

Comportamiento electroquímico de la dopamina en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/glutaraldehído

Sabino Menolasina¹, Begoña Martín-Fernández²,
Francisco J. García-Íñigo², Beatriz López-Ruiz^{2*}

¹ Departamento de Análisis y Control, Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

² Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 21 de abril de 2009.

RESUMEN

En el presente trabajo se propone un nuevo método para la determinación indirecta de dopamina (DA), basado en la modificación del electrodo de carbón vítreo mediante adsorción sobre su superficie de una película de laponita (arcilla catiónica) y glutaraldehído (GA). Mediante voltamperometría cíclica (VC) se estudió el comportamiento electroquímico de la DA en una disolución tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0 y en presencia de tirosinasa (PPO). La presencia de tirosinasa permitió la determinación indirecta de DA, midiendo la corriente de reducción generada por el dopaminocromo formado a partir de la quinona procedente de la reacción enzimática entre DA y PPO a $-0,25$ V vs. Ag/AgCl (3 M). Esta corriente de reducción originada por el dopaminocromo es proporcional a la concentración de DA presente en el medio.

Palabras clave: Electrodo de carbón vítreo modificado; Dopamina; Tirosinasa; Voltamperometría cíclica.

ABSTRACT**Electrochemical behaviour of dopamine on a laponite/
glutaraldehyde modified glassy carbon electrode**

In this work a new method of dopamine (DA) detection, based on glassy carbon electrode modified by adsorption on the surface with a film of laponite (cationic clay) and glutaraldehyde (GA) is proposed. The electrochemical behaviour of the DA in a phosphate buffer solution 0,1 M, pH 6,0 of tyrosinase was studied by cyclic voltammetry technique (CV). The tyrosinase present in the solution allowed the indirect detection of DA monitoring the dopaminochrome coming from the quinone produced in the enzymatic reaction between the DA and tyrosine to -0.25 V vs. Ag/AgCl (3 M). The reduction current of the dopaminochrome was found to be proportional to the DA concentration.

Key Words: Modified glassy carbon electrodes; Dopamine; Tyrosine; Cyclic voltamperometry.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de compuestos químicos llamados neurotransmisores que son liberados por las neuronas. Entre estos neurotransmisores se encuentran la dopamina (DA), neurotransmisor que juega un papel fisiológico muy importante como mensajero químico a nivel neuronal. La enfermedad de Parkinson es producto de un desorden degenerativo crónico y lentamente progresivo a nivel cerebral, cuyos síntomas incluyen postura rígida, temblor de reposo y lentitud del movimiento voluntario, entre otros. En esta enfermedad la principal anomalía bioquímica es la deficiencia de DA en el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen). Para avanzar en el conocimiento de la patología y tratamiento de esta enfermedad y otras que se producen como consecuencia de la variación de la concentración de DA en ciertas regiones del cerebro se necesitan métodos eficaces y seguros de determinación de DA. Es por todo ello que el comportamiento electroquímico de este neurotransmisor reviste tanto interés (1, 2).

Para mejorar la selectividad en la detección de DA se han desarrollado muchos métodos relacionados con el pretratamiento y modificación de superficies electródicas para su uso como sensores electroquímicos (3-8).

Las arcillas son materiales que se originan de la descomposición de rocas, como partículas pequeñas y superficie lisa, son silicatos hidratados de alúmina. La laponita ($\text{Si}_8[\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.5}\text{H}_4\text{O}_{24}]^{0.7}\text{Na}^{0.7+}$), es una arcilla catiónica que presenta una estructura laminar con cationes intercambiables en su espacio interlaminar. Esta arcilla ha sido utilizada con éxito como sistema de inmovilización de enzimas destinadas a la fabricación de biosensores amperométricos enzimáticos (9).

En el presente trabajo se propone la modificación de un electrodo de carbón vítreo mediante adsorción en su superficie de una película de laponita-glutaraldehído y su aplicación en la detección de DA.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

La tirosinasa con una actividad de 1530 UI/mg de sólido fue suministrada por Sigma. La dopamina y el glutaraldehído (GA), disolución acuosa 25% por Fluka. Todos los reactivos fueron utilizados sin ningún tratamiento adicional de purificación. El agua utilizada fue de calidad Milli Q 18 MW (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2. Aparatos

Los voltamperogramas se realizaron en un potenciostato galvanostato Autolab PGSTAT12 y una celda de vidrio de un compartimiento y tres electrodos. Un electrodo de Ag/AgCl (3 M) utilizado como electrodo de referencia y un alambre de platino como electrodo secundario. Como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de disco de carbón vítreo ($d = 3 \text{ mm}$) modificado.

2.3. Tratamiento del electrodo de carbón vítreo

El electrodo de disco de carbón vítreo ($d = 3 \text{ mm}$), utilizado como electrodo de trabajo, se sometió en primer lugar a un tratamiento químico por inmersión del mismo en una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1) durante 10 segundos y posterior lavado con abundante agua desionizada. Finalmente se pulió con alúmina $0,05 \text{ mm}$, usando agua desionizada como lubricante. Terminada la limpieza mecánica, se sometió al electrodo a ciclos entre $-0,2 \text{ V}$ y $0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl (3 M) en una disolución tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ pH $6,0$, cincuenta barridos a 200 mV s^{-1} .

2.4. Tratamiento de la celda electroquímica y del material de vidrio utilizado

Todo el material de vidrio utilizado y la celda electroquímica fueron lavados inicialmente con detergente, posteriormente con una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1) durante 10 minutos y finalmente con abundante agua desionizada. Este procedimiento se repitió siempre que se sospechara una posible contaminación del material de vidrio o de la celda.

2.5. Preparación del electrodo de carbón vítreo

Una vez terminada la limpieza del electrodo de carbón vítreo según los pasos descritos anteriormente se procedió a la modificación de su superficie con laponita y glutaraldehído según el siguiente procedimiento:

- **Modificación con laponita.** Se preparó una suspensión de laponita añadiendo 2 mg de laponita en 1 mL de agua desionizada y se depositaron aproximadamente $25 \text{ }\mu\text{L}$ de dicha suspensión sobre la superficie del electrodo. Se le aplicó aire caliente hasta la total evaporación del líquido, quedando una fina película de laponita adsorbida sobre la superficie electródica.
- **Modificación con laponita/GA.** Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente y se colocó dicho electrodo mo-

dificado con laponita en un recipiente cerrado saturado con vapor de glutaraldehído durante 30 minutos. Aunque el glutaraldehído se utiliza como agente entrecruzante con el que las enzimas establecen enlaces covalentes intermoleculares entre los grupos del soporte y del propio enzima, o intramoleculares entre dos grupos amino de la misma molécula de enzima, parece ser que éste se adsorbe sobre la superficie de la laponita o se retiene entre la estructura laminar de la misma.

3. RESULTADOS

3.1. Electrodo de carbón vítreo

La Figura 1 muestra el voltamperograma obtenido con una disolución tampón fosfato 0,1 M pH 6,0 en ausencia y presencia de DA 5×10^{-4} M en un electrodo de carbón vítreo al realizar un barrido cíclico entre $-0,2$ V hasta $0,6$ V vs. Ag/AgCl (3 M). El voltamperograma representado con líneas discontinuas corresponde a la respuesta electroquímica del sensor químico en una disolución tampón fosfato, y

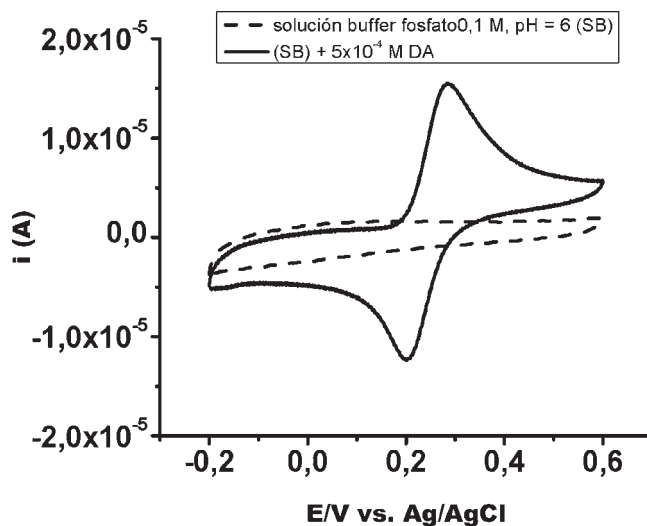


Figura 1. Voltamperograma cíclico de la DA en un electrodo de carbón vítreo ($d = 3$ mm) en una disolución tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0; $v = 200$ $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

el presentado con línea continua a la respuesta electroquímica del sensor químico en la disolución 5×10^{-4} M DA.

El voltamperograma obtenido en presencia de DA presenta los picos de oxidación y reducción de la dopamina con un ΔE_p de 80 mV y una relación entre la corriente de pico anódica y catódica (I_{pa}/I_{pc}) de 1,2, al realizar los ciclos a $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.2. Electrodo de carbón vítreo modificado con laponita y laponita/glutaraldehído

En la Figura 2 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos en disoluciones de distintos pHs en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita, y en la Figura 3 se observa el efecto de la velocidad de barrido a los distintos pHs. Para realizar este estudio se disolvió DA en disoluciones tampón Tris/fosfato 0,1 M y pHs 5,98; 7,98; 8,98 y 11,03. Se observa que a pH 5,98 los potenciales catódicos disminuyen con la velocidad mientras que los anódicos aumentan, esta tendencia no se observa en el resto de pHs, donde los potenciales de pico apenas sufren cambios con las velocidades de barrido. Estos resultados también apuntan a que el proceso redox de la DA en el electrodo de carbón vítreo a pH 5,98 es menos reversible que a pHs más alcalinos. Como era de esperar, las corrientes

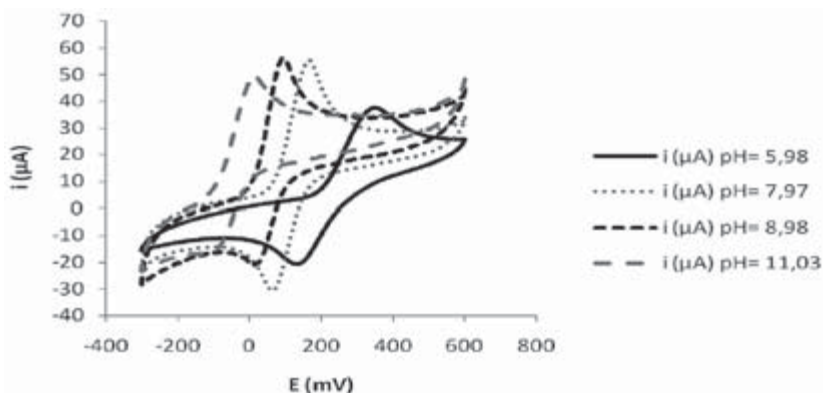


Figura 2. Voltamperogramas cíclicos de DA 510^{-4} M en una disolución tampón Tris/fosfato 0,1 M a diferentes pHs, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita; $v = 500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

anódica y catódica aumentan con la velocidad de barrido. Conviene destacar que en los voltamogramas realizados a $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ se observa una corriente catódica muy débil.

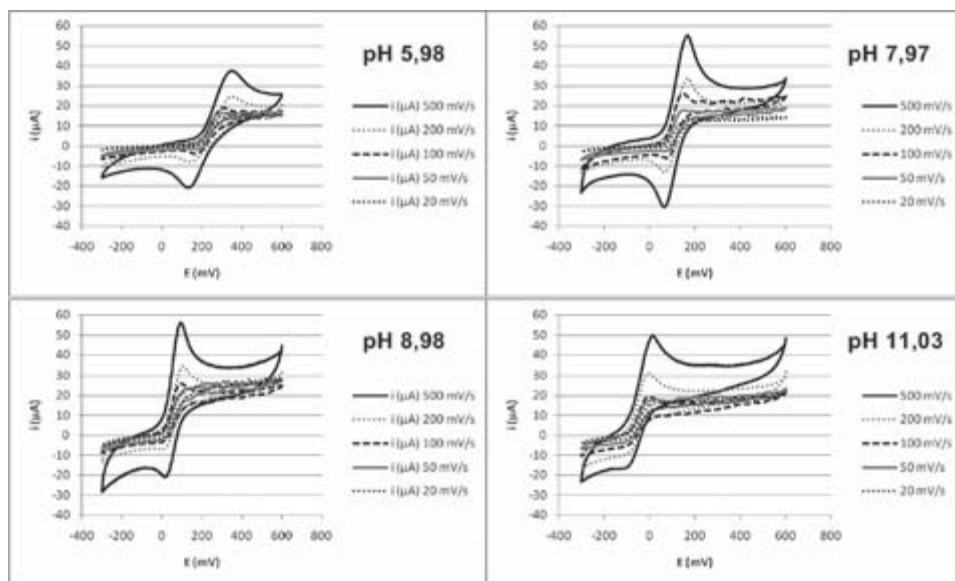


Figura 3. Voltamperogramas cíclicos de DA 510^{-4} M en una disolución tampón Tris/fosfato $0,1 \text{ M}$ a diferentes velocidades de barrido, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita.

Al modificar el electrodo de carbón vítreo con una película de laponita, la respuesta electroquímica varía. El pico correspondiente a la oxidación de la DA se ve incrementado con respecto al obtenido sobre el electrodo sin modificar (Figura 4).

Como muestra la Figura 5, el pico de oxidación de la DA aumenta cuando el electrodo de carbón vítreo se modifica con laponita/GA, según el procedimiento ya descrito. Asimismo, se observa que la naturaleza de la capa que rodea al electrodo afecta a la reversibilidad del proceso electroquímico, siendo más irreversible cuando la capa aumenta su complejidad, primero laponita y posteriormente laponita/GA.

En vista de estos resultados se estudió el comportamiento electroquímico de la DA en presencia de la enzima tirosinasa en una disolu-

ción tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0 utilizando como sensor electroquímico el electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA.

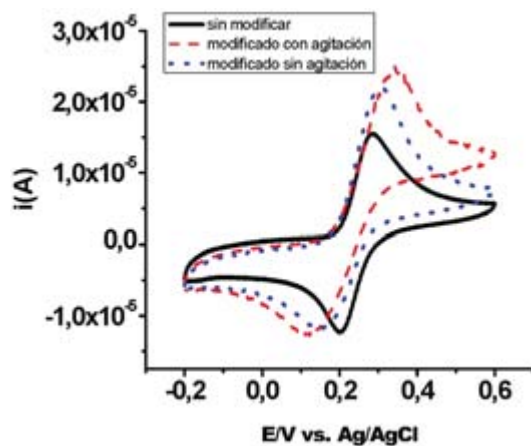


Figura 4. Voltamperogramas obtenidos en una disolución 5×10^{-4} M DA en tampón fosfato pH 6,0 utilizando un electrodo de carbón vítreo sin modificar y modificado con laponita; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

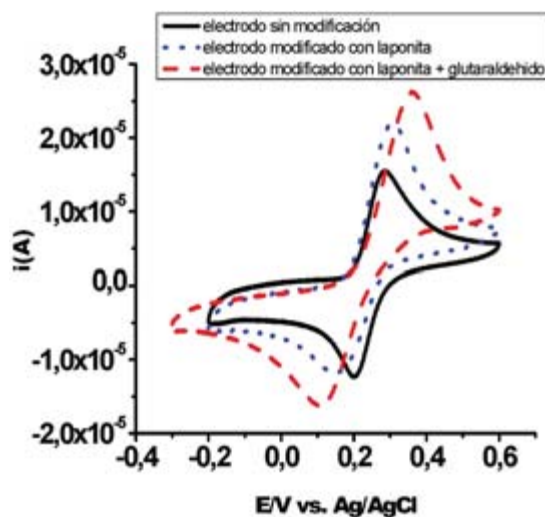


Figura 5. Voltamperogramas obtenidos en una disolución 5×10^{-4} M DA en tampón fosfato pH 6,0 utilizando un electrodo de carbón vítreo sin modificar y modificado con laponita y modificado con laponita/GA; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

En la Figura 6 se observan cuatro picos (A, B, C y D). El pico A, que aparece a + 0,37 V; el pico B a + 0,1 V; el pico C a -0,25 V y el pico D a -0,1 V. A medida que transcurre el tiempo de mezcla de la tirosinasa y DA en la disolución tampón fosfato pH 6,0 la disolución comienza a colorearse al mismo tiempo que los picos A y B disminuyen y otros picos aparecen y aumentan con el tiempo de mezcla (picos C y D). Una vez que la DA se ha consumido completamente como consecuencia de la reacción enzimática con la tirosinasa, los picos C y D permanecen constantes en el tiempo, lo cual es indicativo de que durante dicho proceso la superficie electródica no se desactiva.

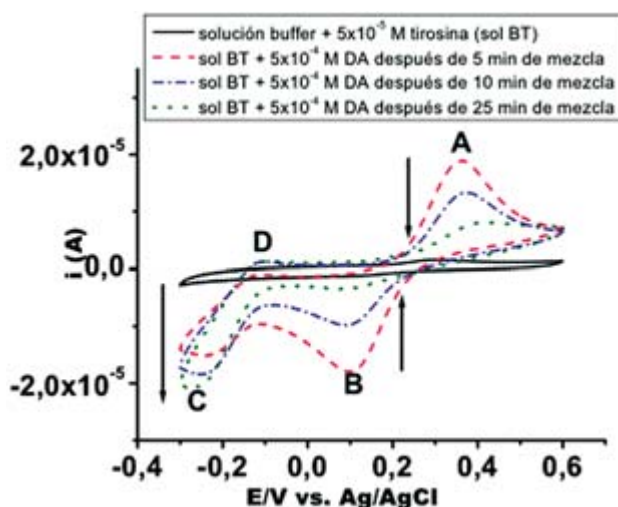


Figura 6. Voltamperogramas obtenidos a lo largo del tiempo, en una disolución 5×10^{-4} M DA y 5×10^{-5} M tirosinasa en tampón fosfato pH 6,0 en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

En la Figura 7 se observa que al hacerse más catódico el potencial de retorno, el pico C permanece constante mientras que se aprecia un aumento del pico D, como consecuencia de que una mayor cantidad de dopaminocromo está siendo reducido. Por otra parte, comienza a desarrollarse un nuevo pico de oxidación, pico (E) a 0,2 V, posiblemente debido a la oxidación de un nuevo producto que se origina al reaccionar el leucodopaminocromo con la DAQ a medida que el potencial catódico se va haciendo más negativo, hasta -0,45 V, como sugieren otros autores (14).

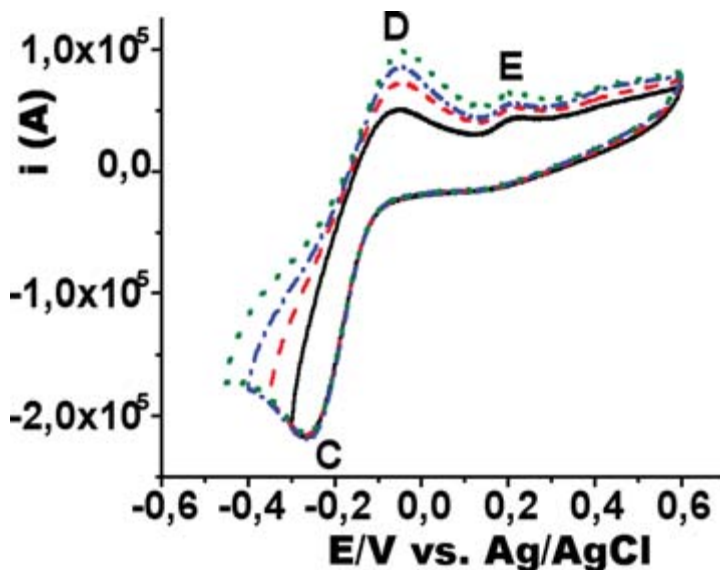


Figura 7. Voltamperogramas obtenidos en una disolución 5×10^{-4} M DA y 5×10^{-5} M tirosinasa en tampón fosfato pH 6,0 una vez completada la reacción enzimática y al ir variando el potencial de retorno, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA; $v = 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se observa además que a potenciales más negativos de $-0,45 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl los picos C y D disminuyen y la disolución se torna mucho más oscura, lo cual puede indicar que a dichos potenciales la superficie electródica comienza a desactivarse posiblemente debido a la adsorción de un material polimérico que se origina por la formación del tautómero p-quinonamina-dopaminocromo, a potenciales más negativos de $-0,45 \text{ V}$, el cual induce al proceso de polimerización (14).

El hecho de que una vez que la DA presente en la disolución ha reaccionado completamente a través de la reacción enzimática con la tirosinasa, el pico C permanezca constante al realizar ciclos entre $0,6 \text{ V}$ y $-0,45 \text{ V}$, nos permite pensar en la posibilidad de construir un sensor enzimático para la cuantificación indirecta de DA a través de la medida de la corriente que se origina al reducirse electroquímicamente el dopaminocromo que se forma por la reacción enzimática entre la DA y la tirosinasa.

La Figura 8 muestra la relación lineal existente entre la corriente de reducción del producto formado en la reacción enzimática y la concentración de DA presente en la muestra, en presencia de tirosinasa.

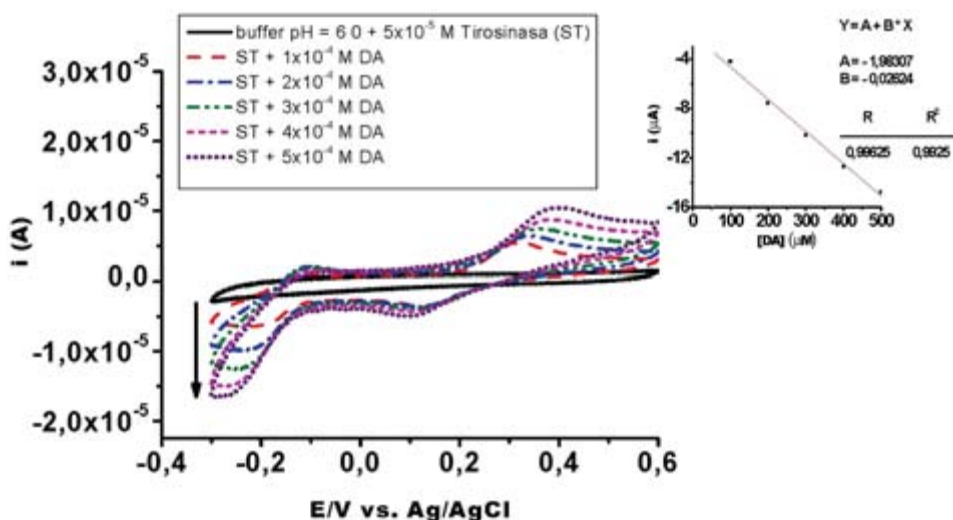
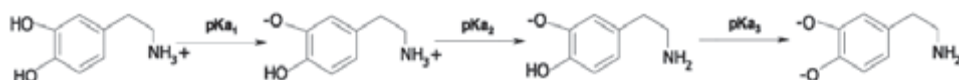


Figura 8. A) Voltamperogramas obtenidos en una disolución de tirosinasa 5×10^{-5} M en tampón fosfato pH 6,0 al añadir cantidades crecientes de DA y registrados 25 minutos después de cada adición, manteniendo dicha disolución en agitación, en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA; $E = -0,25$ V vs. $Ag/AgCl$ (3M); $v = 200$ $mV \cdot s^{-1}$. B) Relación lineal entre la corriente de reducción del dopaminocromo formado tras la reacción enzimática y la concentración de DA.

4. DISCUSIÓN

Al estudiar el comportamiento electroódico de la DA en función del pH tenemos en cuenta los equilibrios de disociación de la molécula (Esquema 1) y la fracción molar de cada una de las especies presentes en disolución a distintos pHs (Figura 9).



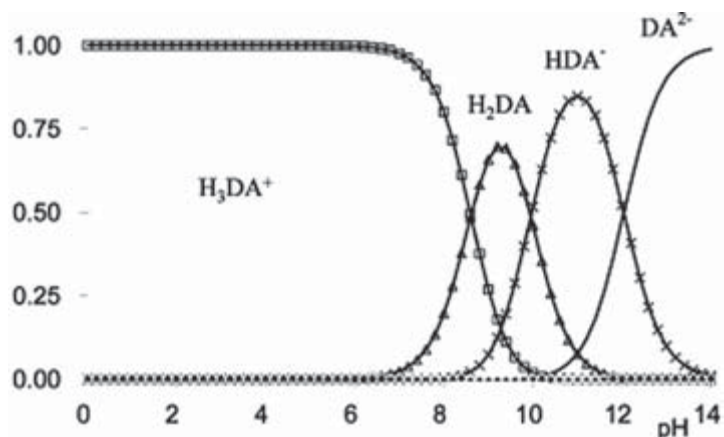
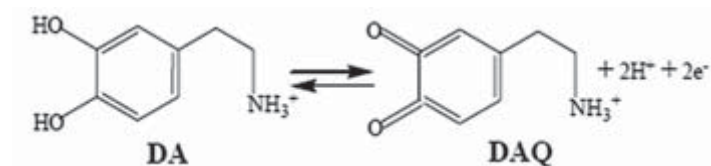


Figura 9. Fracciones molares de las distintas especies de dopamina en función del pH del medio.

El descenso observado en los potenciales de pico de la pareja DA/DA_{OXIDADA} al aumentar el pH de 6,0 a 11,0 se debe a la generación de iones hidrógeno en la reacción de oxidación de la DA (Esquema 2). Por ello, un aumento en el pH de la disolución favorece la oxidación de la DA y como consecuencia, los potenciales disminuyen.



Esquema 2. Mecanismo de oxidación de la dopamina.

Por otra parte, la carga neta de la molécula provoca cambios en su comportamiento electroquímico. Al realizar los barridos a $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, cuando la DA presenta una carga neta positiva (pH 5,98) el ΔE_p es 210 mV, sin embargo ΔE_p se reduce a la mitad, 102 mV, a pH 7,97 y alcanza un valor de 66 mV a pH 8,98. El pico de reducción desaparece a pHs muy alcalinos (11,03). Estos resultados indican que el mecanismo redox de la especie de DA neutra es más reversible

que el de las especies cargadas, probablemente debido al entorno de carga positiva (laponita), que rodea a la superficie electrónica, que dificulta la difusión de la DA cargada a través de la arcilla, en su camino hacia el electrodo.

Si tenemos en cuenta los pKas de la DA (9,0; 10,6 y 12,1) (10) al pH de trabajo (pH 6,0), la molécula tiene carga positiva y, por tanto, será fácilmente retenida por la laponita en las proximidades del electrodo, aumentando considerablemente la concentración de DA en la interfase electrodo/disolución lo que da lugar al aumento de corriente observado. Se ve además que, al agitar la disolución, el transporte de masa por convección de la DA hacia la superficie del electrodo modificado está favorecido ya que la corriente de oxidación incrementa mientras que la señal de reducción de la especie oxidada de la DA se mantiene prácticamente constante.

El proceso electroquímico que sufre la DA se hace menos reversible sobre la superficie del electrodo modificado con laponita con respecto a la respuesta observada sobre el electrodo sin modificar.

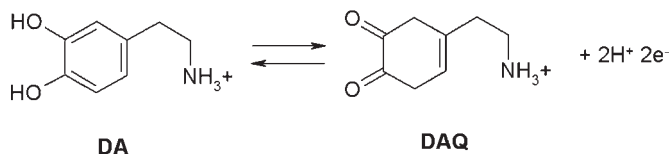
En el electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/GA se observa un aumento de la señal y una mayor separación entre los picos. Este comportamiento sugiere que las moléculas de GA se quedan adsorbida a la laponita y su reactividad con las aminas hace que algunas de las moléculas de DA que llegan a esa capa se unan al GA adsorbido en la laponita. Por ello el nivel de DA en la interfase electrodo disolución se ve aumentado debido a la suma de dos efectos, el intercambio catiónico con la laponita y la unión al GA, siendo ésta la razón del aumento de las corrientes tanto anódica como catiónica.

Los cuatro picos que aparecen en el voltamograma de una disolución de DA en presencia de tirosinasa a pH 6,0 se corresponden con la oxidación electroquímica de la DA (Pico A), la reducción de la dopaminoquinona (DAQ) (Pico B), la reducción del dopaminocromo (Pico C) y la oxidación del leucodopaminocromo (Pico D).

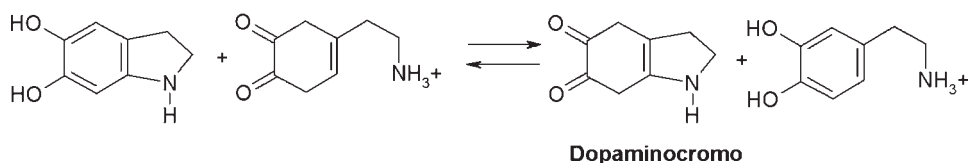
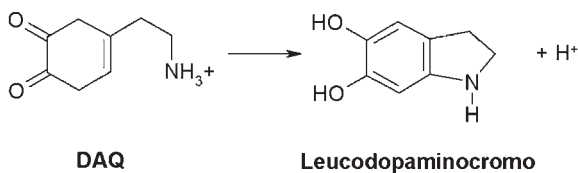
Los picos de oxidación y reducción de la DA y sus metabolitos ya han sido descritos en la literatura utilizando un electrodo de pasta de carbón modificado enzimáticamente (11), un electrodo de carbón vítreo empleando espectroelectroquímica FTIR *in-situ* (12), un elec-

trodo de oro modificado enzimáticamente, donde la enzima glucosa oxidasa fue codepositada electroquímicamente dentro de un polímero conductor (13) y un electrodo de carbón vítreo modificado con una mezcla de un gel líquido y nanotubos de carbón (14), entre otros.

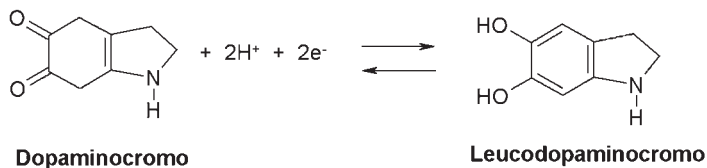
Oxidación electroquímica y enzimática de la DA



Reacciones químicas de la DA y DAQ



Reducción electroquímica del dopaminocromo



Esquema 3. Procesos electroquímico y enzimático de la dopamina en la celda electroquímica.

Según los resultados expuestos, se confirma que el uso de un electrodo de carbón vítreo modificado físicamente por adsorción

sobre su superficie con una matriz laponita/GA puede utilizarse como sensor electroquímico para la detección indirecta de DA midiendo la corriente catalítica originada por la reducción del dopaminocromo en la reacción enzimática de DA con tirosinasa tal como se muestra en el Esquema 3, ya que se ha comprobado la linealidad existente entre la corriente de reducción medida en estas condiciones y la concentración de DA presente en la muestra.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Complutense por la financiación de este trabajo a través del CCG07-UCM/MAT-2681 (Gp 950247) Programa para la Consolidación de grupos de investigación, España, y al CDCHT-ULA (FA-430-08-08-B) y FONACIT Venezuela.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, R. N. & Justice, J. B. Jr., Editors (1987) «Voltammetry in the Neurosciences: Principles Methods and Applications». The Humana Press, Clifton, NJ.
2. Stamford, J. A. & Justice, B. Jr. (1996) Probing brain chemistry. *Anal. Chem.* 69: 359A-363A.
3. Zhao, H., Zhang, Y. & Yuan, Z. (2002) Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid Using Poly (hippuric acid) Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*. 14: 1031-1034.
4. Ciszewski, A. & Milczarek, G. (1999) Polyengamol-modified platinum electrode for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid. *Anal. Chem.* 71: 1055-1061.
5. Duong, B., Arechavaleta, R. & Tao, N. J. (1998) *In situ* AFM/STM characterization of porphyrin electrode films for electrochemical detection of neurotransmitters. *J. Electroanal. Chem.* 447: 63-69.
6. Fragoso, A., Almirall, E., Cao, R., Echegoyen, L. & González, R. (2004) A supramolecular approach to the selective detection of dopamine in the presence of ascorbate. *Chem. Comm.* 19: 2230-2231.
7. Raj, C. R., Tozuda, K. & Osaka, T. (2001) Electroanalytical applications of cationic self-assembled monolayers: square-wave voltammetric determination of dopamine and ascorbate. *Bioelectrochem.* 53: 183-191.
8. Menolasina, S., Contreras, R. R., Aguilar A., Contreras O. & Rodríguez A. (2007) Comportamiento electroquímico de la Dopamina en presencia de ácido ascórbico utilizando un electrodo de oro modificado electroquímicamente y

- un electrodo de oro modificado electroquímicamente y químicamente con un tiol. *Revista Técnica de la Universidad del Zulia*. 30: 151-156.
9. Mousty, C., Cosnier, S., Sánchez-Paniagua López, M., López-Cabarcos, E. & López-Ruiz, B. (2007) Rutin Determination at an Amperometric Biosensor. *Electroanalysis*. 19: 253-258.
 10. Sánchez-Rivera, A. E., Corona-Avendaño, S., Alarcón-Angeles, G., Rojas-Hernández, A., Ramírez-Silva, M. T. & Romero-Romo, M. A. (2003) *Espectrochim. Acta*. 59: 3193-3203.
 11. Forzani, G. A., Rivas, G. A., Solís, V. M. (1997) Amperometric determination of dopamine on vegetal-tissue enzymatic electrodes. Analysis of interferents and enzymatic selectivity. *J. Electroanal. Chem.* 435: 77-84.
 12. Wang, X., Jin, B. & Lin, X. (2002) *In-situ* FTIR Spectroelectrochemical study of dopamine at a glass carbon electrode in a neutral solution. *Anal. Sci.* 18: 931-933.
 13. Li, M., Deng, C., Xie, Q., Yang, Y. & Yao S. (2006) Electrochemical quartz crystal impedance study on immobilization of glucose oxidase in a polymer grown from dopamine oxidation at an Au electrode for glucose sensing. *Electrochim. Acta*. 51: 5478-5486.
 14. Zhao, Y., Gao, Y., Zhan, D., Liu, H., Zhao, Q., Kou, Y., Shao, Y., Li, M., Zhuang, Q. & Zhu, Z. (2005) Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode. *Talanta*. 66: 51-57.

*** Información de contacto:**

Doctora Beatriz López-Ruiz.

Sección Departamental de Química Analítica.

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Avda. Complutense, s/n. 28040, Madrid.

Email: bealopru@quim.ucm.es