeno, aun cuando la solución en medio amortiguado limita la evolución de la Azometina-H, esta incrementa su estabilidad.

La determinación de las constantes mediante una titulación ácido base y refinadas mediante SQUAD, son valores congruentes, con la estructura de la molécula.

Por lo que es posible asociar 3 equilibrios ácido base a la Azometina-H.

Sin embargo, y de acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que el comportamiento de la Azometina-H presenta histéresis, aún cuando es posible determinar las constantes de acidez, no se tiene la seguridad de que estas correspondan sólo a especies ácido base de Azometina-H, por lo que no es viable realizar un titulación ácido base, para la determinación de constantes de acidez de esta molécula.

Por esta razón se realizó la determinación de constantes de acidez de Azometina-H mediante análisis puntual.

Análisis que permite lograr que el cambio en el comportamiento de Azometina-H sea sólo por el efecto del pH y no debido a otros factores.

Los valores de pKa de la Azometina-H concuerdan con los reportados para este tipo de moléculas.

Las tres constantes de acidez calculadas para equilibrios ácido base asociados a la los grupos NH y OH de la estructura de la molécula.

Los valores obtenidos de las constantes, así como los coeficientes de absorptividad obtenidos por el programa SQUAD permiten obtener una buena simulación de los espectros experimentales, la estadística de estos valores muestra que las constantes de acidez son confiables, y que los datos teóricos representan de manera eficaz el comportamiento experimental.



## Capítulo 11.

### Uso de MWCNT para el estudio de Azometina-H por Voltamperometría Cíclica.

#### 11.1.Introducción.

El uso de colorantes para la identificación cualitativa o cuantitativa de estructuras morfológicas (histológicas) es de gran importancia en bioquímica, biología y medicina. Estos métodos están basados en la aplicación de colorantes sobre tejidos, microorganismos, entre otros, como una herramienta analítica para la identificación de estructuras y reacciones químicas en ellos [11.1].

Además la gran mayoría de los estudios están basados en métodos espectroscópicos como: UV-Vis, absorción atómica, emisión atómica, rayos X y fluorescencia, es importante resaltar que los métodos espectroscópicos poseen algunas desventajas iniciando por el costo, no pueden resolver el problema con los interferentes, y además poseen baja sensibilidad y precisión, por lo que se requiere una nueva técnica que mejore estas propiedades, Los métodos electroquímicos [11.2], se perfilan para cubrir estas necesidades, pues poseen alta sensibilidad y selectividad, además las mediciones pueden ser hechas de manera directa, por las ventajas que ofrecen los electrodos ya que pueden ser hechos convenientemente para determinaciones in situ.

En la búsqueda de aumentar las propiedades electroquímicas, los electrodos han sido modificados con películas de polímeros conductores nafion [11.3,11.4] o polianilinas [11.9]. A partir de 1991 cuando Ijiima reportó la existencia de los nanotubos de carbón (CNT), los electrodos han sido modificados con este material y es que los CNT poseen particulares características físicas, químicas y electroquímicas [11.5-11.6]. Además tienen la habilidad de ser mediadores en reacciones de transferencia de electrones con la especie electroactiva en solución cuando son usados como electrodos [11.7]. Con este hallazgo el gran uso y aplicación de los nanotubos ha logrado que la mayoría de las investigaciones estén enfocadas a mejorar y modificar los electrodos con el empleo de este material.

Por todas estas razones, en este trabajo se propone caracterizar la Azometina-H (Az) por voltamperometría cíclica, con el uso de un electrodo de pasta de carbón modificando con de MWCNT (nanotubos de carbón de multipared).

## **11.2. Experimental**

### **11.2.1 Reactivos y Equipo**

Todos los reactivos fueron de grado analítico, La Azometina-H y  $\beta$ -Ciclodextrina (CD) usadas fueron de marca Sigma y Acetato de amonio fue usado de Baker. Los nanotubos de carbón de multipared (MWCNT) (0.5-200nm), fueron de Aldrich (Stenheim, Germany) con 95% de pureza.

Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultra pura obtenida de Millipore-MilliQ con resistividad de 18.0 Mohm cm, las soluciones fueron burbujeadas con nitrógeno.

El estudio electroquímico se llevó a cabo con una celda convencional de tres electrodos, usando un electrodo de platino y Ag/AgCl como contra electrodo y referencia, respectivamente. El electrodo de trabajo fue de pasta de carbón o electrodo de pasta de carbón modificado con MWCNT-CD. Todas las medidas electroquímicas fueron hechas en atmósfera de nitrógeno a temperatura de 25 °C.

La voltamperometría cíclica fue hecha usando un Electrochemical Analyzer Autolab 20, conectado a una computadora personal.

### **11.2.3. Preparación de la película CD-MWNT**

La modificación del electrodo se llevo a cabo de la misma manera que en el capítulo 8.

1mg de MWCNT, fue disperso por ultrasonido en un mililitro de  $\beta$ -CD  $1 \times 10^{-2}$ M, la solución de MWCNT y  $\beta$ -CD fue colocada por goteo sobre el electrodo de pasta de carbón.

### 11.3. Resultados y discusión

#### 11.3.1 Perfil de la membrana de MWCNT-CD en acetato de amonio (pH 7).

La figura 11.1 muestra el perfil de la membrana de los MWCNT/CD, es posible observar que la presencia de los MWCNT aumenta la corriente capacitiva, lo que corrobora la presencia de los nanotubos en la superficie del electrodo. El voltamperograma obtenido muestra que en la ventana de potencial de 0 a 1000 mV no se presentan procesos de oxidación.

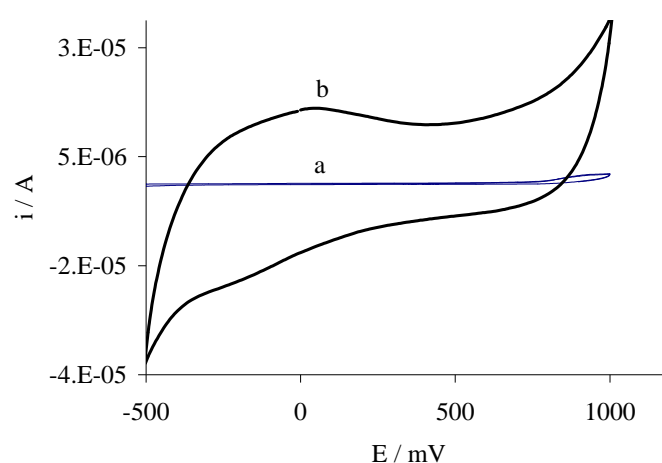
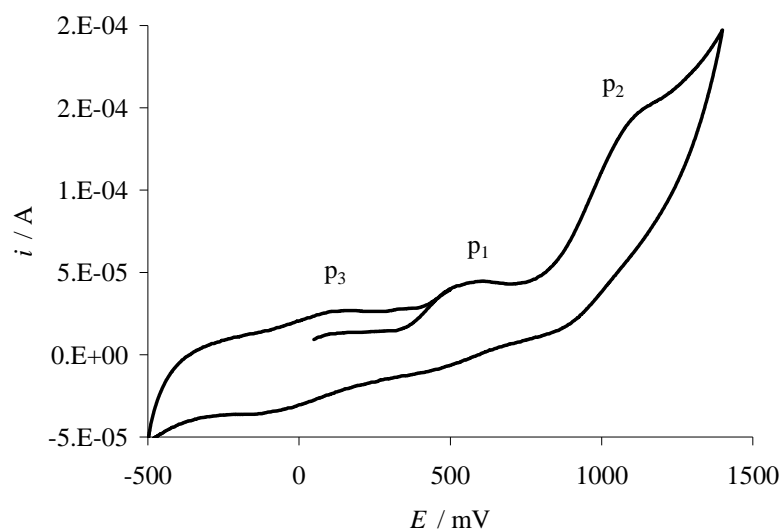


Figura 11.1 a) Blanco electrodo de pasta sin modificar, b) Perfil de la membrana de MWCNT /CD en acetato de amonio pH = 7.0 a la velocidad de barrido de 100mV/s

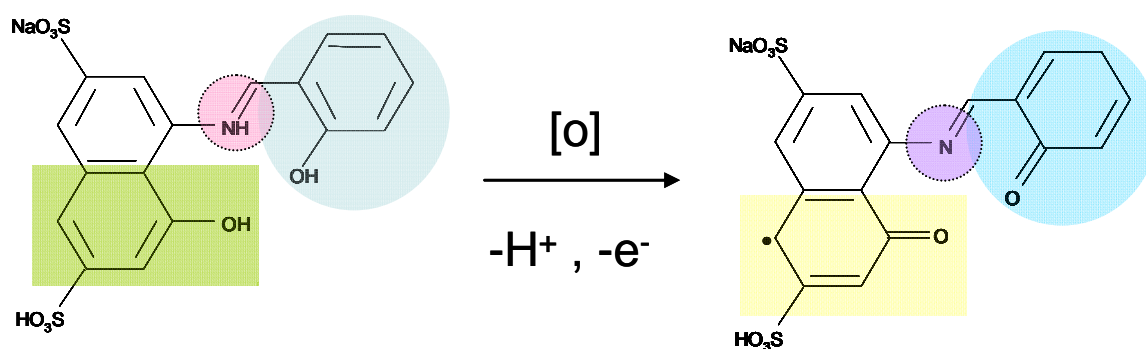
#### 11.3.2 Comportamiento Voltamperométrico: Azometina-H

La figura 11.2 muestra el voltamperograma de la Azometina 1mM, en acetato de amonio 0.01M, pH = 7.4 a la velocidad de barrido de 100mV/s, con electrodo de pasta de carbón modificado con MWCNT. La Azometina muestra un comportamiento irreversible, y presenta dos procesos de oxidación: ubicados en  $p_1 = 553\text{mV}$  y  $p_2 = 1096\text{mV}$ , cuando el barrido se hace hacia el sentido positivo, mientras que cuando el potencial se invierte se observa otro proceso de oxidación ( $p_3$ ) en 145mV, este proceso es asociado a la oxidación de las especies reducidas.



**Figura 11.2 Voltamperograma cíclico de 1mM de Azometina-H en acetato de amonio, pH = 7.0 a la velocidad de barrido de 100mV/s.**

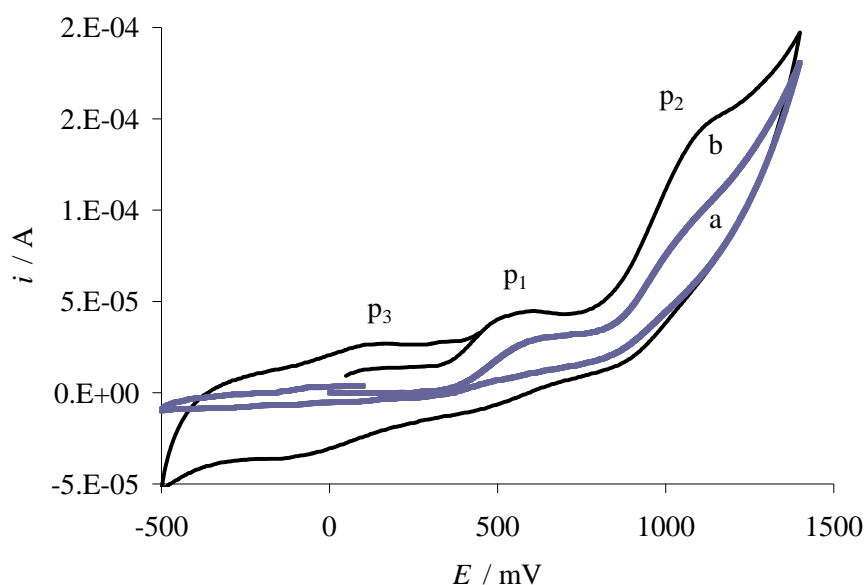
Los procesos de oxidación (p1 y p2) pueden ser asociados a los grupos azometino (rosa) e hidroxilo (verde), Se ha reportado [14] que moléculas con estructuras de fenoles son mas estables como fenoxidos, por lo que se propone que la azometina se oxida de la siguiente manera:



11.3.3 Comparación de la respuesta electroquímica de Azometina-H con el electrodo de pasta sin modificar y modificado con MWCNT-CD.

El voltamperograma cíclico de 1mM Azometina-H en 0.01M de acetato de amonio, pH = 7.0 a la velocidad de barrido de 100mVs<sup>-1</sup>. obtenidos con electrodo de pasta sin modificar (figura 11.3a) mostró 2 procesos de oxidación de la azometina-H, coincidentes con la respuesta obtenida con electrodo modificado, sin embargo el *p*<sub>1</sub> se ubica 50mV desplazado hacia

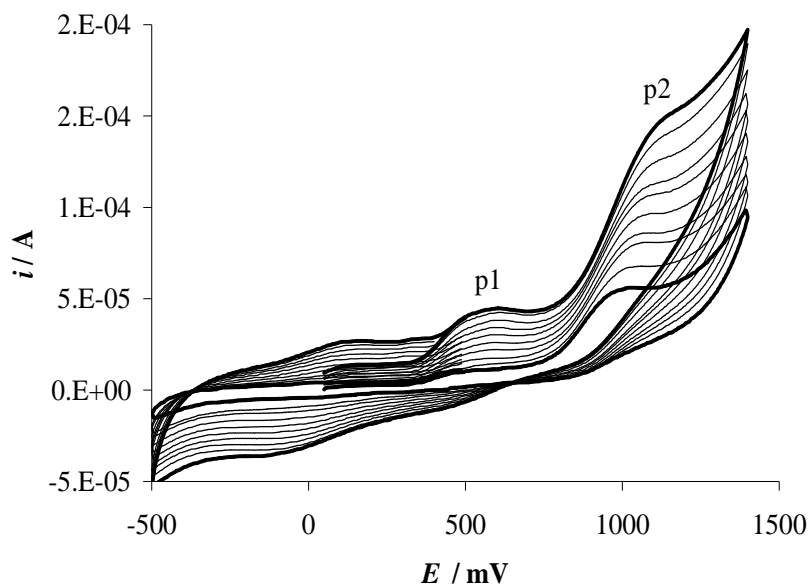
potenciales más positivos, mientras que el  $p_2$  se presenta a 30mV hacia potenciales más negativos con respecto a la respuesta con el electrodo modificado (figura 11.3b).



**Figura 3** Voltamperograma cíclico de 1mM de Azometina-H, en acetato de amonio, pH = 7.0 a la velocidad de barrido de 100mV/s. a) electrodo sin modificar y b) electrodo modificado con MWCNT-CD .

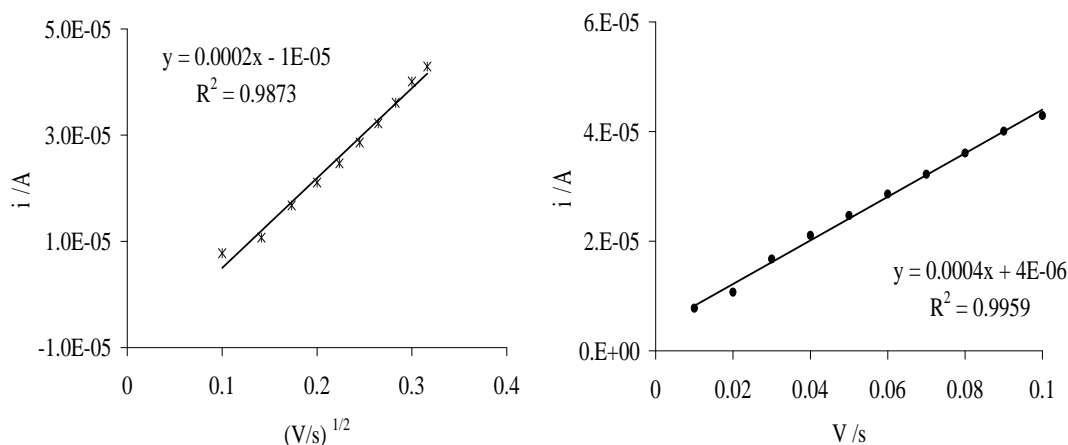
Por otra parte la corriente de pico con el electrodo modificado se ve favorecida en un 27%. Con el fin de caracterizar el comportamiento de la azometina-H se hizo el estudio de velocidad de barrido, con el cual es posible saber si el proceso de transferencia de carga esta controlado por difusión, o si el proceso es de adsorción.

La figura 11.4 muestra los voltamperogramas de 1mM Azometina-H en 0.01M de acetato de amonio, pH = 7.0 en función de la velocidad barrido, donde se observa que la velocidad influye sobre el potencial de los picos de oxidación ( $p_1$  y  $p_2$ ), ya que ambos picos se desplazan hacia potenciales mas positivos a medida que aumenta la velocidad, el desplazamiento del potencial del  $p_1$  es de 100mV cuando la velocidad se incrementa una década, por otra parte la señal es proporcional al cambio en la velocidad.



**Figura 11.4.** Voltamperogramas cíclicos de 1mM azometina-H, en acetato de amonio a pH= 7, a diferentes velocidades de barrido: 0.01,0.02,0.03, 0.04, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 y 0.1V. Electrodo de trabajo: pasta de carbón modificado con MWCNT-CD.

Para conocer como es el proceso electroquímico de la Azometina-H se obtuvo el gráfico de corriente contra la raíz cuadrada de la velocidad, el ajuste con este criterio no es lineal por lo que se descarta que el proceso este controlado por difusión (figura 11.5a) mientras que el gráfico de la corriente de pico contra la velocidad dio un buen ajuste lineal, por lo que puede ser asociado con un proceso de adsorción (figura 11.5b).



**Figura 11.5.** a) Gráfico de la corriente de p1 en función de la raíz de la velocidad b) gráfico de la corriente p1 en función de la velocidad: electrodo de trabajo: pasta de carbón modificado con MWCNT  $\beta$ -CD.

Los cambios en el potencial y la absorción de la especie sobre la superficie del electrodo cuando se tiene la presencia de MWCNT/CD se debe a la formación de complejo con  $\beta$ -CD de la especie de Azometina  $H_2Az$  la cual tiene una constante de formación de  $9.0077 \pm 0.0834$ .

(Estos resultados están basados en un estudio realizado por espectroscopía UV-Vis, donde se formó el complejo Az-CD y a través del programa computacional SQUAD se refinó la constante de complejación).

#### **11.4. Conclusiones**

El uso del electrodo modificado ayuda a acelerar el proceso de transferencia de electrones, ya que el pico de oxidación de la Azometina-H se presenta a potenciales más negativos, éste además aumenta la corriente de los procesos de oxidación.

Por otra parte con el estudio de velocidad se encontró que la Azometina-H tiene asociado un proceso de adsorción y que el transporte de masa no está controlado por difusión.

## CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ El estudio de estabilidad de la dopamina revelo que en condiciones donde se evita el contacto con la luz y el oxígeno, la molécula es estable durante 30min a pH = 3.0, durante 15min a pH = 9.3 y a pH = 12.3 tan solo durante 2 min.
- ✓ La determinación de los pka de DA se realizó de tal manera que se garantiza que los valores pertenecen únicamente a especies acido base.
- ✓ A partir de las constantes de Acidez calculadas en este trabajo fue posible elucidar el mecanismo de desprotonación mediante cálculos teóricos y experimentales.
- ✓ Los cálculos Teóricos mostraron que la geometría más estable de la DA corresponde al proximal.
- ✓ El ajuste entre datos experimentales y teóricos, muestra que el nivel de calculo es apropiado, y por tanto los datos son confiables, por lo que el mecanismo de desprotonación propuesto es viable y se relaciona con los pka de la siguiente manera.
- ✓ Los valores de pKa pueden ser asignados como:
  - ✓ pka1 = 9.05 para grupo amino
  - ✓ pka2 = 10.58 para grupo hidroxilo en la posición para



- ✓  $pK_{a3} = 12.07$  para grupo hidroxilo en la posición meta
  
- ✓ Se encontró que la DA puede formar complejos de inclusión con  $\beta$ -CD en una estequiometría 1:1 y su constante de complejación es de  $\log K_f = 3.77$
  
- ✓ Se encontró que la AA puede formar complejos de inclusión con  $\beta$ -CD en una estequiometría 1:1 y su constante de complejación es de  $\log K_f = 3.51$
  
- ✓ Los valores de complejación de DA y AA con  $\beta$ -CD señalan que la interacción es más débil con AA, por lo que en un sistema DA/AA/ $\beta$ -CD, el AA se oxida antes que la DA, por lo que el  $\beta$ -CD puede actuar como agente de reconocimiento.
  
- ✓ La caracterización electroquímica mostró que la DA presenta un proceso cuasi reversible y está controlado por difusión, mientras que el AA tiene asociado un proceso irreversible controlado por difusión.
  
- ✓ Se encontró que no es posible determinar DA en presencia de AA con electrodos convencionales por lo que se diseñaron electrodos modificados que lograron mejorar la respuesta electroquímica y la determinación analítica.
  
- ✓ La aplicación de sistemas supramoleculares resultó favorable para el desarrollo de métodos de análisis cuantitativo para DA ya que:

- ✓ La respuesta electroquímica de la dopamina mejora con el uso de los electrodos modificados con nanotubos de carbón y la polimerización  $\beta$ -CD, hace el proceso mas reversible además aumenta la transferencia de electrones.
- ✓ Con los electrodos modificado con MWCNT y  $\beta$  CD es posible detectar DA en presencia de AA, con limites de detección de por debajo de  $10\mu\text{M}$ .
- ✓ El uso de los electrodos modificados para la determinación cuantitativa de DA en fármacos resulto ser exitosa.
- ✓ La presencia de surfactante en solución mejoro las propiedades electroquímicas de la DA esto fue provechoso para plantear el método de análisis cuantitativo.
- ✓ La formación de las micelas del SDS favoreció la separación de las señales entre DA y AA y fue posible hacer la detección de DA
- ✓ Este método se probó para la detección de DA con fármacos los resultados fueron exitosos.

## PERSPECTIVAS.

- Introducción del sensor de DA (EPC/MWCNT/ $\beta$ CD y EPC/ $\beta$ CD) a sistema Chip on a lab.
- Detección de DA en fluidos biológicos
- Desarrollo de sensores tipo Thin film con tecnología screen printing
- Miniaturizar los sensores para aplicación en sistemas biológicos, como tejidos o células.
  - Diseño de microelectrodos empleando materiales como: fibras de carbón y oro.

Modificación de microelectrodos con materiales nanoestructurados (MWCNT y  $\beta$ -CD).

Construcción de un Sensor electroquímico para Boro basado en sistemas supramoleculares  $\beta$ -CD / Azometina-H

---

## BIBLIOGRAFÍA

### Capítulo 1. Introducción General

- [1.1] Sanuma M., Miyazaki I., Ogawa N., *Neurotoxicity Research* (2003) 5(3), 165.
- [1.2] Marciniak B., Dettlaff K., Sobierajska A., *Chemia Analityczna* (2003) 48(3), 577.
- [1.3] Fazakerley H., *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* (1960) 9, 130.
- [1.4] Zollinger H., *Color chemistry: synthesis, properties and application of organic dyes and pigments. english* (New York, USA: VCH). 2nd revised ed. 1991.
- [1.5] Contreras Ciclodextrinas Naturaleza, Propiedades y aplicaciones versión 1.0, 2001
- [1.6] Morffat R. Waterfast inks via Cyclodextrins Inclusion Complex, United States Patent 5, 1008, 505 (28, 1992),
- [1.7] Helbrecht B., United States Patent 5,302,195 (Apr.12,1994)
- [1.8] Cappuccio A.P., Rizopoulos United States Patent 5,567,747 (Oct 22, 1996),
- [1.9] Loftsson T., Jonsdottir B., Baldvinsdottir J., Fridriksdottir H., *Pharma Sciences* (1994) 4(5), 354.
- [1.10] Loftsson T., Brewster M., *Journal of pharmaceutical sciences*, (1996) 85(10), 1017-.
- [1.11] Alamelu S., Rao K., *Journal of Microencapsulation* (1990) 7(4), 541.
- [1.12] Uekama K., Kaneto H., Fumitoshi T., *Chemical Reviews* (Washington, D. C.) (1998) 98(5), 2045-.
- [1.13] Pelan B., Watts K., Campbell I., Lips A., *J. Dairy Sci.* (1997) 80, 2631.
- [1.14] Yoshitake T., Kehr J., Yoshitake S., Fujino K., Nohta H., Yamaguchi M., *J. Chromatogr. B.* (2004) 807(2), 177.
- [1.15] Heidbreder C., Lacroix L., Atkins A., Organ A., Murray S., West A., Shah A., *J. Neurosci. Meth.* 2001;112(2),135.
- [1.16]. Chi J., Odontiadis J., Franklin M., *J. Chromatogr. B* (1999) 731(2), 361.
- [1.17]. Parsons J., Kerr T., Weiss F., *J. Chromatogr. B* (1998) 709(1), 35.
- [1.18]. Li N., Duan J., Chen G., *Anal. Sci.* (2003) 19(12), 1587.
- [1.19] Carlsson A., Lindqvist M., Magnusson T., Waldeck B., *Science* (1958) 127, 471.
- [1.20] Cavalieri E., Li E., *Carcinogenesis* (2002) 23(6), 1071.
- [1.21] Cavalieri E., Rogan G., *Cell. Mol. Life Sci.* (2002) 9(4), 665.
- [1.22] Napolitano A., *Chem. Res. Toxicol.* (1999) 12, 1090

- [1.23] Barreto W.J, Barreto R. G., Ponzoni S., Y Kawano, Di Mauro E., Magosso H A., Silva W P., *Monatshefte, Chemie* (2005) 136, 701.
- [1.24] Slivka. J. *Biol. chem* (1985) 29, 154.
- [1.25] Haque E., Asanuma M., *Biochim. Biophys. Acta* (2003), 1619(1), 39.
- [1.26] Levin J., *Biol. Chem.* (1961) 236, 2043.
- [1.27] Palumbo, et. al . *Chem. Res. Toxicol.* (1999) 12, 1213.
- [1.28] Doménech A., Garcia H., Doménech-Carbó M. T., Galletero M. S., *Anal. Chem.* (2002) 74, 562.
- [1.29] Thorré K., Pravda M., Sarre S., Ebinger G., Michotte Y., *J.Chromatogr. B*, (1997) 694, 297.
- [1.30] Rothman R.B., Mele., *Pharmacol. Biochem. Be.*, (1991) 40,387
- [1.31] Miki K., *Clin. Chem.* (1998) 44, 1759.
- [1.32] Jian-Wei M., Bozidar O., *Anal. Chem.*, (2001) 73, 1196.
- [1.33] Zhang L, Lin X. *Anal. Bioanal. Chem.* (2005) 382(7), 1669-1677.
- [1.34] Gao Z, Chen B, Zi M. *Analyst.* (1994) 119(3), 459-464.
- [1.35] Levine M., *J. Med.*, (1986) 314, 892.
- [1.36] Davis S. H. R., Masten S. J., *Anal. Chim. Acta*, (1991) 248, 225.
- [1.3.7] Chen X., Sato M., *Anal. Sci.*, (1995) 11, 749.
- [1.38] Wu J., Suls J., Sansen W., *Electrochem. Commun.*, (2000) 2, 90.
- [1.39] Mankung M.J. Fletcher. T.L.,*J. Med. Chem.* (1970) 13, 329.
- [1.40] Pressman D., Siegel M.,. Hall L. A.R., *J.Am. Chem. Soc.*, (1954) 76, 6336.
- [1.41] Howard E. Smith, Fu-Ming Chedb.*Org. Chem.*, (1979) 44, 2775.
- [1.42] El-Dissouki H.A., Iss R. M., Moustafa, *Spectrochim Acta Part A*, (1989) 45,775.
- [1.43] Mahmoud M.R., Awad A.M., Shaker A.M.,*Spectrochim Acta Part A* , (1985) 41,1177.
- [1.44] Issa R. M., El-Daly S.A, El Wakiel N. A., *Spectrochim Acta Part A*, (2003) 5,4723.
- [1.45] El Taher M.A., Gabr AA.,. *Talanta*, (1996) 43,1511.
- [1.46] El Haty M.T., , Mohamed A.E.,.Adam F.A., Gbar A.A., *Spectrochim Acta Part A*, (1990) 46,1751.
- [1.47] Spencer R .R., Erdmann D E. *Environ. Sci. Technol*, 13 ( 1979) 954.
- [1.48] Novelli EL, Silva AM, Monteiro JP, Sacomani LB, Novellif JL., *Can J Physiol Pharmacol.* (1995) 73(8), 1189.

---

## Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

### Capítulo 3. Estabilidad de la Dopamina y Determinación de sus Constantes de

#### Acidez

- [3.1] Burtis C.A., Ashwood E.R., (Eds) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, third ed*, W.B. Saunders, Philadelphia, (1998) 1570.
- [3.2] Martin B.R., *J. Phys. Chem.* (1971) 75, 2657.
- [3.3] Sedeh I.F., Sjoberg S., Ohman L.O., *J. Inorg. Biochem.* (1993) 50, 119.
- [3.4] Zelano V., Zerbinati O., Ostacoli G., *Ann. Chim. (Rome)* (1988) 78, 273.
- [3.5] Rajan K.S., Skripkus A., Marks G., Davies J.M., *Bioinorg. Chem.* (1976) 6, 93.
- [3.6] Kiss T., Gergely A., *Inorg. Chim. Acta* (1979) 36, 31.
- [3.7] Gerard C., Chehhal H., Hugel R.P., *Polyhedron* 13 (1994) 591.
- [3.8] Grgas-Kuzna B., Simeon V.L., Weber O.A., *J. Inorg. Nucl. Chem.* (1974) 36, 2151.
- [3.9] D. Legget, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York, 1995.
- [3.10] M.A. Villegas, D. Bonilla, M.T. Ramírez, A. Rojas, *Recent Res. Dev. Pure Appl. Anal. Chem.* (1998) 1, 17.
- [3.11] Ramírez M.T., Rojas A., González I., *Talanta* (1997) 44, 3137.
- [3.12] Balderas P., Ramírez M.T., Rojas A., Gutierrez A., *Talanta* (1998) 46, 1439.

### Capítulo 4. Mecanismo de Desprotonación de la Dopamina

- [4.1] Choi, H. J.; Kim, S. W.; Lee, S. Y.; Hwang, O. J. *Neurochem.* (2003), 86, 143.
- [4.2] Pezzela, A.; d'Ischia, M.; Napolitano, A.; Misurata, G; Prota, G. *J. Med. Chem.* (1997) 40, 221.
- [4.3] Solmajer, P.; Kocjan, D.; Solmajer, T. *Z. Naturforsch.* (1983) 38c, 758.
- [4.4] Cooper, J. R.; Bloom, F. E.; Roth, R. H. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*; Oxford University Press: New York, 1986.
- [4.5] Sánchez-Rivera, A.E.; Corona-Avenidaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Rojas-Henández, A.; Ramírez-Silva, M. T.; Romero-Romo, M.A. *Spectrochim. Acta Part A.* (2003) 59, 3193.
- [4.6] Gerard, C.; Chehhal, H. *Polyhedron*, (1994) 13, 591.
- [4.7] Sedeh, F.; Ohman, L.O. *J. Inorg. Biochem.* (1993) 50, 119.

- [4.8] Kiss, T.; Martin, B. *J. Am. Chem. Soc.* (1989) 111, 3611.
- [4.9] Kiss T.; Gergely, A. *Inorg. Chim. Acta*, (1979) 36, 31.
- [4.10] Kuznar, B. G.; Weber, O.A. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, (1974) 36, 2151.
- [4.11] Hancock, R.; Orszulik, S. *Polyhedron*, (1982) 1, 313.
- [4.12] Manjula, V. *Bhattacharya, P. J. Inorg. Biochem.*, (1991) 41, 63.
- [4.13] Balla, J.; Kiss, T.; Jameson, R. *Inorg. Chem.*, (1992) 31, 58.
- [4.14] Porzolt, E.; Beck, M.; Bitto, A.; *Inorg. Chim. Acta.*, (1976) 19, 173.
- [4.15] Hancock, R.; Nakani, B.; Marsicano, F. *Inorg. Chem.*, (1983) 22, 2531.
- [4.16] Jameson, R. F.; Hunter, G.; Kiss, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, (1980)1105.
- [4.17] Rajan, K. S.; Davis, J. M.; Colburn, R. W. *J. Neurochem.*, (1971) 18, 345.
- [4.18] Kier, L. B. *J. Theor. Biol.*, (1973) 40, 211.
- [4.19] Katz, R.; Hellen, S. R.; Jacobson, A. E., *Mol. Pharmacol.* (1973) 9, 486.
- [4.20] Pullman, B.; Berthold, H.; Courriere, P. *Int. J. Quantum Chem.* (1974) 1, 93.
- [4.21] Grol, C. J.; Rollema, H. J. *Pharm. Pharmacol.* (1977) 29, 153.
- [4.22] Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *QCPE Bull.* (1991) 11, 57.
- [4.23] Nagy, P. I.; Alagona, G.; Ghio, C. *J. Am. Chem. Soc.*, (1999) 121, 4804.
- [4.24] Aliste, M. P. *J. Mol. Struct.- Theochem.*, (2000) 507, 1-10.
- [4.25] Urban, J. J.; Cramer, C. J.; Famini, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* (1992) 114, 8226.
- [4.26] Alagona, G.; Ghio, C. *Chem. Phys.* (1996) 204, 239.
- [2.27] Parr R. G.; Yang, W. *Density-functional theory of atoms and molecules* ,Oxford Univ. Press, Oxford, 1989.
- [4.28] (a) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 5648 (b) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* (1988) 37, 785.
- [4.29] Russo N.; Toscano M.; Grand A.; Mineva T. *J. Phys. Chem. A* (2000) 104, 4017
- [4.30] Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F. *J. Amer. Chem. Soc.* (1985)107, 3902
- [4.31] Wolinski, K.; Hilton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* (1990) 112, 8251.
- [4.32] Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *Chem. Phys.* (1981) 55, 117
- [4.33] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.;

Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03, Revision B.3*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2003.

[4.34] GaussView 3.0, Gaussian Inc., Pittsburgh. PA 2003.

[4.35] ArgusLab 4.0.1, Mark A. Thompson Planaria Software LLC, Seattle, WA (2004).

[4.36] Pearson, R. G. *Chemical Hardness*. Edit. Wiley-VCH. Great Britain, (1997).

[4.37] Fleming, I. *Frontier Orbital and Organic Chemical Reaction*. Edit. Wiley and Sons. New York, (1976).

## **Capítulo 5 Efecto del dodecilsulfato de sodio sobre el comportamiento electroquímico de la dopamina.**

[5.1] Pezzela A., d'Ischia M., Napolitano A., Misurata G. Prota G., *J. Med. Chem.* (1997) 40,221.

[5.2] Wightman M., May L. J. y Michel A. C., *Anal. Chem.* (1988) 60, 769.

[5.3] He H., Stein M., Christman B., Wood A. J., *J. Chromatogr. B*, (1997) 701,115.

[5.4] Thorré K., Pravda M., Sarre S., Ebinger G., Michotte Y., *J. Chromatogr. B*, (1997) 694,297.

[5.5] Kankaanpää A., Meririnne E., Ariniemi K., Sepälää T., *J. Chromatogr. B*, (2001) 753,413.

[5.6] Chen M., Li H., *Electroanal.* (1988) 10,477.

[5.7] Wen X. L., Hua Y. H., Liu A. L, *Talanta* (1999) 50,1027.

[5.8] Selvaraju T., Ramaraj R., *Electrochem. Comm.* (N. 2003) 5,667.

[5.9] Reis A. P., Tarley C. R. T, Maniasso, L. Kubota T., *Talanta* (2005) 67,829.

[5.10] Zhang Y., Jin G., Wang Y., Yang Z., *Sensors*, (2003) 3, 443.

[5.11] Raj C. R. y Ohsaka T., *J. Electroanal. Chem.* (2004) 496,44.

[5.12] Ciszewski A., Milczarek G., *Anal. Chem.* (1999) 71,1055.

[5.13] Raoof J. B., Ojani R., Nadimi S. R., *Electrochim. Acta*, (2005) 50,4694.



- [5.14] Gelbert M. B., Curran D. J., *Anal. Chem.* (1966) 58,1028.
- [5.15] Zare H. R., Nasirizadeh N., Ardakani M.M., *J. Electroanal. Chem.* (2005) 577,25.
- [5.16] Jin G. P., Lin X. Q., Gong J. M., *J. Electroanal. Chem.* (2004) 569,135.
- [5.17] Ramesh P., Suresh G. S., Sampath S., *J. Electroanal. Chem.* (2004) 561,173.
- [5.18] Miyazaki K., Matsumoto G., Yamada M., Yasui S., Kaneko H., *Electrochim Acta* (1999) 44, 3809.
- [5.19] Deakin M. R., Kovach P. M., Stutts K. J, Wightman R. M., *Anal. Chem.* (1986) 58, 1474.
- [5.20] Falat L., Cheng H.Y., *Anal. Chem.* (1982) 54, 2108.
- [5.21] Zen J. M., Chen I. L., *Electroanal.* (1977) 9, 537.
- [5.22] Hoyer B., Jensen N., *Electroanal.* (2005) 17,2037.
- [5.23] Zheng J., Zhou X., *Bioelectrochemistry* 71 (2006) 106.
- [5.24] Ramírez M. T., Palomar M. E., González I., Rojas-Hernández A., *Electroanal.* (1995) 7, 184.
- [5.25] Martínez R., Ramírez M. T., González I., *Electroanal.* (1998) 10, 336.
- [5.26] Nicholson R., Shain I., *Anal. Chem.* (1964) 36, 706.
- [5.27] Nicholson R., Shain I., *Anal. Chem.* (1965) 37, 179.
- [5.28] Greef R., Peat R., Peter L. M., Pletcher D. y Robinson J., *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Ellis Horwood Limited., 1985. Pletcher D. *Un primer curso de procesos electroquímicos*. Editorial Club Universitario 1991.
- [5.29] Bard A. J., Faulkner L. R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- [5.30] M. D. Hawley, S. V. Tatawawadi, S. Piekarski, R. N. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* (1967) 89, 447.
- [5.31] Tse D. C. S., McCreery R. L., Adams R. N., *J. Med. Chem.* (1976) 19,37.
- [5.32] Razmi H., Azadbakht A., *Electrochim. Acta*, (2005) 50, 2193.
- [5.33] Venton B. J., Wightman R. M. *Anal. Chem.* (2003) 414.
- [5.34] Bath B. D., Martin H. B., Wightman R. M., Anderson M. R., *Langmuir* (2001) 17, 7032.
- [5.35] Doménech A., García H., Doménech-Carbó M. T, Galletero M. S. *Anal. Chem.* (2002) 74, 562.
- [5.36] Wang Q., Li N., Wang W., *Anal. Sci.* 18 (2002) 635.
- [5.37] Li J., Christensen B., *J. Electroanal. Chem.* 375 (1994) 219.
- [5.38] Li Y., Liu M., Xiang C., Xie Q., Yao S., *Thin Solid Films* 497 (2006) 270.

- [5.39] Corona-Avedaño S., Alarcón-Ángeles G., Rosquete-Pina G. A., Rojas-Hernández A., Gutierrez A., Ramírez-Silva M. T., Romero-Romo M., Palomar-Pardavé M., *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 1640.
- [5.40] Gosser D. K., Jr. *Cyclic voltammetry Simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1993 VCH Publishers, Inc.
- [5.41] Aoki K., Akimoto K., Tokuda K., Matsuda H., Osteryoung J., *J. Electroanal. Chem.* 171 (1984) 219.
- [5.42]. Sánchez-Rivera A. E., Vitla-Vaquier V., Romero-Romo M., Palomar-Pardavé M., Ramírez-Silva M.T., *J. Electrochem Soc.*, (2004) 151, C666.
- [5.43] Tender L., Carter M. T., Murray R. W., *Anal. Chem.* (1994) 66,3173.
- [5.44] Ingram R. S., Murray R. W., *Faraday Transactions, Royal Society of Chemistry* 92 (1996) 3946.
- [5.45] Laviron E., *Bull. Soc. Chim. France* (1967) 3717

## Capítulo 6 Determinación electroquímica de la Dopamina usando dodecilsulfato de Sodio

- [6.1] Chen M., Li H., *Electroanalysis* (1998) 10, 477.
- [6.2]. Wen X.L, Hua Y.H., Liu A.L., *Talanta* (1999) 50, 1027.
- [6.3] Selvaraju T., Ramaraj R., *Electrochem. Commun.* (2003) 5, 667.
- [6.4] Reis A.P., Tarley C, Maniasso N., Kubota L.T., *Talanta* (2005) 67, 829.
- [6.5] Zhang Y., Jin G., Wang Y., Yang Z., *Sensors* (2003) 3, 443.
- [6.6] Raj C.R., Ohsaka T., *J. Electroanal. Chem.* (2004) 496, 44.
- [6.7] Ciszewski A., Milczarek G., *Anal. Chem.* (1999) 71, 1055.
- [6.8]. Raoof J.B, Ojani R., Nadimi S.R., *Electrochim. Acta* (2005) 50, 4694.
- [6.9] Gelbert M.B., Curran D.J., *Anal. Chem.* (1966) 58 ,1028.
- [6.10] Zare H.R., Nasirizadeh N., Ardakani M.M., *J. Electroanal. Chem.* (2005) 577,25.
- [6.11] Jin G.P., Lin X.Q., Gong J.M., *J.Electroanal. Chem.* (2004) 569, 135.
- [6.12] Ramesh P., Suresh G.S., Sampath S., *J. Electroanal. Chem.* (2004) 561, 173.
- [6.13] Miyazaki K., Matsumoto G., Yamada M., Yasiu S., Kaneko H., *Electrochim.Acta.*, (1999) 44, 3809.
- [6.14] Deakin M.R., Kovach P.M., Stutts K.J., Wightman R.M., *Anal. Chem.*, (1986) 58,1474.
- [6.15] Falat L., Cheng H.Y., *Anal. Chem.*, (1982) 54, 2108.

- [6.16] Zen J.M., Chen I.L., *Electroanalysis*, (1997) 9, 537.
- [6.17] Zhang L., Sun Y.G., *Anal. Sci.*, (2001) 17, 939.
- [6.18] Fang C., Tang X., Zhou X., *Anal. Sci.*, (1999) 15, 41.
- [6.19] Chen Y., Yuan J., Wang X., Tian C., *Anal. Sci.*, (2004) 18, 1085.
- [6.20] Zhang J., Jeon C., *Anal. Sci.*, (2002) 20, 1725.
- [6.21] Raj C.R., Ohsaka T., *J. Electroanal. Chem.*, (2001) 496, 44. [6.22] Santos P.M., Sandrino B.,  
Moreira T.F., Wohnrath K., Nagata N., Pessoa C.A., *J. Braz. Chem. Soc.*, (2007) 18, 93.
- [6.23] Lin X.Q., Zhang L., *Anal. Lett.*, (2001) 34, 1585.
- [6.24] Malem F., Mandler D., *Anal. Chem.*, (1903) 65, 37.
- [6.25] Jiang L., Liu C., Jiang L., Peng Z., Lu G., *Anal. Sci.*, (2004) 20, 1055.
- [6.26] Zhang L., Jiang X., *J. Electroanal. Chem.*, (2005) 583, 292.
- [6.27] Chen S.M., Chzo W.Y., *J. Electroanal. Chem.*, (2006) 587, 226.
- [6.28] Vasantha V.S., Ming Chen S., *J. Electroanal. Chem.*, (2006) 592, 77.
- [6.29] Zare H.R., Rajabzadeh N., Nasirizadeh N., Ardakani M.M., *J. Electroanal. Chem.* (2006) 589, 60.
- [6.30] Jiao S., Li M., Wang C., Chena D., Fang B., *Electrochim. Acta*, (2007) 52, 5939.
- [6.31] Goyal R.N., Gupta V.K., Oyama M., Bachheti N., *Talanta*, (2007) 72,976.
- [6.32] Codognoto L., Winter E., Paschoal J.A.R., Suffredini H.B, Cabral M.F.,Machado S.A.S., Rath S.,  
*Talanta*, (2007) 72, 427
- [6.33] Shankaran D.R., Lmura K., Kato T., *Sens. Actuator B*, (2003) 94, 73.
- [6.34] Wang M., Xu X., Gao J., *J. Appl. Electrochem.*, (2007) 37, 705.
- [6.35] Shervedani R.K., Bagherzadeh M., Mozaffari S.A., *Sens. Actuator B*, (2006) 115, 614.
- [6.36] Fang B., Zhang W., Kana X., Tao H., Denga X., Li M., *Sens. Actuator B*,(2006) 117, 230.
- [6.37] Shahrokhian S., Zare Mehrjardi H.R., *Sens. Actuator B*, (2007) 121, 530.
- [6.38] Lin X., Zhang Y., Chen W., Wu P., *Sens. Actuator B*, (2007) 122, 309.
- [6.39] Lin X., Zhuang Q., Chen J., Zhang S., Zheng Y., *Sens. Actuator B*,(2007) 125, 240.
- [6.40] Yogeswaran U., Chen S.M., *Electrochim. Acta* (2007) 52, 5985.
- [6.41] Lin X., Zhuang Q., Chen J., Zhang S., Zheng Y., *Anal. Sci.*, (2002) 18, 635.
- [6.42] J. Zheng, X. Zhou, *Bioelectrochemistry* (2007) 70, 408.
- [6.43] Ramírez M.T., Palomar M.E., González I., Rojas Hernández A., *Electroanalysis*, (1995) 7,184.
- [6.44] Martínez R., Ramírez M.T., González I., *Electroanalysis*, (1998) 10,336.

## Capítulo 7 Estudio electroquímico de la dopamina sobre un electrodo de carbón vítreo

- [7.1] Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N, Miyazaki, y col.. *Neurotox. Res.* (2003) 5,165-76
- [7.2] Yoshitake T, Kehr J, Yoshitake S, Fujino K, Nohta H, Yamaguchi M. *J Chromatogr. B.* (2004)807(2),177-83
- [7.3] Heidbreder CA, Lacroix L, Atkins AR, Organ AJ, Murray S, West A, Shah AJ, *J. Neurosci. Meth.* (2001)112(2),135-44.
- [7.4] Chi J., Odontiadis, J. Franklin M., *J. Chromatogr. B.* (1999) 731(2):361-7.
- [7.5] Parsons J., Kerr TM, Weiss F., *J. Chromatogr. B.* (1998) 709(1):35-45.
- [7.6]. Li N, Duan J, Chen G., *Anal. Sci.* (2003) 19(12), 1587-92.
- [7.7] Doménech A., García H., Doménech-Carbo M. T., Galletero S., *Anal. Chem.* (2002) 74,562-569
- [7.8] Wang, J.; Li M.; Shi Z.; Li N.; Gu Z. *Electroanalysis*, (2002), 14, 225-230.
- [7.9] Gonzalez R., Sanchez A., Chicharro M., Rubianes D., Rivas G., *Electroanalysis*, (2004) 16, 1244
- [7.10] Wang J. *Electroanalytical Chemistry*, 2 ed
- [7.11] Giz M.J., Duong B., Tao N.J., *J. Electroanal. Chem.* (1999) 465, 72–79.
- [7.12] Kawage T.K., Wightman R.M., *Talanta*, (1994) 41, 865–874.

## Capitulo 8 Caracterización de EPC modificados con $\beta$ -CD y MWCNT

- [8.1] K. E. Liu and H. D. Abruna, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2599.
- [8.2] Z. Liu, B. Liu, J. Kong, J. Deng, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4707.
- [8.3] P. Mailley, E. A. Cummings, S. C. Malley, B. R. Eggins, E. McAdams, S. Cosnier, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5422.
- [8.4] S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 56.
- [8.5] Y. H. Zhu, Z. L. Zhang, D. W. Pang, *J. Electroanal. Chem.* 581 (2005) 303.
- [8.6] Y. Q. Dai, K. K. Shiu, *Electroanalysis*. 16 (2004) 1697.
- [8.7] X. Ping, W. Weibing, Y. Jingjing, Z. Faqiong. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2 (2007) 149.
- [8.8] J. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li, and Z. Gu, *Electroanalysis* 14 (2002) 225.
- [8.9] G. Alarcón Ángeles, B. Pérez López, M. Palomar-Pardavé, M. T. Ramírez-Silva, S. Alegret, A. Merkoçi. *Carbon* (2008) Carbon 46 (2008) 898.

- [8.10] J. Britto, K. S. V. Santhanam, P. M. Ajayan, *Bioelectrochem. Bioenerg.* (1996) 41,121.
- [8.11] H. Kaneko, M. Yamada, K. Aoki, *Anal. Sci.* (1990) 6,439.
- [8.12] O. Niwa, M. Morita, H. Tabei, *Electroanalysis* 3 (1991) 163.
- [8.13] G. Alarcón-Ángeles, S. Corona-Avenidaño, M. Palomar-Pardavé, A. Rojas-Hernández, M. Romero-Romo, M. T. Ramírez-Silva, *Electrochim. Acta*, 53 (2008) 3013.
- [8.14] M. I. Manzanares, V. Solís, R. H. de Rossi, *J. Electroanal. Chem.* 407 (1996) 141.
- [8.15] T. Fukuda, Y. Maeda and H. Kitano, *Langmuir* 15 (1999) 1887.
- [8.16] A. Fragoso, E. Almirall, R. Cao, L. Echegoyen, R. González-Jonte, *Chem. Commun.* (2004) 2230.
- [8.17] M. T. Ramírez., M. E. Palomar., I. González, A. Rojas-Hernández, *Electroanalysis* 7 (1995) 184.
- [8.18] R. Martínez, M. T. Ramírez, I. González, *Electroanalysis*. 10 (1998) 336.
- [8.19] G. Roa-Morales, T. Ramirez-Silva, L. Galicia, *J. Solid State Electrochem.* 7 (6) (2003) 355.
- [8.20] J. L. He, Y. Yang, X. Yang, Y. L. Yan, Z. H. Liu, G. L. Shen, R. Q. Yu. *Sens. Actuator B* 114 (2006) 94.
- [8.21] B. Pérez, M. Pumera, M. Del Valle, A. Merkoçi, S. Alegret, *J. Nanosci. Nanotech* 5 (2005) 1694.
- [8.22] S. Corona-Avenidaño, G. Alarcón-Ángeles, M. T. Ramírez-Silva, G. Rosquete-Pina, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé, *J. Electroanal. Chem.* 609 (2007) 17.
- [8.23] J. N. Miller and J. C. Miller. *Statistic and chemometrics for analytical chemistry*. 4th Ed. (2000). Pearson Education Limited.
- [8.24] P. F. Huang, L. Wang, J. Y. Bai, H. J. Wang, Y. Q. Zhao, S. D. Fan. *Microchim Acta* 157 (2007) 41.
- [8.25] R. T. Kachosangi, R. G. Compton. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2793.

## Capítulo 9. Interacción de dopamina con $\beta$ -ciclodextrina.

- [9.1] Alarcón G., Corona S., Ramírez M. T., Rojas A., Romero M., Palomar M., *Electrochim. Acta* (2008) 53,3013.
- [9.2] Sánchez-Rivera A. E., Corona-Avenidaño S., Alarcón-Angeles G., Rojas-Henández A., Ramírez-Silva M.T., Romero-Romo M.A., *Spectrochim. Acta Part A.* (2003) 59, 3193.
- [9.3] Corona Avenidaño S., Alarcón Ángeles G., Rosquete Pina G. A., Rojas Hernández A., Gutierrez A., Ramírez Silva M. T., Romero Romo M., Palomar-Pardavé M., *J. Phys. Chem. B* (2007) 111, 1640.

- [9.4] Corona Avendaño S., Alarcón Angeles G., Ramírez Silva M.T., Rosquete Pina G., Romero Romo M., Palomar Pardavé M., *J. Electroanal. Chem.* 609 (2007) 17.
- [9.5] Alarcón Ángeles G., Pérez López B., Palomar-Pardavé M., Ramírez-Silva M. T., Alegret S., Merkoçi A., *Carbon* 46 (2008) 898.
- [9.6] Ramírez M. T., Palomar M., González I., Rojas Hernández A., *Electroanalysis*. (1995) 7, 184.
- [9.7] Martínez R., Ramírez M. T., González I., *Electroanalysis*., (1998) 10, 336.
- [9.8] Legget D. *Computational methods for the determination of formation constants*, Plenum New York (1995).

### **Capítulo 10. Determinación de las constantes de acidez de azometina-H mediante espectrofotometría UV-Vis.**

- [10.1] Mankung M.J., Fletcher T.L., *J. Med. Chem.*, (1970) 13, 329
- [10.2] Nami S., Green F., *III Forest Products Journal* 52, 1996
- [10.3] Spencer R R., Erdmann D. E., *Environ., Sci. Technol.*, (1979) 13,954-956.
- [10.4] Flower K. R., Howard. V.J., Pritchard R. G., Warren J.E., *Organometallics*, (2002) 21, 1184-1189.
- [10.5] Godsi O., *J. Am. Chem. Soc. Vol.* ( 2004) 126, 13525
- [10.6] Issa R. M., El-Daly S.A, El Wakiel N. A., *Spectrochim Acta Part A*, (2003) 59, 723-728.
- [10.7] Sharma K. K., Neill P. O., Oakes J., Batchelor S. N., Madhava Rao B. S. J. *Phys. Chem. A*, (2003) 107, 7619-7628.
- [10.8] Moein B., Sayed , *J.Am. Chem. Soc.* (2004)
- [10.9] Chi-Hsiang Chuang, Min-Hsiung Lien., *J. Phys. Chem. A.*, (2004) 108, 1790-1798

### **Capítulo 11. Uso de MWCNT para el estudio de Azometina-H por Voltamperometría Cíclica**

- [11.1]. Heinrich Zollinger, *Color Chemistry*, 2da. ed VCH Publishers, New York (USA) 1991
- [11.2]. Li N, Duan J, Chen G., *Anal. Sci.* 19 (2003) 1587
- [11.3] M.J. Giz, B. Duong, N.J. Tao, *J. Electroanal. Chem.* 465 (1999) 72
- [11.4] J.A. Ni, H.X. Ju, H.Y. Chen, D. Leech, *Chem. J. Chin. Univ.* 20 (1999) 224



[11.5] 9J. Wang, T.Z. Peng, *Anal. Chem.* 58 (1986) 3257

[11.7] S. Ijiman, *Nature (London)* 354 (1991) 56

[11.8] T.G.W. Solomons, *Química Orgánica, 1er ed Editorial Limusa, México (D.F), 1996*



**APENDICE A**

## **Apéndice A**

### **Método Experimental**

#### **Estudio Espectrofotométrico.**

##### Reactivos

Las soluciones de DA fueron preparadas usando reactivo grado analítico de Merck, para la titulación espectrofotométrica se utilizó NaOH (Merck 99%) y HCl (Merck 37%), Para el estudio de estabilidad y el análisis punto por punto se utilizó buffer de fosfatos para lo cual se emplearon reactivos grado AR, el fosfato de sodio fue usado de Aldrich (96%), mientras que fosfato mono ácido de sodio y fosfato diácido de sodio fueron de Fluka (99%). Todas las soluciones fueron preparadas usando agua desionizada tipo I (18 MΩ) libre de materia orgánica, obtenida de US Filter PURE LAB PLUS, y burbujeadas con nitrógeno al 99.9 % para eliminar el oxígeno presente.

##### Equipo.

Los espectros de absorción fueron obtenidos con un espectrofotómetro Perkin –Elmer lambda 20, controlando la temperatura a  $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  con un sistema peltier integrado al espectrofotómetro, la temperatura la celda de reacción se controló con un baño de temperatura y un recirculador marca Cole –Palmer.

Las lecturas de pH fueron obtenidas usando un potenciómetro LPH 430T de marca Tacussel, el electrodo empleado fue un electrodo de vidrio combinado Corning (rango pH 0-14). Para el análisis puntual y el estudio de estabilidad, se usó un sistema de análisis en flujo continuo.

## Cálculos

Los datos de los espectros obtenidos de cada método, fueron usados para determinar las constantes de acidez de DA usando SQUAD, el cual requiere de la concentración de trabajo del analito, los datos de absorbancia para cada valor de pH y del modelo químico que considera las especies involucradas, dicho programa ha sido empleado para determinar constantes de acidez para otras moléculas (10-12).

SQUAD devuelve como datos de salida: el cálculo de las constantes de acidez de acuerdo al modelo químico propuesto, así como los coeficientes de absorción para las especies involucradas, además de la desviación estándar del cálculo.

A partir de los datos obtenidos con SQUAD es posible calcular las fracciones molares de cada especie, y obtener los diagramas de distribución

### *Estudio de Estabilidad Sección Experimental*

La estabilidad de la Dopamina se estudió mediante espectroscopía Ultravioleta- visible, tomando el espectro de absorción de la molécula cada minuto durante media hora y después cada 10 minutos, hasta alcanzar un tiempo total de dos horas.

El estudio de estabilidad de la Dopamina se realizó para la especie ácida a un valor de pH = 3.0 y para la especie básica pH =12, ajustando el pH de la solución de la Dopamina con una solución HCl 0.01M y NaOH 0.01M.

El análisis de estabilidad se hizo sobre el seguimiento de la banda de absorción máximo de cada especie la Dopamina en función del tiempo.

### Titulación Espectrofotométrica

La titulación espectrofotométrica consiste en el cambio de pH de la solución, en la celda de reacción se colocó una solución de DA  $2.8 \times 10^{-4} \text{M}$  en HCl 0.01M y se hicieron adiciones de NaOH 0.01M, en cada adición se tomó la lectura de pH y de potencial, de esta solución se tomó una alícuota y se llevó al espectrofotómetro para tomar su correspondiente espectro de absorción. Se controló temperatura, oxígeno y luz, la figura 1, muestra el sistema de trabajo.

El tiempo aproximado del análisis es de 4hrs, en el intervalo de pH estudiado de 2.0 a 12.7.

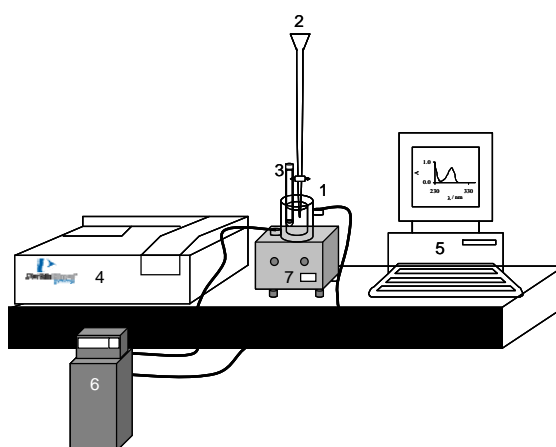


Figura1. Esquema del sistema de trabajo: 1= celda de reacción, 2 =Bureta, 3= electrodo de pH, 4= Espectrofotómetro UV-Vis, 5= PC, 6= recirculador

### Análisis Puntual

Esta metodología consiste en realizar soluciones frescas de Dopamina  $2.8 \times 10^{-4} \text{M}$  para cada valor de pH. En este caso se prepararán soluciones amortiguadoras con el par ácido base conjugado de especies de fosfato  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , según sea el caso. Una vez teniendo la solución con el pH deseado, se preparan las soluciones de Dopamina en este medio. Para cada solución se toma la lectura de pH y de potencial, y su espectro de absorción correspondiente.

La muestra se llevó al espectrofotómetro con un sistema en flujo continuo (FIA) para evitar la exposición a la luz y el oxígeno. Los tiempos de agitación, registro de pH y

obtención de espectro de la Dopamina fueron controlados. Una vez obtenidos la familia de espectros se calculan las constantes de acidez de la Dopamina. El cálculo de constantes se realizará utilizando el programa computacional SQUAD.

**Apéndice B**



## Apéndice B

### Método Experimental

#### Estudio Electroquímico.

Reactivos.

La solución stock de Dopamina, Acido Ascórbico y  $\beta$ -ciclodextina  $1 \times 10^{-2}$  M, fueron preparadas a partir del reactivo grado A R Merck, para ajustar el pH, se utilizo HCl (Merck 37%) 0.01M. y las soluciones buffer fosfatos fueron preparados a partir del reactivo de grado AR, para diácido de sodio fosfato (Fluka 99%) y ácido fosforico (fluka 85.2%). Todas las soluciones fueron preparadas usando agua desionizada tipo1(18.2 MV) libre de materia orgánica.

Equipo

La voltamperometría cíclica y la voltamperometría diferencial de pulso, se realizo con el uso de un Autolab, con una celda convencional de tres electrodos (Figura1), como electrodo de trabajo se utilizo un electrodo de pasta de grafito y/o carbón vítreo (a), un alambre de Pt como contra electrodo (b) y como electrodo de referencia se utilizo Ag/AgCl (c). Todas las mediciones se hicieron a temperatura ambiente de 25°C.

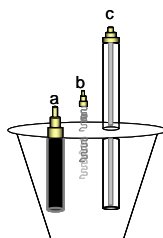


Figura1. Celda electroquímica típica, a)electrodo de trabajo, b)contra electrodo, c)electrodo de referencia

Pre-tratamiento de Electrodo Carbón vítreo.

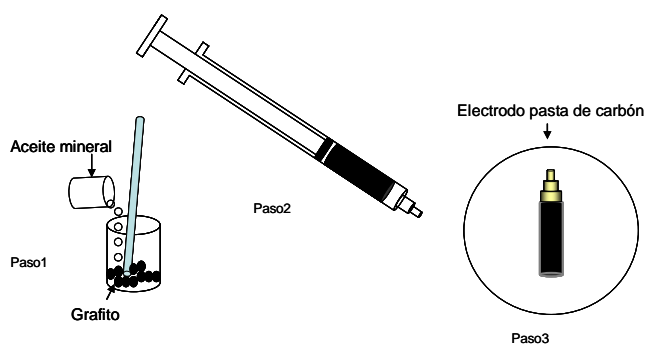
Limpieza de la superficie del electrodo de carbón vítreo fue pulida con alumina 0.5mm, después de obtener un pulido tipo espejo y con el fin de eliminar las partículas de alumina restantes sobre la superficie del electrodo éste se sonifico en H<sub>2</sub>O.

Para activar la superficie del electrodo se hicieron barridos de potencial sobre una solución de Fosfatos a pH 7.4, hasta obtener una respuesta estable.



Fabricación de electrodo de trabajo.

El electrodo de pasta de grafito (esquema1), se hizo con una mezcla de grafito()/ aceite mineral () en una relacionen peso 1/1(paso 1), la pasta resultante, se compacto utilizando un jeringa (paso2), finalmente el electrodo fue cortado y se adapto un conector (paso3).



Esquema1 Construcción electrodo pasta de grafito.

**Apéndice C**



## Apéndice C

### Método Experimental: Electrodo Modificados

#### Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico, La Dopamina (DA) y  $\beta$ -Ciclodextrina (CD) usadas fueron de marca Sigma y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de Fluka. Los carbón nanotubos de multipared (MWCNT) (0.5-200nm), fueron de Aldrich (Stenheim, Germany) con 95% de pureza.

Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultra pura con obtenida de Millipore-MilliQ system, las soluciones fueron burbujeadas para quitar la presencia de oxígeno.

#### Equipo

El estudio electroquímico se llevo a cabo con una celda convencional de tres electrodos, usando un electrodo de platino y Ag/AgCl como contra electrodo y referencia, respectivamente. El electrodo de trabajo fue de carbón vítreo o electrodo de carbón vítreo modificado con MWCNT -CD. Todas las medidas electroquímicas fueron hechas en atmósfera de nitrógeno a temperatura de 25 °C.

La voltamperometría cíclica y los experimentos amperométricos fue hechos usando un electrochemical analyzer Autolab 20, conectado a una computadora personal.

Las imágenes de CD, MWCNT y de la película MWCNT-CD fueron hechas usando Hitachi-S-3200N scanning electron microscope (SEM).

#### 2.2. Preparación de nanotubos de carbón multipared

La purificación fue hecha con una solución de 2 M ácido nítrico por 24 hrs. A 25°C de acuerdo al procedimiento descrito por Perez et al.(3)

## 2.2. Preparación de la película CD-MWNT.

1mg de MWCNT, fueron dispersos por ultrasonido en un mililitro de  $\beta$ -CD de concentración  $1 \times 10^{-2}$  M, de esta dispersión se colocó por goteo una película sobre el electrodo de carbón vítreo (GCE) este electrodo tuvo un pretratamiento previo a la formación de la película (ver apéndice B).

