



Universidad de Valladolid

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Química

ACTIVIDAD ELECTROQUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Autora: Andrea Gregorio Castaño

Tutoras: Romana Sokolová y Laura Toribio.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi tutora Romana Sokolová por toda la ayuda que siempre me ha ofrecido y a todos mis compañeros del instituto J. Heyrovsky en Praga que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y apoyarme. También al instituto por permitirme realizar allí mis prácticas y mi trabajo.

También a Laura Toribio por todos los consejos para llevar a cabo este trabajo lo mejor posible.

Y por supuesto a mis padres, ya que sin ellos no hubiese sido posible mi estancia en Praga y por el apoyo que me han dado a lo largo de toda la carrera.

INDICE

Agradecimientos.....	2
Abstract	4
1. Introducción	5
1.1. Compuestos naturales estudiados	5
1.1.1. Quinina	5
1.1.2. Luteolin-7-O-Glucosido	7
1.2. Métodos analíticos	9
1.2.1. Voltamperometría cíclica	9
1.2.2. Espectroelectroquímica UV-Vis.	13
1.2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	15
1.2.4. Culombimetría.....	17
2. Objetivo del estudio	18
3. Materiales y métodos utilizados	19
3.1. Reactivos	19
3.2. Instrumentación y procedimiento.....	20
3.2.1. Voltamperometría cíclica	20
3.2.2. Culombimetría.....	21
3.2.3. Espectroelectroquímica Ultravioleta-Visible.....	22
3.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos alineados (HPLC-DAD)	23
4. Resultados	25
4.1. QUININA	25
4.1.1. Voltamperometría cíclica	25
4.1.2. Espectroelectroquímica UV-Vis.	33
4.1.3. Culombimetría.....	35
4.1.5. Cromatografía líquida de alta resolución.	36
4.2. LUTEOLIN-7-O-GLUCOSIDO	45
4.2.1. Voltamperometría cíclica	45
4.2.2. Espectroelectroquímica UV-Vis.	55
4.2.4. Culombimetría.....	58
4.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución.	59
5. Conclusión	66
6. Referencias	70

Abstract

The oxidation of quinine ((*R*)-[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-ethenyl-1-azabicyclo[2.2.2]octan-2-yl]-(6-methoxyquinolin-4-yl)methanol) and luteolin-7-*O*-glucoside (3',4',5-trihydroxyflavona-7-*O*-glucoside) has been studied. These natural compounds have bioactive activities: quinine has analgesic, antiseptic and muscle relaxant properties and luteolin-7-*O*-glucoside has a potentially positive effect against certain diseases like some forms of cancer and coronary heart disease and exhibits antioxidant, anti-inflammatory and anti-hepatotoxic properties.

This work was focused on the determination of oxidation mechanism of both compounds; quinine and luteolin-7-*O*-glucoside. The oxidation and degradation processes of compounds were studied in aqueous buffered media by electroanalytical techniques, molecular absorption spectrophotometry and chromatographic techniques. The oxidation mechanism involves electron transfer coupled with proton transfer and other following chemical reactions and it is influenced by the acid base properties of both studied compounds. The distribution of oxidation products of these compounds was monitored by HPLC-DAD.

Se ha realizado un estudio sobre la oxidación de la quinina ((*R*)-[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-ethenyl-1-azabicyclo[2.2.2]octan-2-yl]-(6-methoxyquinolin-4-yl)metanol) y del luteolin-7-*O*-glucosido (3',4',5-trihydroxyflavona-7-*O*-glucósido). Estos compuestos naturales son bioactivos, la quinina tiene propiedades analgésicas, antisépticas y relajantes musculares y el luteolin-7-*O*-glucosido tiene un efecto potencialmente positivo contra ciertas enfermedades como algunas formas de cáncer y enfermedades coronarias, además muestra propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anti hepatotóxicas.

Este trabajo se ha centrado en la determinación de los mecanismos de ambos compuestos, la quinina y el luteolin-7-*O*-glucosido. Los procesos de oxidación y degradación de estos compuestos han sido estudiados utilizando técnicas electroanalíticas en medio acuoso tamponado, espectrofotometría de absorción molecular y técnicas de separación cromatográficas. El mecanismo de oxidación implica la transferencia de electrones acoplada a la transferencia de protones y otras reacciones químicas, y está influenciado por las propiedades acido-base de los compuestos estudiados. La distribución de los productos de oxidación fue monitorizada mediante HPLC-DAD.

1. Introducción

1.1. Compuestos naturales estudiados

1.1.1. Quinina

La **quinina** o **chinchona** ((*R*)-[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-ethenyl-1-azabicyclo[2.2.2]octan-2-yl]-(6-methoxyquinolin-4-yl)metanol), es un alcaloide vegetal con uso medicinal que tiene propiedades analgésicas, antisépticas y relajantes musculares, que se consideraron efectivas como terapia adicional para el síndrome de inmunodeficiencia adquirida¹, neurodermatitis, rinitis perenne y otras enfermedades^{2,3} virales. La quinina es producida por algunas especies del género *Cinchona*.

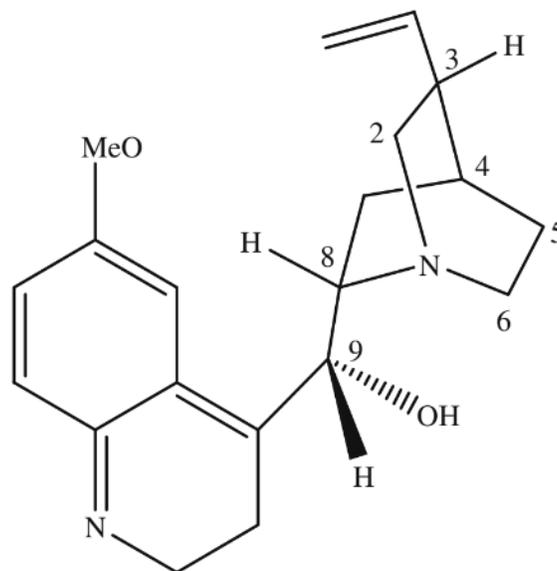


Figura 1. Estructura química de la quinina.

La quinina fue utilizada por primera vez para tratar la malaria en Roma en 1631. El mecanismo de reacción anti malaria se debe al compuesto estable que forma la quinina con el ADN en el Plasmodium (genero de protistas, parásito, que infecta a los humanos la malaria, entre otras enfermedades)⁴. De esta forma bloquea la replicación del ADN del Plasmodium y la transcripción del ácido ribonucleico, y, en consecuencia, tiene efectos curativos. La quinina era el principal compuesto empleado en el tratamiento de la malaria hasta que fue sustituido por otros medicamentos sintéticos más eficaces, como la

quinacrina, cloroquina y primaquina. La quinina se puede utilizar todavía en el tratamiento de la malaria resistente.

También se intentó utilizar para tratar pacientes infectados con priones, pero con un éxito limitado. Es un compuesto empleado frecuentemente en la adulteración de la heroína.

Fue encontrado eficaz como terapia adicional para el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, y para la neurodermatitis⁵. Tiene un sabor muy amargo. Es un estereoisómero de la quinidina. Si se toma en exceso, puede inducir efectos secundarios; las manifestaciones clínicas de la sobredosis incluyen problemas gastrointestinales, perturbaciones visuales, efectos sobre el sistema nervioso central, y arritmias cardíacas⁶.

En los últimos años, la quinina ha sido ampliamente usada en la industria, en farmacología, bioquímica, y así sucesivamente. Primero, debido a los cuatro centros quirales (átomos de carbono en el tercera, cuarta, octava y novena posición, tal y como se señala en la figura 1) en la molécula, la quinina puede actuar como un ligando quiral y un catalizador en síntesis enantioselectivas⁷. Además, el clorhidrato de quinina o el sulfato de quinina han sido utilizados ampliamente en la industria cosmética (champú) y en bebidas gaseosas, especialmente como agente aromatizante⁸.

Varias técnicas han sido desarrolladas para la determinación cuantitativa de la quinina en bebidas, plasma, orina humana, fluidos biológicos, o drogas incluyendo productos no acuosos⁹, quimioluminiscencia¹⁰, isotacoforesis¹¹, fluorodensitométrica¹², y fluorimetría¹³⁻¹⁵, directa^{16,17} e indirecta^{8,18,19} fotometría y cromatografía^{20-21 22 23}.

Un artículo publicado recientemente, en el que se determina quinina en refrescos utilizando voltamperometría diferencial de impulsos (VDP)²⁴, muestra la actividad electroquímica de la quinina. Se usó una disolución BRB (compuesta por ácido fosfórico, ácido acético y ácido bórico) tampón de pH 7.96 y un electrodo de grafito lápiz (PGE). El valor del límite de detección (LOD) que se obtuvo fue $2 \cdot 10^{-7}$ M. Los voltamperogramas cíclicos muestran que al aumentar los valores de pH se produce un desplazamiento del potencial de pico de oxidación (E_p^a) hacia valores menos positivos, lo que significa que los protones son parte de la reacción del electrodo. Los autores sugieren que el número de electrones que se transfieren es igual 1.

En otro estudio analítico, se determinó quinina usando voltamperometría cíclica en un electrodo de platino modificado por polipirrol-pentacianoferrato²⁵. El límite de detección fue $1.08 \cdot 10^{-5}$ M.

También se ha utilizado el electrodo de carbono vitrificado modificado por polímero, p-(AHNSA)/GCE, (poli(4-amino-3-hidroxi-naftaleno ácido sulfónico)/ electrodo de carbono vitrificado modificado) para la detección electroquímica de quinina en formulaciones farmacéuticas y de orina humanas²⁶. En este estudio se empleó voltamperometría cíclica de onda cuadrada y se observó que la quinina muestra una respuesta más alta en el electrodo modificado comparado con los electrodos de carbono vitrificado sin activar y activados en la solución tampón fosfato de pH 7.0. Utilizando voltamperometría cíclica se descubrió que se trata de un proceso controlado por adsorción, puesto que el pico de corriente es proporcional a la velocidad de barrido en un rango de 0.1-3 V/s. Esto fue utilizado para acumular compuesto en la superficie del electrodo para obtener un límite de detección bajo. El valor obtenido del límite de detección (LOD) fue $1.42 \cdot 10^{-8}$ M. En este estudio se sugiere que son dos electrones y dos protones los que participan en la oxidación.

1.1.2. Luteolin-7-O-Glucosido

El **luteolin-7-O-glucosido** es un flavonoide que pertenece al grupo de las flavonas. Es un derivado glucósido de la luteolina. El luteolin-7-O-glucósido ha sido identificado en las hojas y flores de diente de león²⁷.

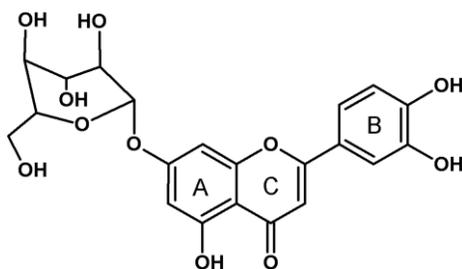


Figura 2. Estructura química del Luteolin-7-O-Glucosido.

La luteolina y sus glucósidos son responsables del color amarillo de varias plantas, por ejemplo: Reseda luteola L., que se usó como colorante amarillo natural para teñir textiles desde la antigüedad²⁸. Los tintes amarillos flavonoides utilizados para colorear tapices antiguos se extrajeron de las bayas de algunas especies de Rhamnus y de la corteza de quercitron (Quercus velutina L.), importado de América del Norte²⁹ o de Alnus jorullensis y salvia sagittata.

Estos compuestos pertenecen a un grupo más genérico denominado polifenoles, que engloba a un gran grupo de compuestos relacionados estructuralmente, y ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son componentes muy importantes de los alimentos estando presentes en muchos productos naturales, principalmente en frutas y verduras que contribuyen a su sabor y color³⁰. La familia de los flavonoides es una forma ubicua de polifenol que los humanos ingieren con una dieta regular. Hasta la fecha, se han identificado más de 4.000 compuestos flavonoides individuales. Los flavonoides en las plantas suelen estar presentes en forma de glucósidos, aunque también se encuentran como agliconas.

Existe un interés creciente en el estudio de los polifenoles debido a su efecto potencialmente positivo contra ciertas enfermedades. Principalmente algunas formas de cáncer y enfermedades coronarias. El efecto se atribuye a la inhibición de determinadas enzimas, y a la actividad antioxidante, protección vascular, antihepatotóxico, antialérgico, antiproliferativo, propiedades antiosteoporóticas y antiinflamatorias^{31,32}.

El mecanismo de oxidación de los polifenoles y su estabilidad en solución depende del pH^{33,34}. La ruta de oxidación de los compuestos hidroxilados viene dada por la distribución de varias formas de disociación en disolución³⁵⁻³⁹. Las vías de oxidación de los compuestos hidroxilados se parecen al “*scheme carre*”. Este esquema fue publicado por Jacq J. para reacciones de reducción⁴⁰, el cual asume que las reacciones de protonación son mucho más rápidas que los procesos de transferencia de electrones. De la misma forma, la oxidación se acopla a la transferencia de protones³⁷ como se muestra en la Figura 3.

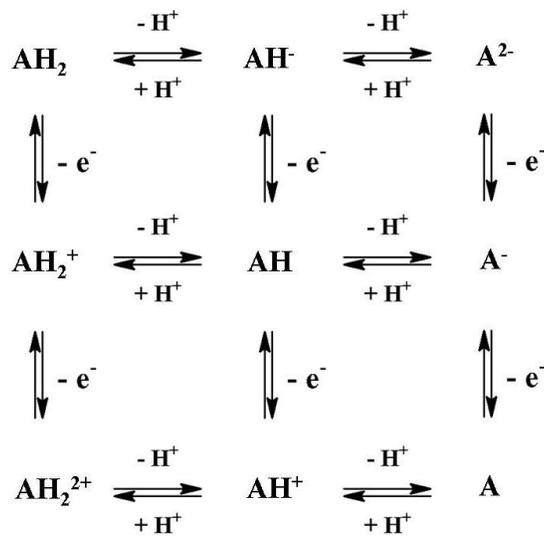


Figura 3. Esquema cuadrado para la oxidación.

Para la caracterización de sus propiedades redox, se requiere el conocimiento de la constante de disociación de estos compuestos; sin embargo, su determinación correcta está relacionada con el problema de la mala estabilidad de sus disoluciones en presencia del oxígeno del aire^{41,42}.

En general, existe un gran interés en el estudio de las propiedades redox de los flavonoides debido a las ya comentadas propiedades beneficiosas para la salud.

El mecanismo de oxidación del Luteolin-7-O-glucosido no se ha estudiado todavía, por tanto, para iniciar su estudio se ha tenido en cuenta lo ya publicado respecto a la actividad electroquímica de compuestos parecidos al Luteolin-7-O-glucosido.

En los artículos publicados hasta ahora, el mecanismo de oxidación del luteolin no se ha elucidado completamente. Sin embargo, Liu et al.⁴³ describió la oxidación a pH = 4 involucrando dos electrones y dos protones. Filipiak⁴⁴ realizó voltamperogramas cíclicos en diferentes tampones y se encontró que el potencial de oxidación depende del pH de la disolución. También se ha descrito la participación de protones en el proceso de oxidación de polifenoles e hidroquinonas^{37,45-50}.

En varios estudios, se ha encontrado que la oxidación electroquímica del anillo de catecol en la molécula del luteolin incluye la participación de dos electrones y dos protones, y conduce a la formación del derivado de la o-quinona⁵¹⁻⁵⁴. También utilizando métodos enzimáticos y espectroscópicos se ha mostrado que en la oxidación de la quercetina y otros compuestos fenólicos interviene un electrón,⁵⁵⁻⁵⁷. Y además pueden tener lugar, varias reacciones químicas posteriores como la hidroxilación o la dimerización^{45,52,53,55,57}.

1.2. Métodos analíticos

1.2.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica que mide la corriente que se produce en una celda electroquímica cuando se aplica un barrido de potencial en el electrodo de trabajo, en condiciones estacionarias; es decir, sin agitación. El barrido de potencial tiene forma triangular, de tal manera que el potencial varía desde un valor inicial (E_i) hasta un vértice y seguidamente se hace un barrido inverso

llegando hasta un valor de potencial que habitualmente es igual al inicial. La intensidad de corriente que se produce se representa en función del potencial aplicado y la curva i-E obtenida se le denomina voltamperograma cíclico.

El potencial del electrodo de trabajo es medido a través del electrodo de referencia que mantiene constante su potencial, y el potencial del electrodo de trabajo varía de forma triangular como se muestra en la Figura 4⁵⁸. De manera que inicialmente el barrido va aumentando hacia potenciales mayores, empezando por un potencial menor (a) y terminando en un potencial mayor (d), en el caso de la oxidación y, en el caso de la reducción, al contrario.

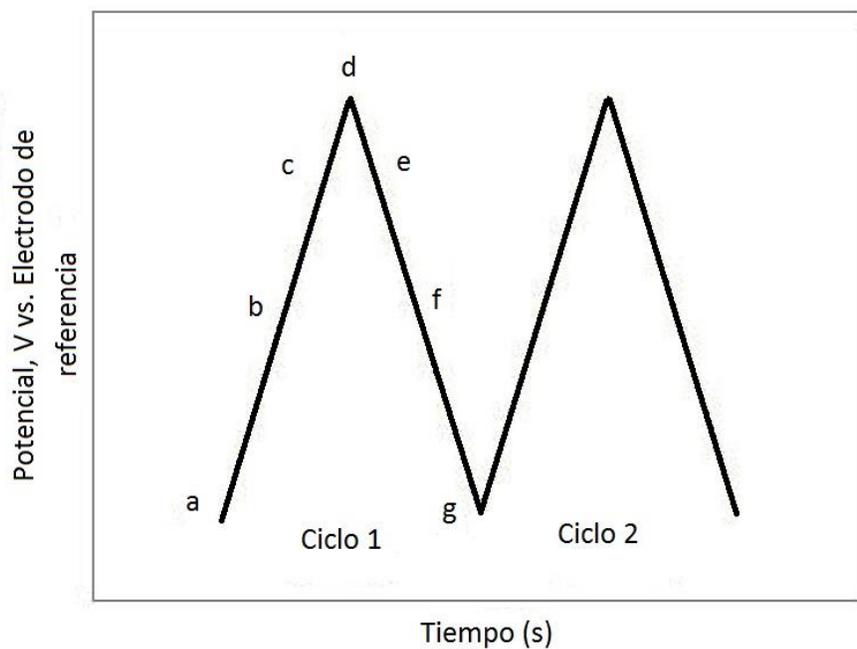
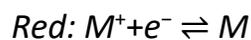
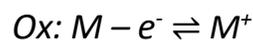


Figura 4. Dependencia del potencial aplicado con el tiempo.

Se obtiene un voltamperograma cíclico midiendo la corriente en el electrodo de trabajo durante los barridos de potencial⁵⁹. La Figura 5 muestra un voltamperograma cíclico resultante de una reacción redox electrónica. Considerando la siguiente reacción reversible:



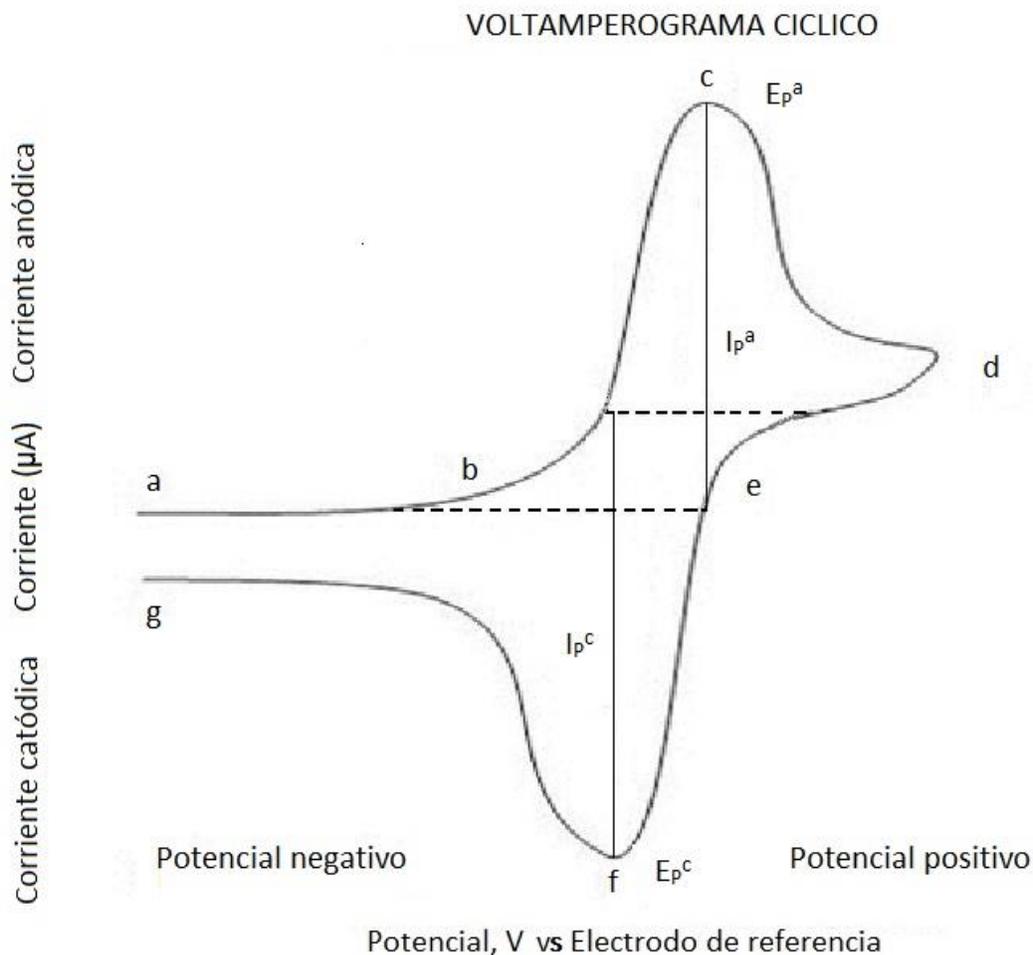


Figura 5. Voltamperograma de una reacción de oxidación-reducción electrónica.

En la Figura 5, el proceso de oxidación se produce a partir de (a) el potencial inicial hasta (d) el potencial de conmutación. En esta región el potencial se escanea positivamente para causar una oxidación. La corriente resultante se denomina corriente anódica (I^a). El pico de corriente anódica (I_p^a) es proporcional a la concentración del compuesto oxidado. El potencial de pico correspondiente se mide en (c), y se denomina potencial de pico anódico (E_p^a). Después de que se haya alcanzado el potencial de conmutación (d), el potencial escanea negativamente de (d) a (g). Esto da lugar a la corriente catódica (I^c) y a la reducción. El pico de corriente catódica (I_p^c) también es directamente proporcional con la concentración del compuesto. El potencial del pico en (f) se denomina potencial de pico catódico (E_p^c).

Para poder calcular los picos de corriente hay que restar a los máximos correspondientes el valor de la corriente de la base, respectivamente.

$$I_p^{a/c} = I_p^{\max} - I_{\text{base}}$$

La instrumentación utilizada para la voltamperometría cíclica consiste en una celda electroquímica, un potencióstato, un convertidor de corriente a voltaje y un sistema de adquisición de datos. La celda electrolítica consiste en un electrodo de trabajo (WE), un electrodo auxiliar (CE), un electrodo de referencia (RE) (Figura 6) y una disolución electrolítica. El orden de la superficie del electrodo de trabajo es de milímetros y por ello la cantidad de sustancia que se oxida o reduce es muy pequeña.

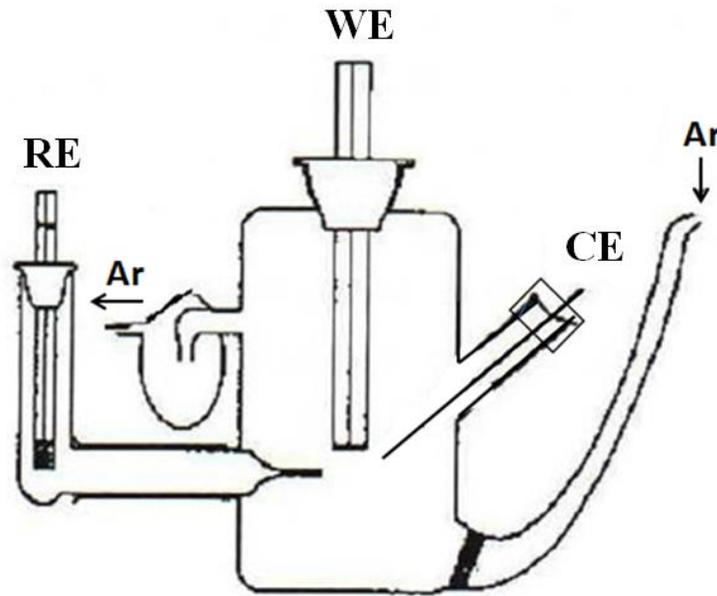


Figura 6. Celda electroquímica con los electrodos.

El objetivo de la disolución electrolítica es proporcionar iones a los electrodos durante la oxidación y reducción. Un potencióstato es un dispositivo electrónico que usa una fuente de alimentación de corriente continua para producir un potencial que se puede mantener y determinar con precisión. El convertidor de corriente a tensión mide la corriente resultante, y el sistema de adquisición de datos produce el voltamperograma resultante.

La voltamperometría cíclica puede ser usada para el estudio cualitativo de procesos electroquímicos bajo diversas condiciones, así como para determinar la presencia de intermedios en reacciones de oxidación-reducción, o la reversibilidad de la reacción. También puede ser utilizada para determinar la transferencia electrónica de un sistema, el coeficiente de difusión de un analito, y el potencial formal de reducción, el cual puede ser utilizado como una herramienta de identificación. Debido a que la corriente es proporcional a la concentración puede ser determinada mediante la generación de una curva de calibrado de corriente frente a concentración.

1.2.2. Espectroelectroquímica UV-Vis.

La espectroscopia ultravioleta-visible se refiere a la espectroscopia de absorción o de reflectancia en parte de la región ultravioleta y en las regiones espectrales visibles adyacentes. La absorción o reflectancia de radiación en el rango visible afecta directamente al color percibido de los productos químicos involucrados. En esta región del espectro electromagnético, los átomos y las moléculas experimentan transiciones electrónicas⁵⁸.

El equipo utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible es un espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I_0); y el valor de absorbancia se relaciona con la concentración de analito en la muestra a través de la ley de Lambert-Beer.

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de radiación (a menudo una lámpara de filamento incandescente de wolframio para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la radiación, y un detector. El detector suele ser un fotodiodo o un detector de dispositivo acoplado de carga (CCD).

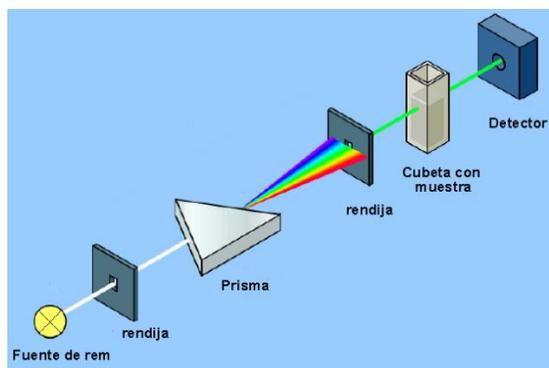


Figura 7. Espectrómetro.

La Espectroelectroquímica permite obtener y analizar la respuesta espectral, de la capa de disolución cercana al electrodo de trabajo (capa de difusión), durante cualquier proceso electroquímico. Si el rango espectral estudiado está dentro de la región ultravioleta-visible, se hablará de Espectroelectroquímica UV-Vis. De esta manera es posible registrar el espectro de absorción molecular durante la oxidación o reducción de un compuesto en el electrodo de trabajo. Es una técnica muy útil para estudiar los procesos electrónicos a través de reactivos, productos o intermedios que absorban en la región UV-Vis. En cuanto a la instrumentación, es necesario utilizar una celda espectroelectroquímica, y que haya una buena sincronización entre el potencióstato y el espectrofotómetro para saber en todo momento a qué valor de potencial corresponde el espectro que se está registrando. Por otro lado, el tiempo de respuesta en el detector debe ser el adecuado para registrar espectros a velocidad lo suficientemente elevada; por ello el detector suele ser una batería de diodos.

La radiación, partiendo desde el exterior de la celda, incide perpendicularmente sobre el electrodo, atraviesa la capa de difusión y la disolución del electrolito. Finalmente vuelve a salir de la celda y se detectan los cambios de absorbancia provocados por la variación en la concentración y debidos a la desaparición o generación de especies cromóforas. Para ello es necesario utilizar un electrodo ópticamente transparente.

En este trabajo se ha utilizado una celda espectroelectroquímica con electrodo de capa fina ópticamente transparente (OTTLE, Specac UK). El sistema estaba compuesto de tres electrodos, el electrodo auxiliar y el de trabajo eran de platino y el electrodo de referencia de Ag|AgCl.



Figura 8. Celda espectroelectroquímica.

1.2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación cromatográfica que se caracteriza porque la fase móvil es líquida. El principio de separación se basa en la diferente afinidad, de los componentes de la muestra, por la fase estacionaria y fase móvil usadas en la separación.

La HPLC de fase inversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía son las constituidas por grupos alquilo tales como $C_{18}H_{37}$ (C18) o C_8H_{17} (C8), fijados a un soporte sólido inerte (sílice). El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El esquema de un equipo de HPLC se muestra en la Figura 9 y consta de las siguientes partes:

- El desgasificador se utiliza para eliminar el posible oxígeno disuelto en los disolventes y evitar así la formación de burbujas que darían lugar a variaciones en el flujo e interferirían en el proceso de separación.
- El inyector de muestra introduce la muestra en el sistema y la fase móvil la lleva a la columna, normalmente se utilizan válvulas Rheodyne de seis vías.
- Las bombas impulsan la fase móvil con una determinada composición y a un determinado flujo, a través de la columna; por lo general se utilizan bombas de doble pistón para evitar

pulsaciones en el flujo que darían lugar a fluctuaciones en el detector y distorsionarían la línea de base. Algunos modelos de bombas de HPLC pueden mezclar múltiples solventes en proporciones que cambian en el tiempo, generando un gradiente de composición en la fase móvil.

- El detector genera una señal proporcional a la concentración de analito en la muestra y que emerge de la columna, lo que permite el análisis cuantitativo de los componentes de muestra. Algunos de los detectores de uso más común, son los detectores de UV-Vis, detectores de matriz de fotodiodos (PDA) o los basados en espectrometría de masas.
- Un microprocesador digital y un software controlan el equipo y proporcionan el análisis de los datos.
- La mayoría de los equipos de HPLC cuentan con un horno de columnas, que permite fijar la temperatura a la cual se realiza la separación.

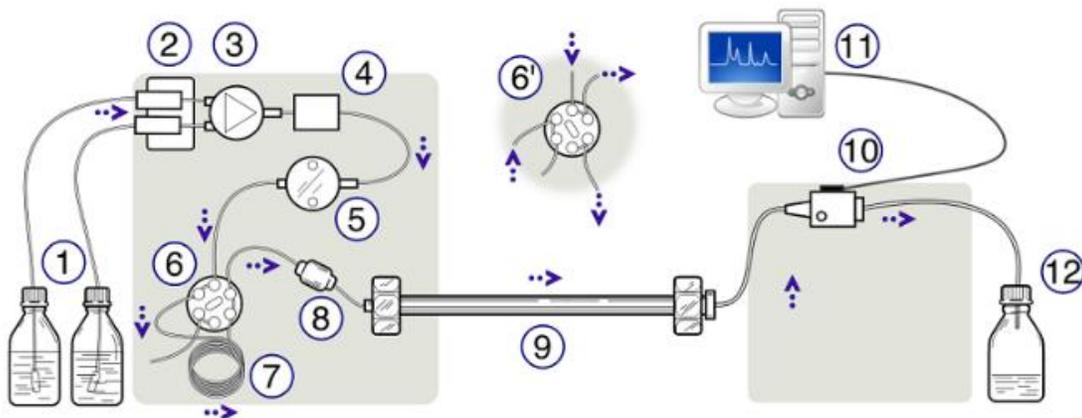


Figura 9. Esquema de un equipo HPLC. (1) Disolventes, (2) desgasificador de los disolventes, (3) válvula de gradiente, (4) mezclador de fase móvil, (5) bomba de alta presión, (6) válvula en posición de inyección, (6') válvula en posición de descarga, (7) bucle del inyector de muestra, (8) pre-columna, (9) columna analítica, (10) detector, (11) software para la adquisición de datos (12) colector de residuos.

1.2.4. Culombimetría

En los métodos culombimétricos se mide la cantidad de electricidad (expresada en culombios) necesaria para producir una transformación cuantitativa de una sustancia (oxidación o reducción). Utiliza corriente eléctrica directa (DC;) para provocar reacciones químicas no espontaneas; y es comercialmente importante como una etapa en la separación de elementos de fuentes naturales tales como minerales.

Se puede diferenciar entre dos técnicas culombimétricas: la potencioestática y la amperostática. En la primera, el potencial del electrodo de trabajo se mantiene constante en un valor determinado, al cual se produce la oxidación o reducción cuantitativa del analito sin que interfieran otros componentes de la muestra. En la segunda lo que se mantiene constante es la intensidad de corriente.

En cuanto a la instrumentación, se necesita una celda de electrólisis, un potencioestado (para mantener un potencial constante en el electrodo de trabajo) y un dispositivo integrador para calcular la carga transferida. Habitualmente se utiliza una celda con tres electrodos. El electrodo auxiliar se encuentra en el compartimento catódico y está separado por un plato poroso del compartimento anódico, donde se encuentran el electrodo de trabajo y el de referencia. La superficie del electrodo de trabajo es grande y se suele trabajar con agitación.

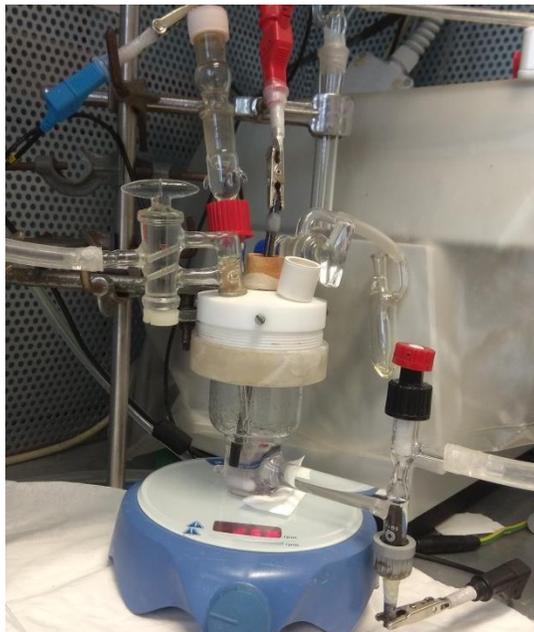


Figura 10. Celda electrolítica.

2. Objetivo del estudio

El objetivo principal de este trabajo es el estudio electroquímico de dos compuestos bioactivos naturales seleccionados, quinina y luteolin-7-O-glucosido.

Más concretamente, se estudiará el proceso de oxidación electroquímica de los compuestos antes mencionados ya que, hasta ahora en los trabajos publicados, todavía no se ha llegado a conclusiones claras. Para llevar a cabo este estudio se utilizarán diferentes técnicas de análisis como son las técnicas electroquímicas, las espectrofotométricas y las cromatográficas.

3. Materiales y métodos utilizados

3.1. Reactivos

Los compuestos estudiados han sido:

- **Quinina** ($C_{20}H_{24}N_2O_2$, *fig. 1*; Sigma-Aldrich, Praga, Republica Checa)
- **Luteolin 7-O-glucosido** ($C_{21}H_{20}O_{11}$, *fig.2*; Sigma-Aldrich, Praga, Republica Checa)

Para la realización de las **voltamperometrías cíclicas**, el electrolito utilizado varía dependiendo del compuesto estudiado. Se utilizaron tampones de diferentes pH pero constituidos por las mismas disoluciones, siendo una de ellas una disolución acida (BRB, Britton-Robinson Buffer) 0.04M compuesta por tres reactivos ácidos todos en la misma proporción: ácido fosfórico (H_3PO_4 ; Sigma-Aldrich, Praga, Republica Checa), ácido acético (CH_3COOH ; Lachema, Brno, Republica Checa) y ácido bórico (H_3BO_3 ; 99.5% Sigma-Aldrich, Praga, Republica Checa), y la otra disolución es una básica 0.2M de hidróxido de sodio (NaOH; Lachema, Brno, Republica Checa). Estos tres ácidos, debido a sus diferentes pK, forman diferentes sales y gracias a esto cubre un rango muy grande de valores de pH. En el caso del Luteolin-7-O-glucosido a estos tampones usados de electrolitos se le añadía la misma cantidad de etanol (C_2H_5OH ; 96% ADR/RID Lachner Company).

Para el estudio de **espectroelectroquímica UV-Vis** se utilizó una disolución 0.1M de cloruro de potasio (KCl; Lachema, Brno, Republica Checa) y Argón (Ar; Messer technogas, Praga, Republica Checa). Para limpiar esta celda se utilizó agua, etanol (C_2H_5OH ; 96% ADR/RID Lachner Company), acetonitrilo (CH_3CN ; anhídrido 99.8%, Sigma-Aldrich, Praga, Republica Checa) y una disolución de acetonitrilo y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBAPF₆; Sigma-Aldrich, Praga, Republica Checa).

Los eluyentes utilizados en el **análisis cromatográfico (HPLC)** fueron una disolución al 0.1% de ácido fosfórico (H_3PO_4 ; Sigma-Aldrich, Praga, Republica Checa) en agua y acetonitrilo.

En la realización de la **culombimetría** el electrolito utilizado fue una disolución 0.1M de cloruro de potasio (KCl; Lachema, Brno, Republica Checa) y una disolución 4mM de hidróxido de potasio (KOH; Lachema, Brno, Republica Checa).

3.2. Instrumentación y procedimiento.

3.2.1. Voltamperometría cíclica

Se utilizó una celda electroquímica de tres electrodos:

- Electrodo de referencia (RE): Ag|AgCl|1M LiCl separado del resto de la disolución por tabique poroso.
- Electrodo de trabajo (WE): de carbono vitrificado de diámetro 0.7 mm. Este tipo de electrodo se utiliza para procesos de oxidación y tiene la ventaja de tener una amplia ventana de potencial, además de la facilidad para renovar la superficie para el intercambio electrónico⁶⁰.
- Electrodo auxiliar (CE): de platino.



Figura 11. Celda electroquímica utilizada en la voltamperometría cíclica.

Todos ellos fabricados por el propio laboratorio del instituto J. Heyrovsky.

Para realizar estas medidas se utilizó un potenciostato AutoLab PGSTAT 30 (Metrohm Switzerland) y el software Nova 2.1.3.

El procedimiento llevado a cabo consistía en someter, primero solo a la disolución del electrolito y después a la disolución junto con el compuesto natural a estudiar, a un barrido de potencial que varía

dependiendo del compuesto, de su concentración y del pH del tampón. Para eliminar el oxígeno disuelto, en primer lugar, la disolución se burbujeaba directamente con Argón. Con el luteolin-7-O-glucosido, al ser la disolución hidroalcohólica (tampón-etanol 1:1), se hacía pasar el argón por el etanol (96%) primero para saturarlo de este y luego por la celda. Después de cada medida, el electrodo de trabajo de carbono vitrificado era limpiado con agua, frotándolo de forma circular en una tela de terciopelo (Buehler, Alemania) en la cual se colocaba óxido de aluminio (III) con agua. A continuación, el electrodo, se aclaraba con agua, se secaba y se volvía a introducir en la celda listo para una nueva medida. Se realizaron experimentos variando la concentración y la velocidad de barrido de potencial. Los datos obtenidos con estos experimentos fueron estudiados con el programa OriginPro8.

3.2.2. Culombimetría

Esta parte experimental, se realizó utilizando una celda con dos compartimentos, anódico y catódico, separados por un plato poroso y el potencióstato utilizado fue PGSTAT 12 AUTOLAB. Además, se realizó de forma simultánea al análisis por HPLC con el fin de determinar los posibles productos de la oxidación de los compuestos.

En el compartimento anódico se encontraban los electrodos de trabajo y de referencia. El electrodo de referencia es el mismo que en el caso de la voltamperometría cíclica y también se encontraba separado del resto de la disolución. En cambio, el electrodo de trabajo se trata de un electrodo pasta de carbono. En el compartimento catódico se encontraba el electrodo auxiliar de carbono. Todos ellos fabricados por el propio laboratorio.

La preparación de la celda fue igual en ambos compuestos. En primer lugar, antes de añadir el compuesto, se pipetea parte del electrolito inerte en el compartimento anódico y se burbujea con argón. Se hace en el anódico ya que el catódico no tiene entrada para el argón. Tras diez minutos aproximadamente burbujeando la disolución, con ayuda de una pipeta se pasa al compartimento catódico. El resto de la disolución se introduce en el compartimento anódico y se vuelve a burbujear con argón, de esta forma tenemos la disolución en una atmosfera inerte en ambos compartimentos. Tras esto ya se puede añadir el compuesto y empezar con las medidas.

3.2.3. Espectroelectroquímica Ultravioleta-Visible.

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis-modelo Agilent 8453 de matriz de diodos y una celda espectro electroquímica de capa delgada con electrodo de capa fina ópticamente transparente (OTTLE, Specac UK)

- Quinina:

Se preparó la disolución en ausencia de oxígeno. Para conseguir esto, se pesó y se introdujeron en un vial 0.51mg de quinina, se tapó el vial y se inyectó argón. En otro vial se pipeteó 8 mL una disolución de KCl 0.1M, se tapó y se inyectó argón. Tras unos minutos, ambos viales se conectaron con una aguja y debido a la presión que ejercía el argón sobre la disolución, 3mL de la disolución pasaron a través de la aguja, hasta el vial con el compuesto, disolviéndolo. De esta forma el oxígeno no interviene ni contamina la muestra. La concentración de la quinina fue de 0.5mM.

A continuación, se inyectó en la celda espectroelectroquímica la disolución de 0.5mM, ésta se colocó en el espectrómetro y se midió su espectro UV-Vis; habiendo realizado previamente un blanco con agua.

A continuación, se realizó una voltamperometría cíclica, con un rango de potencial entre 0.2V a 1.1V y una velocidad de barrido de 5mV/s, a la vez que se registraba el espectro UV-Vis.

Después de cada medida, se realizó una limpieza química de la celda; para ello se utilizó agua, etanol, acetonitrilo. Cada disolvente se inyectó de manera individual con una jeringuilla, y en una cantidad de 0.5 mL. Para terminar la limpieza de la celda se utiliza una disolución 0.1M de acetonitrilo y TBAPF₆ (hexafluorofosfato de tetrabutilamonio) que se coloca la celda en el espectrómetro y se impone un potencial reductor. De esta forma se realiza también una limpieza electroquímica, donde la superficie del electrodo de trabajo se limpia con la formación de H₂ a un potencial negativo, dando lugar a PtH₂ (*platinum black*) en la superficie y después lavándolo con acetonitrilo. Este proceso se repitió varias veces.

Una vez limpiado el sistema, se puede volver a realizar otra medida.

- Luteolin 7-O-Glucosido:

Se prepara una disolución en ausencia de oxígeno de la misma forma que con la quinina. En este caso se utilizó una disolución compuesta por una disolución tampón de pH=4,18 (NaOH 0.2M y BRB 0.04 M) y una disolución de etanol 1:1. La concentración de Luteolin-7-O-glucosido fue 0.7 mM.

La primera medida tomada fue de la disolución tampón junto con el etanol, el blanco.

La limpieza de la celda se realizó de la misma forma que con la quinina.

3.2.4. Cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos alineados (HPLC-DAD)

El equipo de HPLC utilizado fue un Agilent serie 1200; equipado con un desgasificador a vacío, una bomba cuaternaria, un inyector de muestras automático, un detector DAD y un detector de fluorescencia. Para la separación de los compuestos se usaron diferentes columnas, para la quinina se usó una columna C18 (HyPurity C18, 150x3mm), con un tamaño de partícula de 5µm, de Thermo Scientific, (USA, Dubuque), y en el caso del luteolin-7-O-glucosido se usó una columna C8 (HyPurity C8, 150x3mm) también con un tamaño de partícula de 5µm y de Thermo Scientific, (Dubuque USA). En ambos casos, la columna estaba unida a una pre-columna C18 (HyPurity C18, 10x3mm, 5µm, Thermo Scientific, USA, Dubuque). La columna se colocó dentro de un horno termostataado a 20°C. El equipo de HPLC se controló a través del software ChemStation (Agilent OpenLAB CDS Chemstation).

Con este equipo se analizaron muestras de quinina y de luteolin-7-O-glucosido antes y después del proceso de electrolisis.

La composición de la fase móvil y flujo fue diferente según el analito analizado. En la tabla 1 y tabla 2 se muestran los gradientes de elución y flujos utilizados en el análisis de las muestras de quinina y de luteolin-7-O-glucosido, respectivamente. El método usado para el luteolin-7-O-glucosido fue usado previamente en un trabajo publicado para el análisis de los productos de oxidación del luteolin⁶¹, obteniéndose una buena separación por lo que se mantuvo con ligeras modificaciones.

Tabla 1. Método usado para el análisis por HPLC de la quinina. Flujo: 0.600 mL/min.

Time (min)	% ACN	% 0.1% H ₃ PO ₄ /agua
0	5	95
5	5	95
30	50	50
40	70	30
41	100	0
45	100	0
46	15	85

Tabla 2. Método para el análisis por HPLC del luteolin-7-O-glucosido. Flujo: 0.2mL/min.

Time (min)	% ACN	% 0.1% H ₃ PO ₄ /agua
0	5	95
2	5	95
30	60	40
35	100	0
55	100	0
70	5	95
75	5	95
77	5	95

4. Resultados

4.1. QUININA

4.1.1. Voltamperometría cíclica

Se hicieron experimentos cambiando la concentración y a una velocidad constante de barrido y viceversa. También se comparó el comportamiento de la quinina a diferentes pH, pero trabajando a concentración y velocidad de barrido constantes.

En la Figura 12 se observa la dependencia de la velocidad de barrido a una concentración y un pH constante. El potencial de pico que se obtiene con estas medidas es constante al variar la velocidad de barrido. Sin embargo, el pico de corriente (I_p) va aumentando de forma proporcional a la velocidad de barrido.

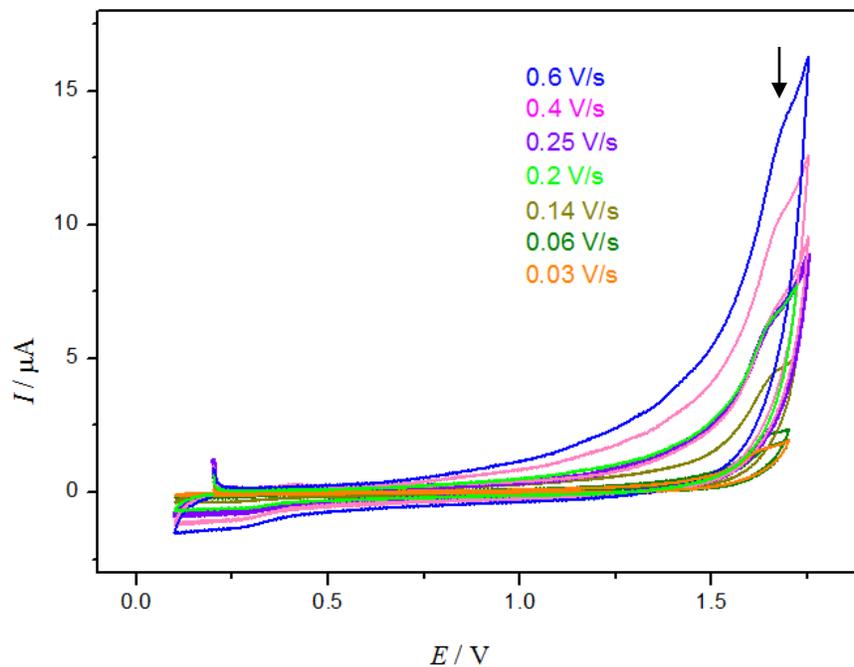


Figura 12. Voltamperograma cíclico de la quinina a diferentes velocidades de barrido a pH=2.1 y concentración 0.2 mM.

Con los voltamperogramas obtenidos a diferentes velocidades de barrido, se obtuvieron tanto las I_p como las E_p . Estos valores son importantes para poder describir el mecanismo de oxidación del compuesto. Si el pico de corriente anódica (I_p^a) aumenta linealmente al aumentar la raíz cuadrada de la velocidad de barrido significa que el proceso de oxidación está controlado por el proceso de difusión. La Figura 13 muestran la dependencia lineal de la intensidad de pico con la velocidad de barrido, en dos disoluciones acidas; como puede observarse hay una dependencia lineal entre I_p y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y además la pendiente es positiva, por tanto se deduce que, en condiciones acidas, la oxidación de la quinina es controlada por el proceso de difusión.

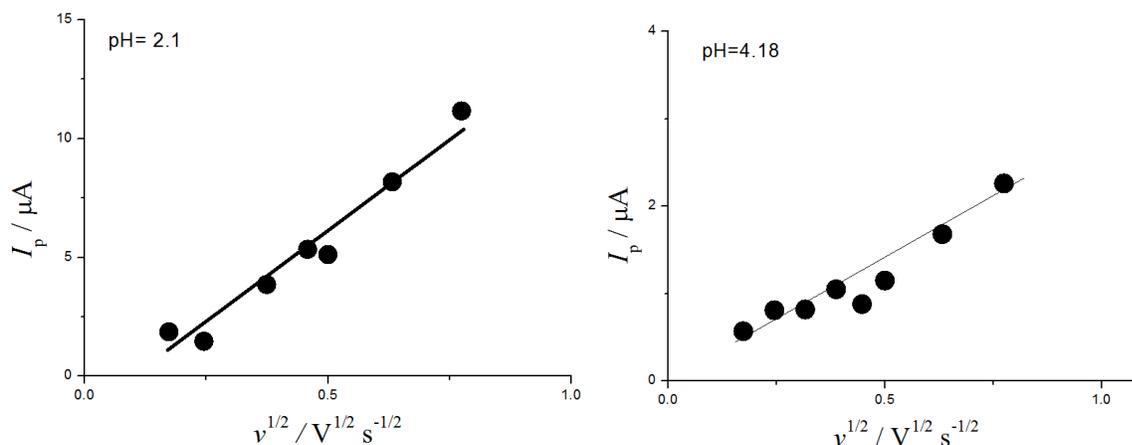


Figura 13. Dependencia de la corriente de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido a $pH=2.1$ y $pH=4.18$ a concentración constante de quinina de 0.2 mM .

En la Figura 14 se muestran los voltamperogramas obtenidos a diferentes concentraciones de quinina, pero a un pH y una velocidad de barrido constantes. Como puede observarse la intensidad de pico aumenta de forma proporcional a la concentración, como cabía esperar.

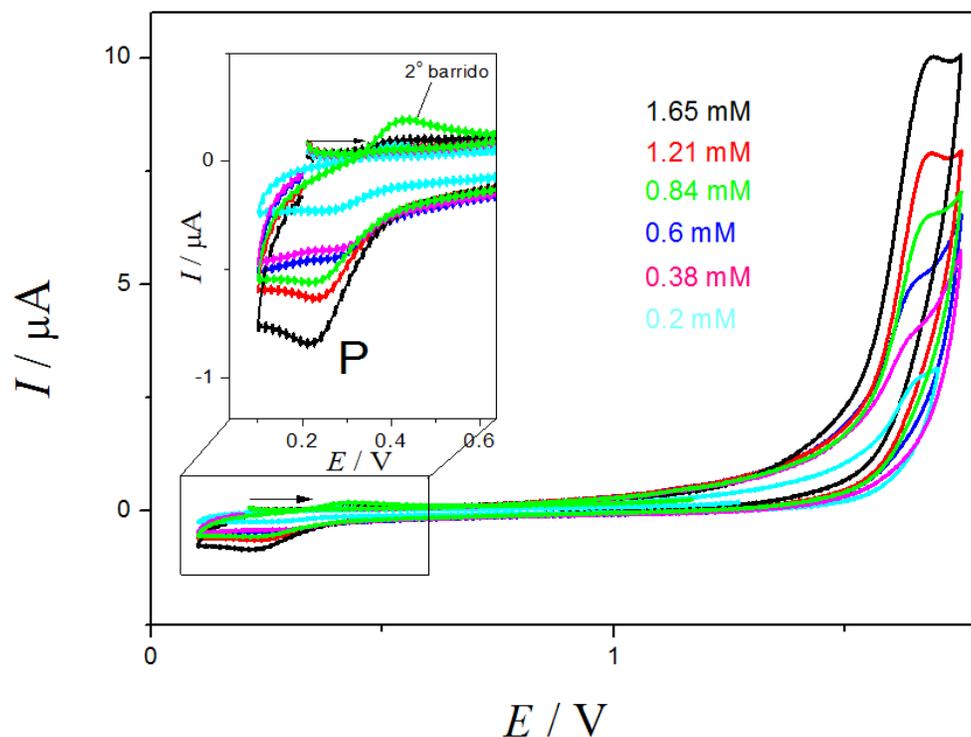
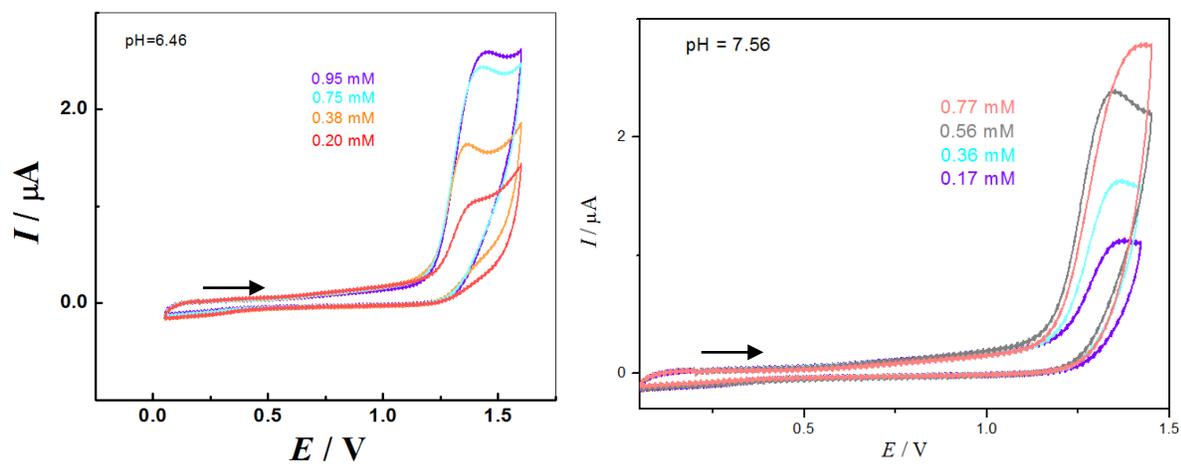


Figura 14. Voltamperograma cíclico a diferentes concentraciones de quinina a $\text{pH}=2.1$ y velocidad de barrido 0.1 V/s .

Durante la oxidación se forma un producto (P). La reducción de este producto se produce sobre 0.23 V , además se trata de una reacción reversible, porque se puede ver un pico que corresponde al pico de oxidación en el segundo barrido.

Cuando se trabajó en medios neutros y básicos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 15 para diferentes concentraciones de quinina.



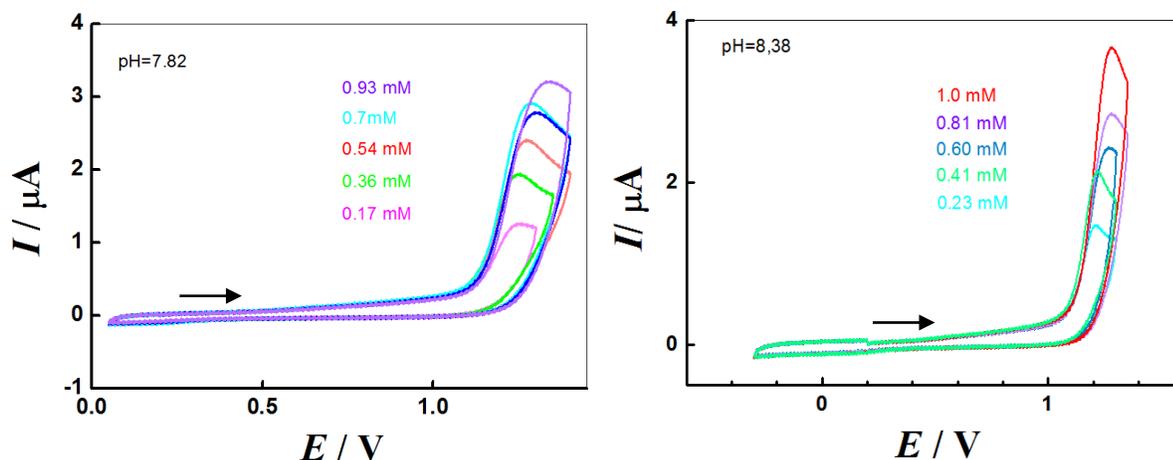


Figura 15. Voltamperogramas cíclicos a pH neutros y básicos a una velocidad de barrido de 0.1V/s cambiando la concentración de quinina.

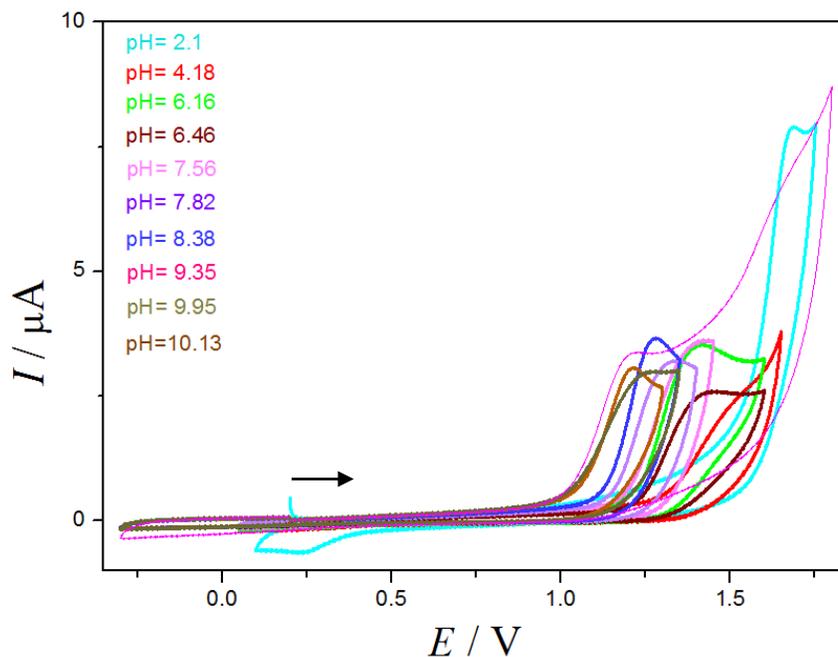


Figura 16. Voltamperograma cíclico a diferentes pH a velocidad de barrido 0.1 V/s a una concentración de quinina constante de 1 mM.

En la Figura 16 se muestra de forma conjunta los resultados obtenidos para los diferentes pH ensayados. Como puede observarse, a medida que aumenta el pH, el potencial de pico (E_p) se desplaza hacia valores mas bajos de potencial, lo que sugiere que el proceso de oxidación es mas fácil en disoluciones alcalinas que en acidas. Esto significa que la oxidación involucra la participación de protones⁶².

En cuanto al producto P, se ha observado que sólo se forma en disoluciones ácidas de pH 2,1 a 6,16. Teniendo en cuenta el diagrama de áreas de predominio ácido-base, para las especies de la quinina (Figura 17), y que el producto P sólo se forma a pH ácidos; se puede deducir que el producto P se forma sólo cuando la molécula protonada de quinina es oxidada, y además este producto es electroactivo. Los cálculos de la deslocalización del orbital HOMO molecular sugieren que el grupo etenilo es el que sufre la oxidación.

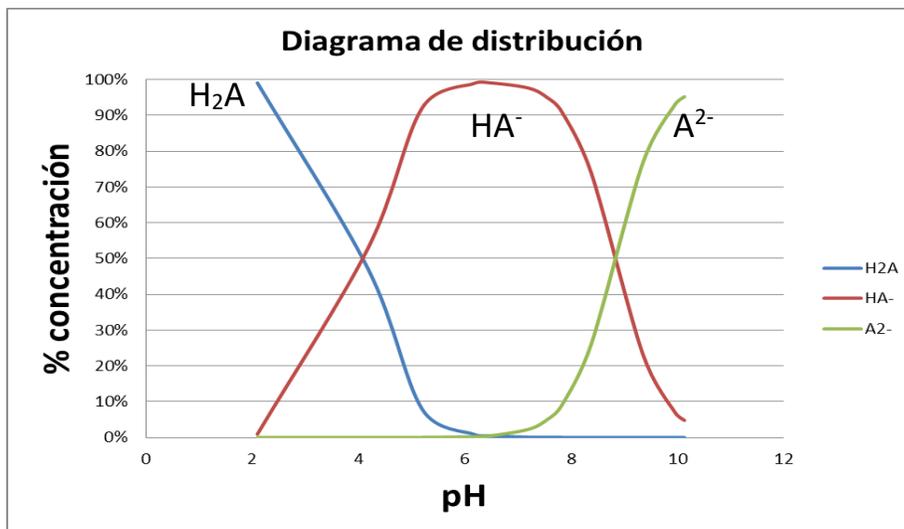


Figura 17. Diagrama de distribución de la quinina.

Dado que la quinina (QN) tiene dos valores pKa, existe predominantemente como catión monoprotonado (QNH⁺) hasta pH=4 y esta forma existe en disolución hasta alcanzar un pH=6.2. Desde pH=4 a pH=9, la forma aniónica está presente en la disolución. Para pH mayores a 9, el dianión es la forma predominante. Como ya se ha comentado anteriormente, también se investigó el efecto del pH de la solución tampón en el potencial de pico de oxidación de QN. El cambio negativo en el potencial de pico de oxidación debido a la variación del pH de la solución ácida a la básica indica la participación de protones en el proceso de oxidación. La relación entre el potencial máximo y el pH fue lineal. El valor de la pendiente sugiere una transferencia de electrones acoplada a protones que implica un número igual de protones y electrones.

El diagrama de distribución de la quinina fue calculado teniendo en cuenta las siguientes ecuaciones:



$$K_1 = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{[H_2A]} \quad c = [H_2A] + [HA^-]$$

$$[H_2A] = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{K_1} \quad [HA^-] = c - [H_2A]$$

$$[H_2A] = \frac{(c - [H_2A]) \cdot [H^+]}{K_1} = \frac{c \cdot [H^+] - [H_2A] \cdot [H^+]}{K_1}$$

$$[H_2A] \cdot K_1 + [H^+] \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]$$

$$[H_2A] \cdot (K_1 + [H^+]) = c \cdot [H^+]$$

$$[H_2A] = \frac{c \cdot [H^+]}{K_1 + [H^+]}$$

$$[HA^-] = c - \frac{c \cdot [H^+]}{K_1 + [H^+]}$$

La dependencia del potencial de pico con el pH es lineal, el valor de la pendiente es igual a 62 mV/pH. Este valor está próximo al valor teórico de 58 mV/pH, lo que puede sugerir que en la oxidación participan el mismo número de electrones y protones. Puede tratarse de una transferencia de 1 electrón/1 protón o 2 electrones/2 protones. Es necesario determinar el número de los electrones que participan en la reacción mediante una electrolisis exhaustiva (Culombimetría). Este número es calculado en el apartado 4.1.3.

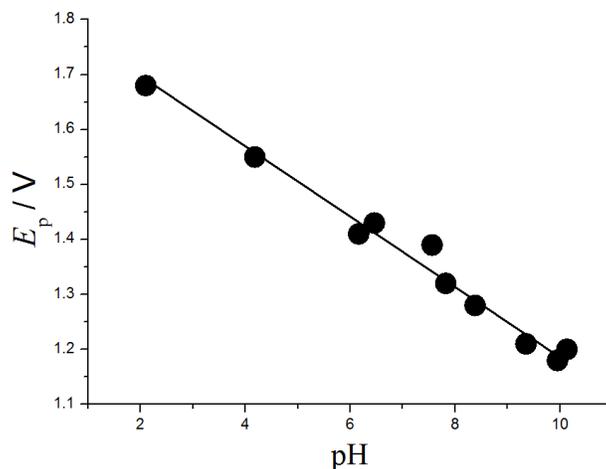


Figura 18. Dependencia del potencial de pico frente al pH.

Anteriormente, se ha deducido que el proceso de oxidación está controlado por difusión, por lo tanto, se puede estudiar el mecanismo de reacción utilizando los datos que se obtuvieron al relacionar el potencial de pico con la velocidad de barrido o la concentración.

La dependencia del potencial de pico (E_p) con la velocidad de barrido puede mostrar si el proceso electrónico es reversible, cuasi reversible o irreversible. Solamente para transferencias electrónicas reversibles E_p no cambia con la velocidad de barrido⁶².

En el caso de la quinina, el potencial de pico aumenta proporcionalmente con la velocidad de barrido. Esto es válido para procesos irreversibles, en el caso de procesos reversibles el potencial de pico se mantiene constante. El aumento proporcional del potencial de pico con la velocidad de barrido también puede ser consecuencia de la participación de una reacción química y coincide con la forma del voltamperograma, donde el pico catódico este desplazado hacia valores más altos de potencial.

En la *Figura 19* se muestran los gráficos obtenidos al representar el potencial de pico frente a la velocidad de barrido trabajando a diferentes pH. Los valores de las pendientes fueron: $\delta E_p / \delta \log v = 24 \text{ mV}$ y 40 mV respectivamente para $\text{pH}=2.10$ y $\text{pH}=4.18$.

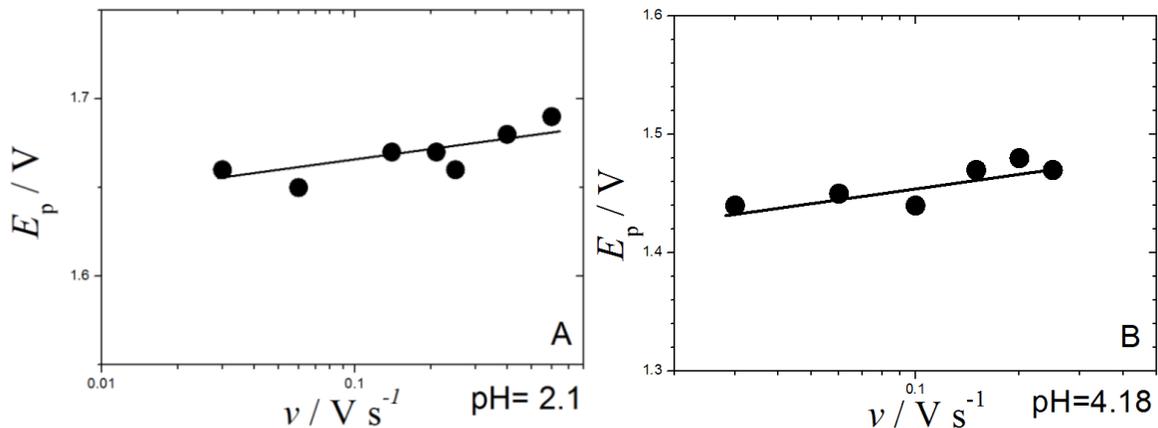


Figura 19. Dependencia de E_p con la velocidad de barrido para A) $\text{pH}=2.10$ y B) $\text{pH}=4.18$.

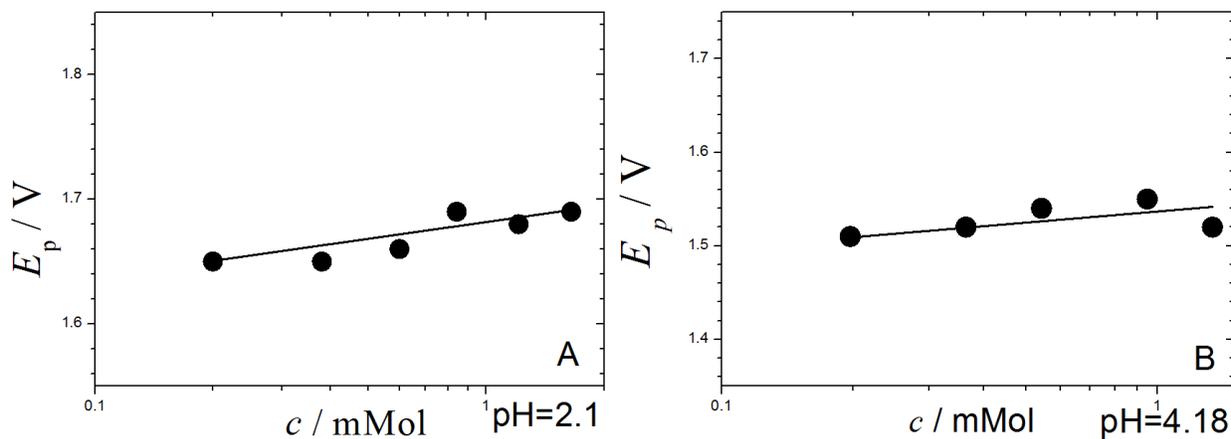


Figura 20. Dependencia del potencial con la concentración a diferentes pH , A) $\text{pH}=2.10$ y B) $\text{pH}=4.18$.

Velocidad de barrido constante de 0.1 V/s .

La dependencia que muestra el potencial de pico (E_p) con la concentración o la velocidad de barrido puede dar información sobre el proceso de transferencia de electrones acoplado a la reacción de oxidación, y determinar el esquema de reacción. Dependiendo del esquema de reacción que se produzca, los valores teóricamente conocidos para la pendiente varían. Unos ejemplos de mecanismos de reacción son: EC (transferencia de electrones - reacción química), ECE (transferencia de electrones - reacción química - transferencia de electrones), CE (reacción química - transferencia de electrones). En el caso de la dependencia del potencial de pico con la concentración (Figura 20) los valores de las pendientes fueron: $\delta E_p / \delta \log c = 50 \text{ mV}$ y 40 mV respectivamente para $\text{pH}=2.10$ y $\text{pH}=4.18$.

El esquema de reacción que mejor explicaría los resultados podría ser el del mecanismo ECE⁶³ ya que los valores teóricos para este mecanismo son: $\delta E_p / \delta \log v$ y $\delta E_p / \delta \log c = 29 \text{ mV}$. Aunque los valores de las

pendientes obtenidas no son tan aproximados al valor teórico, pero esto puede ser debido que para la concentración no se adapte bien, además, la pendiente puede llegar a tener valores más altos de 100mV. Lo más importante es que este valor no sea de 19 mV, ya que eso indicaría que se trata de una dimerización radical. Los valores que más importancia tienen son los relacionados con la velocidad de barrido, y en este caso se aproximan al valor teórico y de ello se deduce que pueda corresponder al mecanismo ECE. Este mecanismo se explica en la Figura 21. Durante este mecanismo, el producto de la primera transferencia electrónica da lugar a una reacción química, y el producto de esta reacción química toma el segundo electrón para dar lugar al producto final de la oxidación.

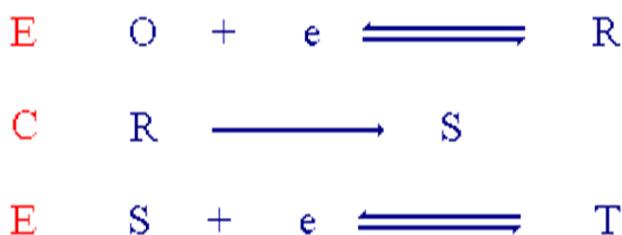


Figura 21. Mecanismo de reacción.

4.1.2. Espectroelectroquímica UV-Vis.

La espectroelectroquímica UV-Vis fue estudiada en una disolución 0.1M de KCl, lo que al principio de la medida corresponde a un pH=7.

Con esta técnica, a la vez que se realiza una voltamperometría cíclica, se registra el espectro de absorción molecular UV-Vis de la capa de disolución cercana al electrodo de trabajo. El intervalo de potencial para la voltamperometría cíclica fue de 0.2 a 1.1 V y la velocidad de barrido fue 5mV/s. Los resultados obtenidos se pueden ver en la *Figura 22*. Durante la oxidación, el espectro de absorción de la quinina cambia. La banda de absorción a 234 nm decrece al igual que la absorción en torno a 279 nm y las bandas a 206, 249, 346 nm incrementan durante la oxidación (A). Cuando la polaridad del electrodo cambia, y se produce la re-reducción del producto formado, los espectros de absorción muestran justo el efecto contrario, por lo que se puede hablar de reversibilidad del proceso, lo que significa que el compuesto que se había generado tras la oxidación de la quinina se redujo, volviéndose a obtener la quinina. Este comportamiento se encontró con una solución ligeramente alcalina e indica que el proceso ECE es químicamente reversible.

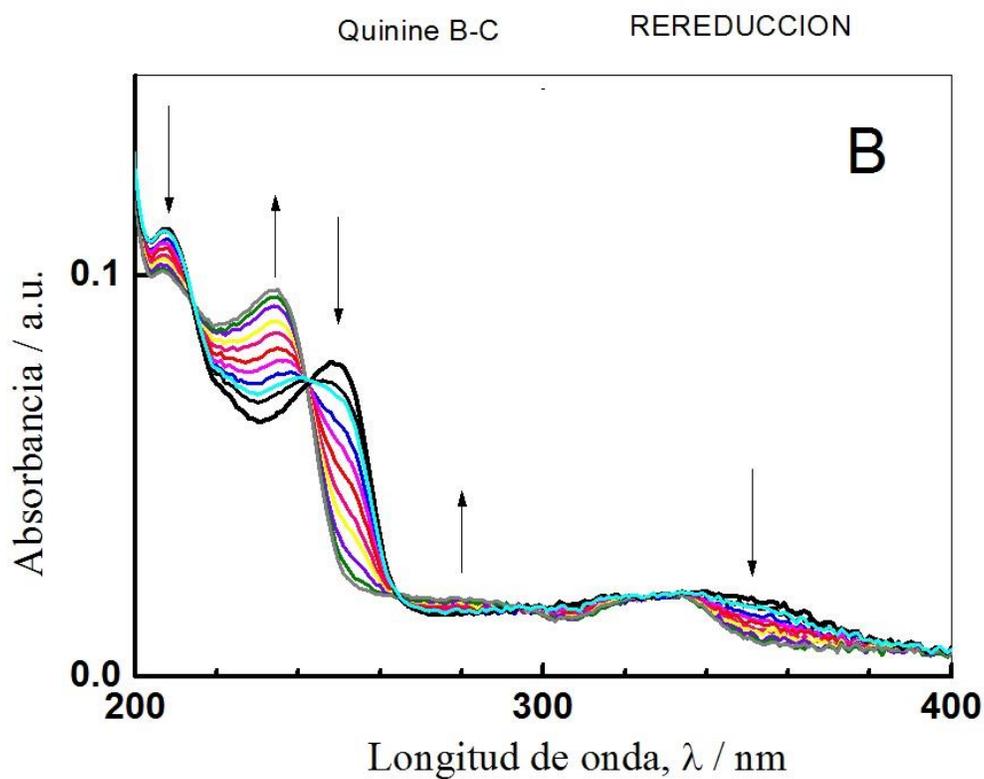
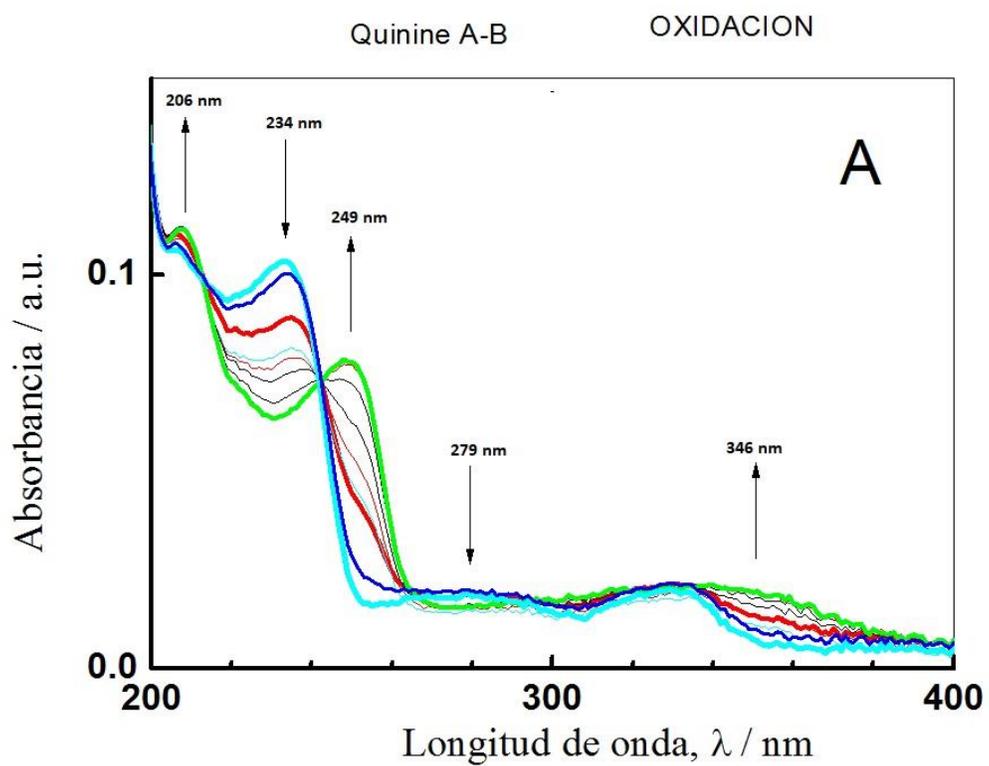


Figura 22. Espectroscopia UV-Vis de la quinina a pH=7.

Con el fin de evitar problemas en el estudio espectroelectroquímico debidos a la posible oxidación de la quinina por parte del oxígeno atmosférico; en todos los ensayos se utilizaron disoluciones de quinina libres de oxígeno. Posteriormente se realizaron una serie de experiencias para comprobar si efectivamente la quinina podía ser oxidada por el oxígeno atmosférico. Con este objetivo se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de la quinina en condiciones ambientales.

La disolución de la quinina (0.5 mM) fue preparada en 0.1 M KCl y 4 mM KOH bajo una atmosfera de Argón. Esto significa que los disolventes se eliminó el oxígeno burbujeando argón la solución antes de ser utilizados. Se midió el espectro de absorción de esta disolución. A continuación, se realizó la medida del espectro de absorción en presencia de oxígeno, es decir, con la cubeta abierta y agitada manualmente.

El espectro de absorción de la quinina no sufrió ningún cambio durante su medida. Esto significa que la quinina es estable en esta disolución alcalina.

4.1. 3. Culombimetría.

Antes de cada culombimetría se realizaron voltamperometrías cíclicas para observar el potencial de oxidación del compuesto y de esta forma saber el potencial que se debía aplicar a la electrolisis.

En el caso de la quinina se utilizaron dos disoluciones distintas para llevar a cabo este experimento. La concentración de la disolución electrolizada era 0.2 mM en una disolución 0.1M de KCl. Por último, se utilizó una disolución tampón BRB de pH=7.82 de concentración 0.2 mM.

El número de los electrones que participan se calcula teniendo en cuenta la carga consumida de acuerdo con la ecuación de Faraday:

$$Q = \frac{m \cdot z \cdot F}{M}$$

Ecuación 1.

Donde **Q** es la carga puesta en juego, en coulomb (C), **m** la masa pesada en gramos, **M** la masa molar en gramos/mol, **z** el número de electrones y **F** la constante de Faraday=96485.3 C/mol.

Este experimento se realiza de forma conjunta con el análisis cromatográfico HPLC, por tanto, se explica en el siguiente apartado.

4.1.5. Cromatografía líquida de alta resolución.

En primer lugar, se inyectó una disolución de quinina en agua. A esta muestra se la denominó “quinina estándar” (Q standard) y el tiempo de retención de la quinina fue de 12.0 minutos. El proceso de electrolisis fue estudiado junto con el HPLC para los dos medios en los que se disolvió el compuesto: en 0.1M de cloruro potásico (Q1-Q3) y en una disolución tampón BRB de pH=7.82 (Q4-Q7). La longitud de onda fijada en el detector fue de 210nm.

Disolución 0.1 M KCl:

La concentración de la quinina en la disolución era de 0.2 mM.

Antes de la electrolisis se realizó una voltamperometría cíclica en un intervalo de potencial de -0.3 V a 1.5 V. Se extrajo una alícuota, **Q1**, de 500 μ L de la disolución antes de someterla a la electrolisis y se analizó por HPLC. El voltamperograma cíclico antes de la electrolisis se muestra en la Figura 23, curva a.

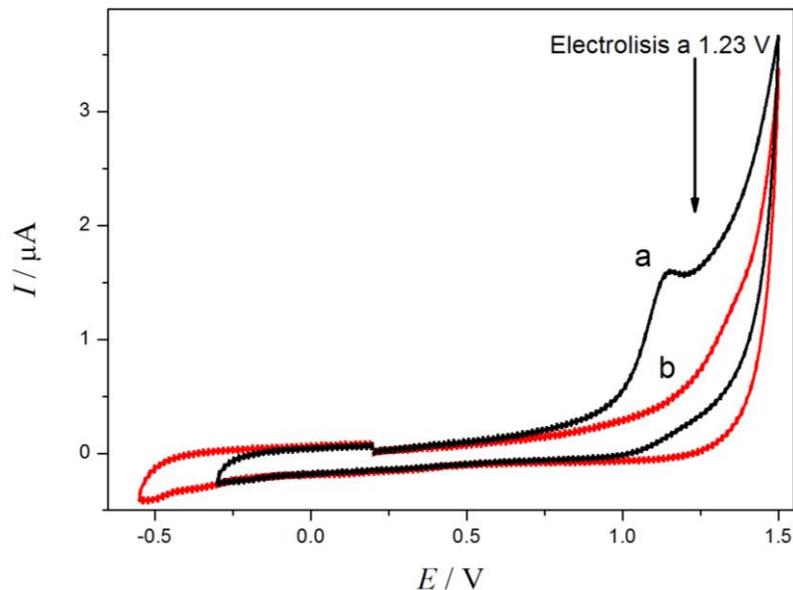


Figura 23. Voltamperograma cíclico a) antes y b) después de la electrolisis de la quinina en 0.1 M KCl.

A continuación, se realizó una electrolisis a un potencial de 1.23V, mismo potencial del pico de la voltamperometría. Durante esta, se tomó una alícuota, **Q2**, de 500 μ L de la disolución, con un paso de carga de 1.00C, lo que corresponde a la participación de 3.5 electrones; y se analizó por HPLC.

Después de la electrolisis se tomó la última alícuota de la disolución, **Q3**, con un paso de carga de 0.85C, la cual se suma a la carga anterior dando una carga total de 1.84C y que corresponde a la participación de 6.5 electrones. Este número es muy alto ya que está desafortunadamente influenciado por la descomposición del electrolito y no se puede usar para la determinación del número de electrones participantes. Se realizó una última voltamperometría cíclica después de la electrolisis, curva b en la Figura 23. Se puede observar que la curva de oxidación de la quinina desaparece después de la electrolisis.

En la Figura 24, donde se muestran los cromatogramas obtenidos, se puede observar que a medida que avanza la electrolisis y por tanto aumenta el número de electrones intercambiados, el pico de la quinina disminuye y otros picos aparecen, lo que corresponde a productos de oxidación formados durante la electrolisis.

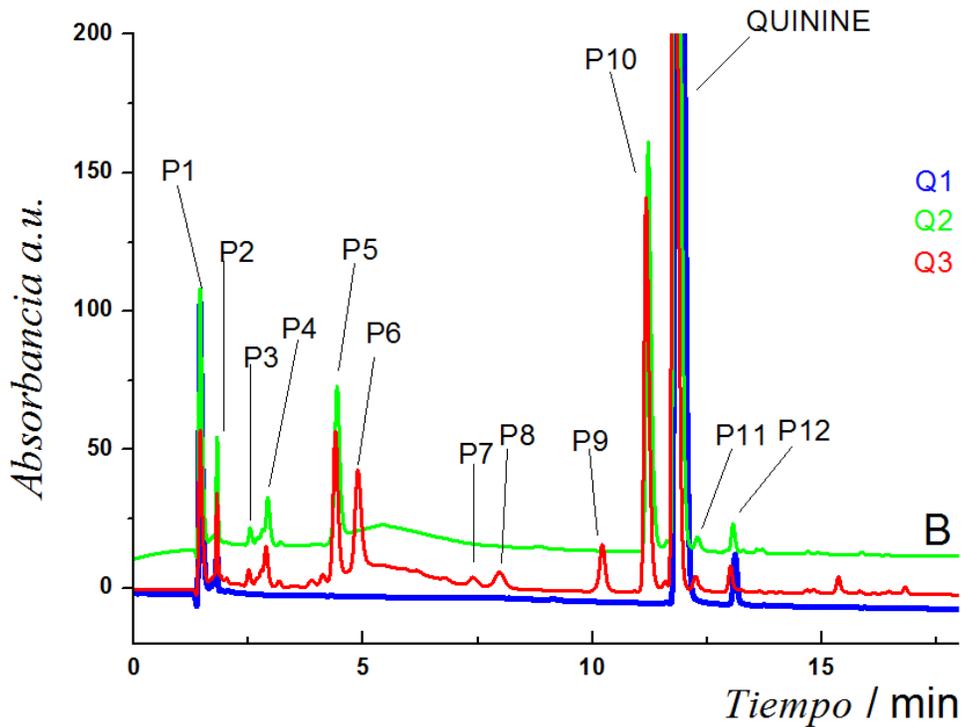
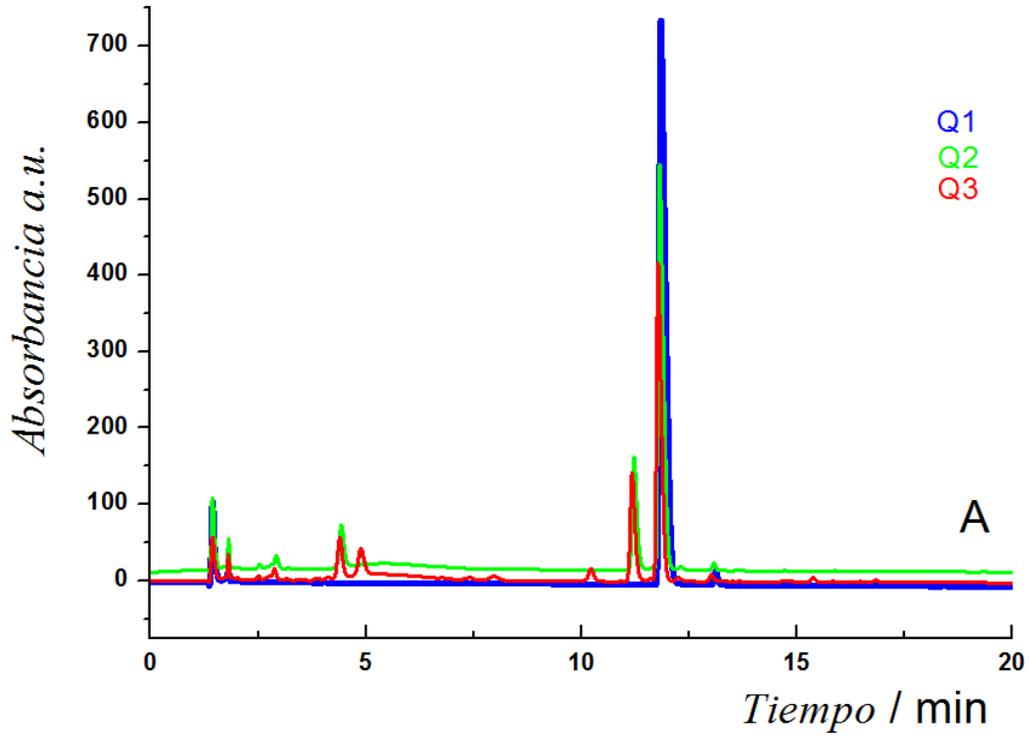


Figura 24. Cromatograma de la quinina en una disolución 0.1M de KCl a una longitud de onda de 210nm.

A) Cromatograma sin ampliar, B) Cromatograma ampliado.

Tampón pH=7.82:

La concentración de la quinina en la disolución fue de 0.2mM.

En la figura 25 se puede ver el voltamperograma cíclico a) antes, b) durante y c) después de la electrolisis. Cada alícuota (Q4-Q7) que fue tomada fue medida en el HPLC.

Después de la electrolisis la carga consumida fue de 1.19C, que corresponde a 4.2 electrones. Durante la electrolisis participaron dos electrones y, además, un producto de la reacción de oxidación fue electrolizado por dos electrones.

El voltamperograma cíclico después de la electrolisis (c) muestra una curva que podría significar la aparición de un producto o la incompleta electrolisis de la quinina.

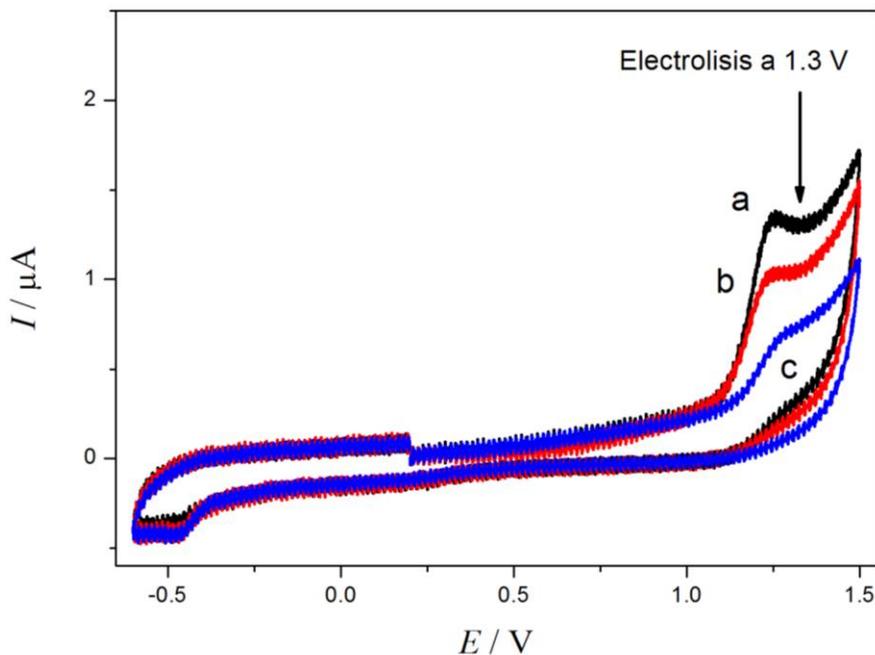


Figura 25. Voltamograma cíclico a) antes b) durante y c) después de la electrolisis de la quinina en el tampón a pH=7.82.

En la Figura 26 se muestran los cromatogramas obtenidos. Al igual que en el caso anterior, a medida que aumenta el número de electrones intercambiados el pico de la quinina disminuye. La diferencia es que se puede observar el pico de un producto (P13) que en la otra disolución no aparecía.

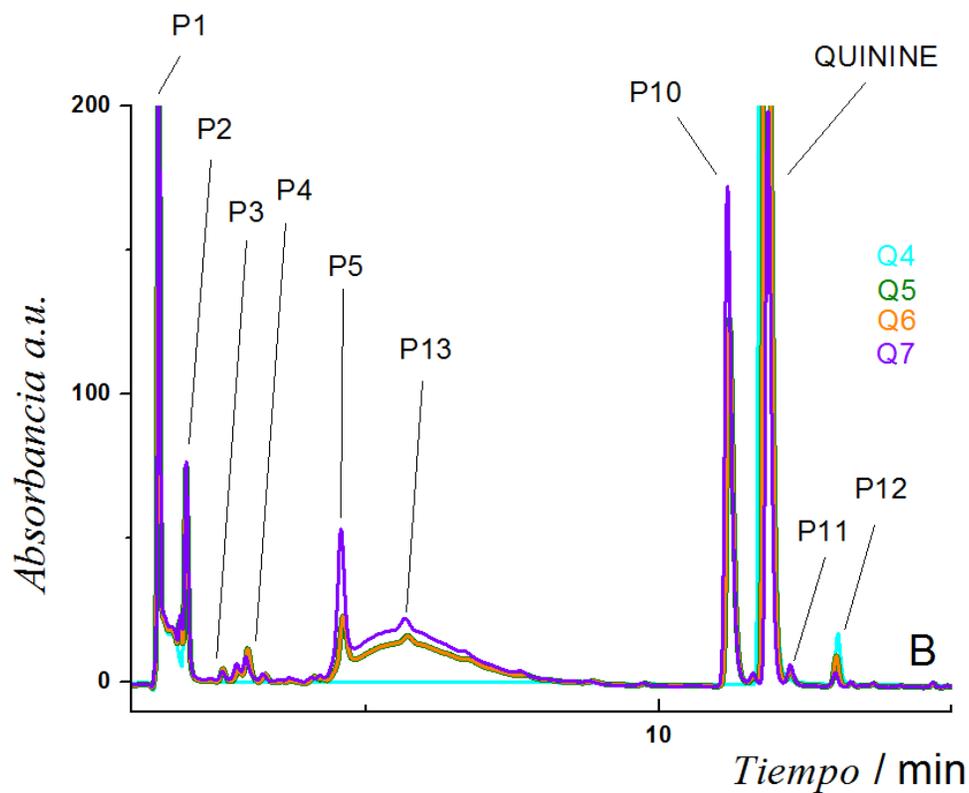
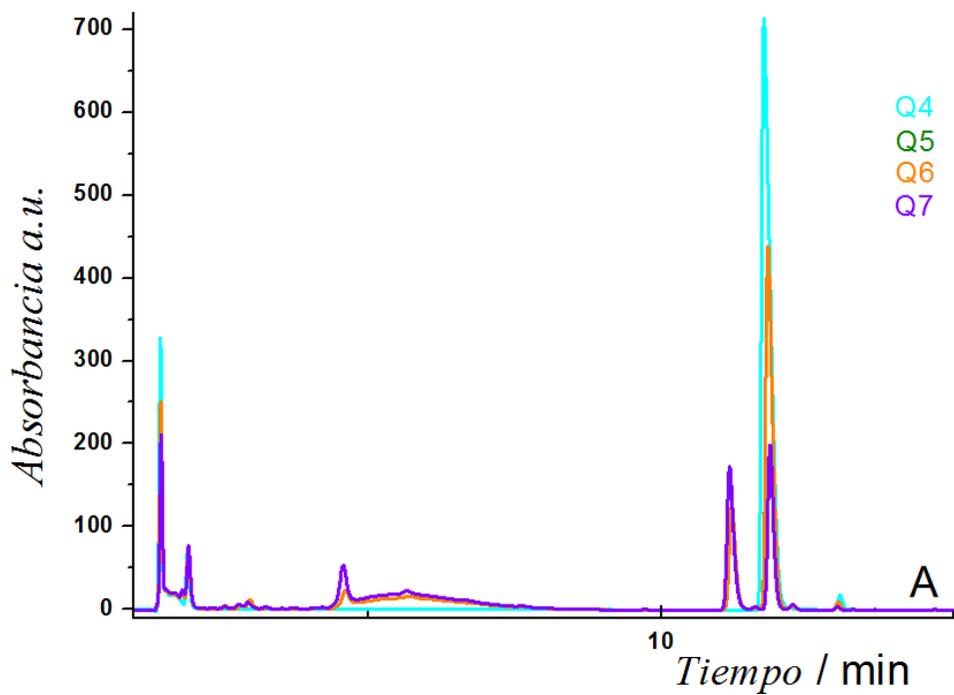


Figura 26. Cromatograma de la quinina en una disolución tampón a pH=7.82 a una longitud de onda de 210nm. A) Cromatograma sin ampliar, B) Cromatograma ampliado

En las Figuras 27-29 se pueden observar los espectros UV-Vis correspondientes a los diferentes picos obtenidos en los cromatogramas. Pertenecen tanto al experimento realizado en la disolución tampón y en la disolución de KCl, ya que los espectros coincidían. Si bien para obtener una información sobre la estructura de los compuestos y conseguir su identificación es necesario continuar el estudio utilizando detectores de espectrometría de masas.

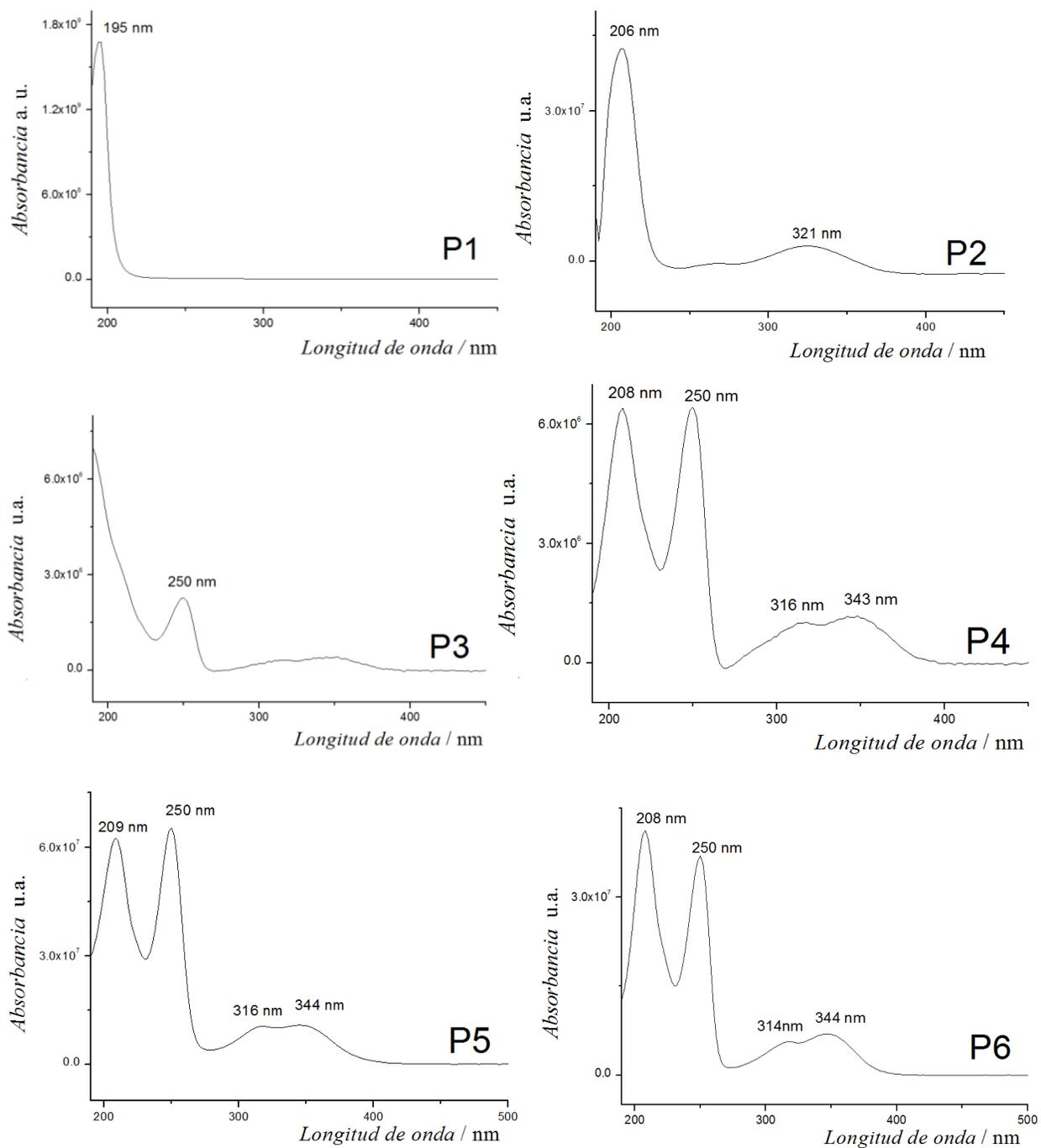


Figura 27. Espectros UV-Vis de los productos de la oxidación de la Quinina obtenidos por HPLC-DAD.

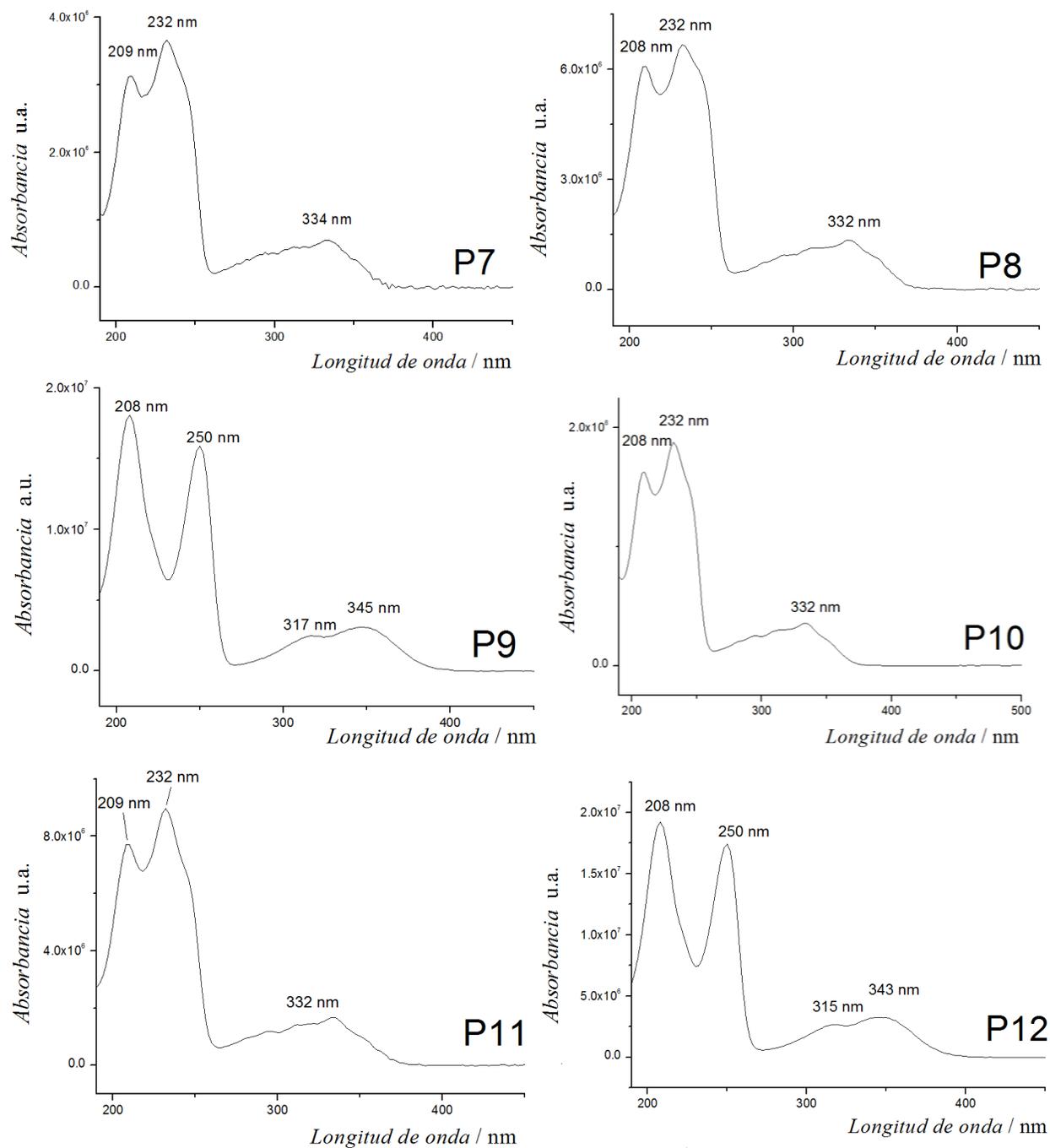


Figura 28. Espectros UV-Vis de los productos de la oxidación de la Quinina obtenidos por HPLC-DAD.

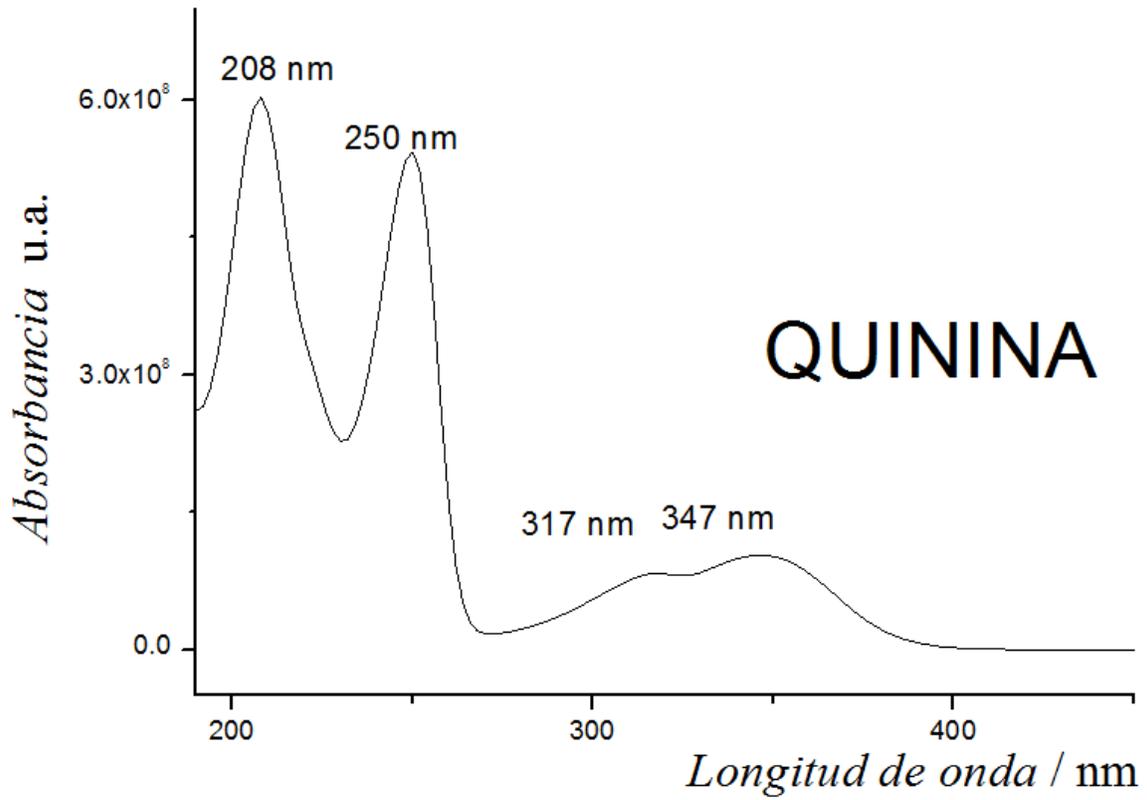
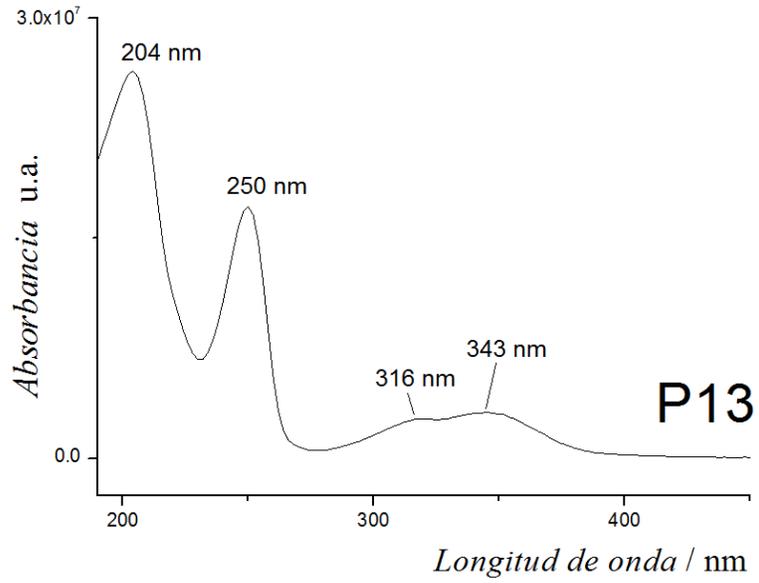


Figura 29. Espectros de los productos de la oxidación de la Quinina (P13) y de la Quinina.

4.2. LUTEOLIN-7-O-GLUCOSIDO

4.2.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es un método usado comúnmente para la determinación de los mecanismos de oxidación de compuestos bioactivos. Por tanto, al igual que con la quinina, se realizaron diversas medidas variando la concentración y la velocidad de barrido. Todas ellas se hicieron utilizando como electrolito soporte una mezcla de disolución tampón y etanol 50/50 (v/v). Se utilizó etanol debido a la limitada solubilidad del Luteolin-7-O-Glucosido en medio acuoso. En la figura 30 se muestran los voltamperogramas obtenidos a diferentes pH.

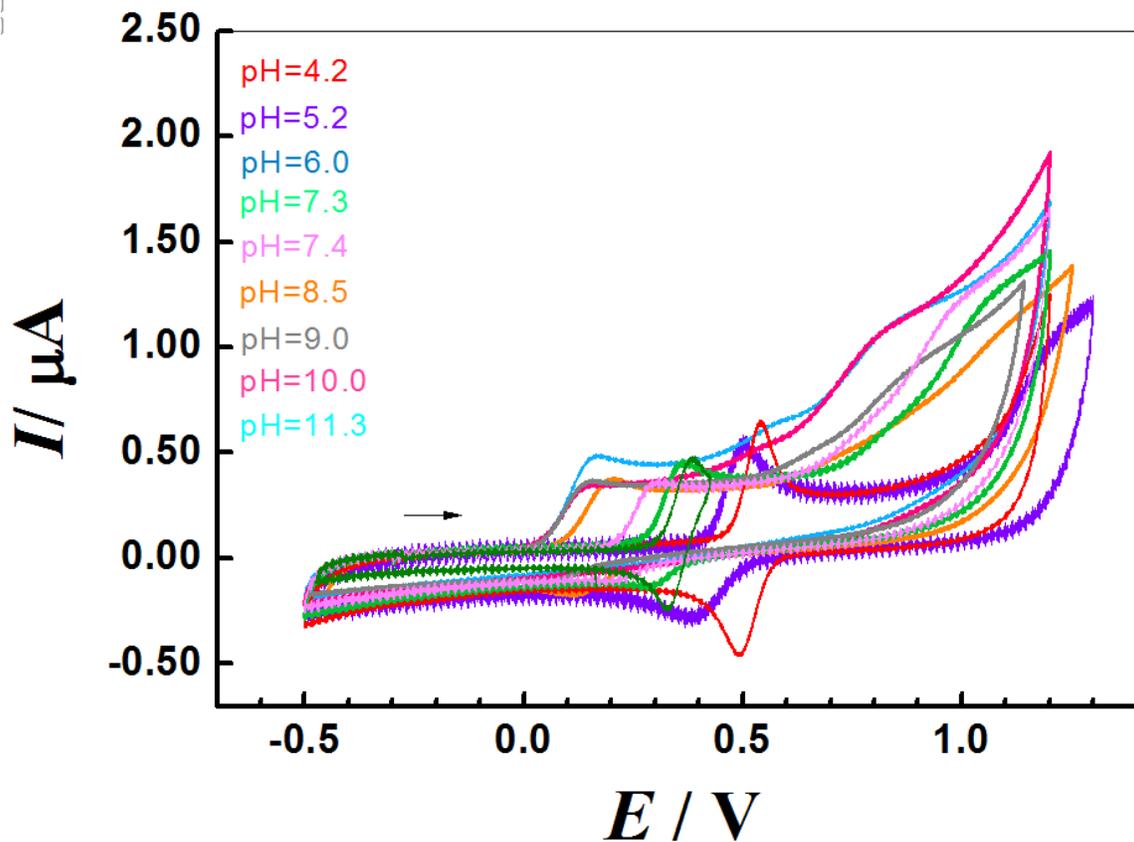


Figura 30. Voltamperograma cíclico a diferentes pH. Velocidad de barrido constante igual a 0.1 V/s y concentración constante igual a 0.23mM.

En la Figura 30 y la Figura 31 se muestran los voltamperogramas obtenidos a diferentes pH, como puede observarse la oxidación se produce a potenciales diferentes dependiendo del pH. El potencial de pico (E_p) se desplaza hacia valores más bajos cuando el pH aumenta. La intensidad de pico (I_p) disminuye desde el pH ácido de 4.2 hasta el pH 7.4.

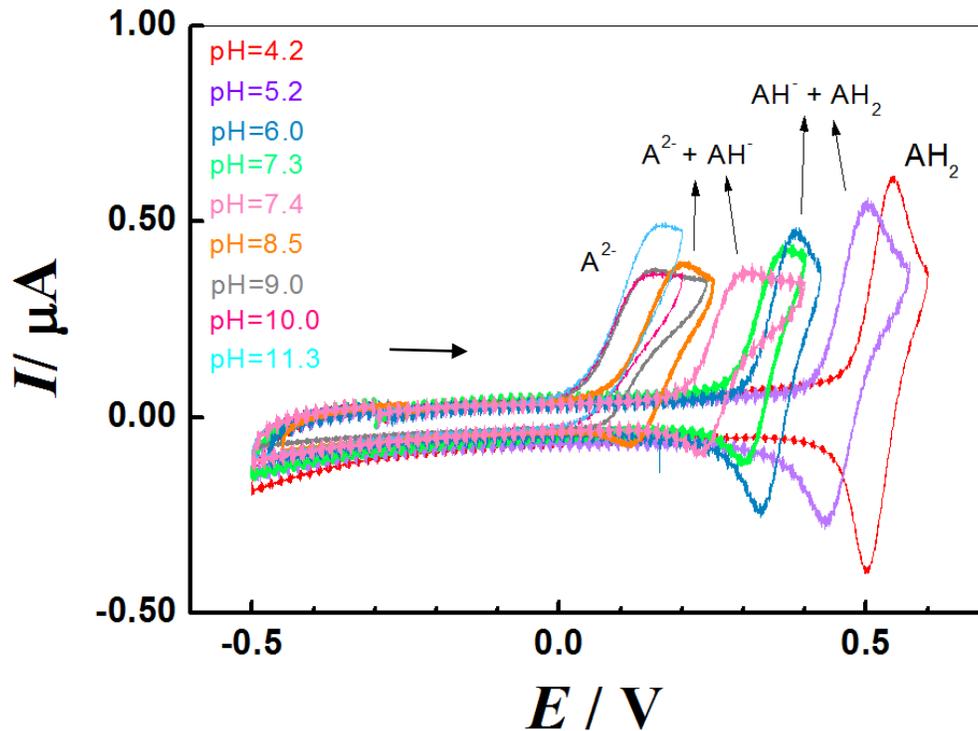


Figura 31. Voltamperograma cíclico a diferentes pH a una velocidad de barrido constante de 0.1 V/, concentración 0.23mM. La dirección de polaridad del electrodo se cambió a un potencial justo posterior al primer pico de oxidación.

En la Figura 31 se observa que la reversibilidad disminuye a pH alcalinos. Esto significa que en disoluciones alcalinas se produce una reacción química acoplada al proceso de oxidación. El mecanismo de oxidación en las disoluciones alcalinas y ácidas es diferente, lo que se ve claramente en la dependencia del potencial de pico con el pH (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**).

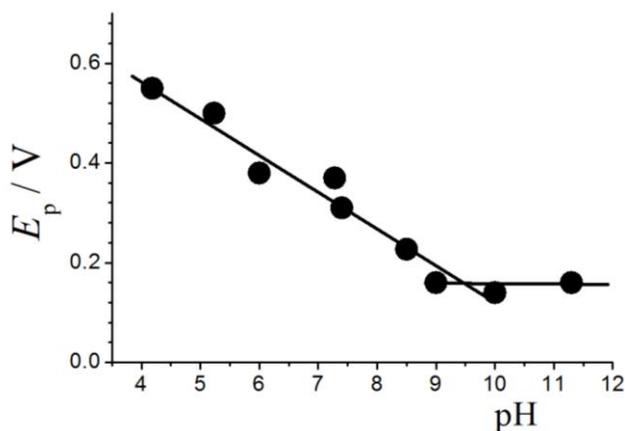


Figura 32. Dependencia del pico de potencial con el pH a una velocidad de barrido constante de 0.1 V/, concentración 0.23mM.

La dependencia del potencial de pico con el pH es lineal en el intervalo de pH de 4,2 a 9,4. El valor de la pendiente es igual a 67 mV. El valor se aproxima a 58mV, el cual aparece en investigaciones⁶² anteriores e indica el número de electrones y protones que participan en la oxidación es igual. En disoluciones alcalinas, el potencial de pico es constante e independiente del valor de pH, lo cual significa que bajo estas condiciones los protones no participan en la oxidación.

De la misma forma que con la quinina se realizó el diagrama de distribución de las formas de disociación del luteolin-7-O-glucosido. Se siguieron las ecuaciones descritas a continuación de la Figura 33. **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

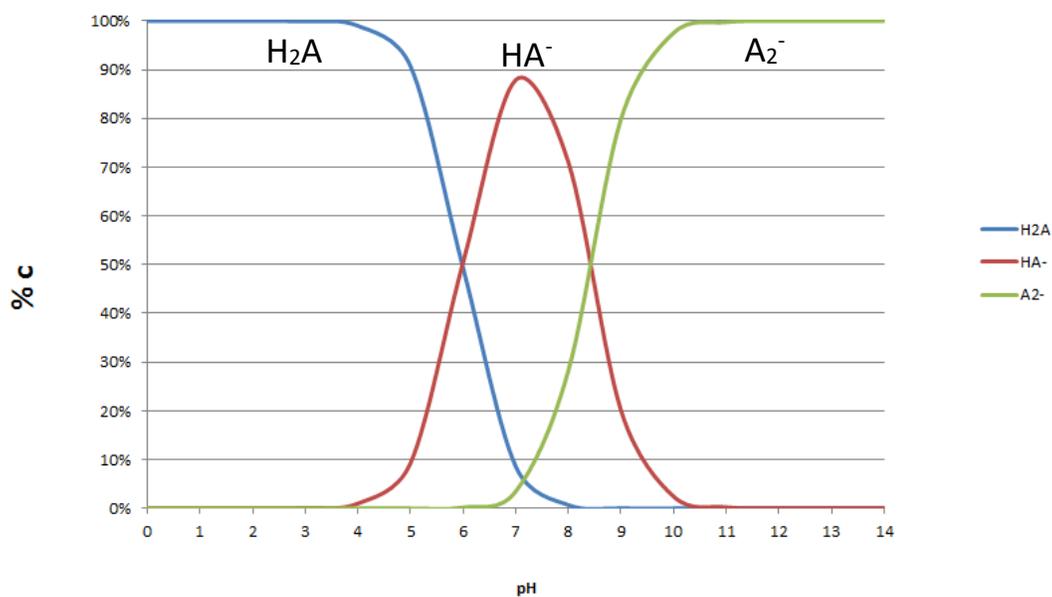
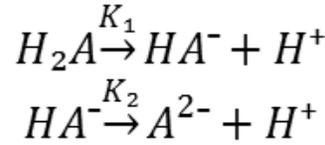


Figura 33. Diagrama de distribución de las formas de disociación del Luteolin-7-O-glucosido.



$$K_1 = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{[H_2A]} \quad K_2 = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+]}{[HA^-]}$$

$$[H_2A] = \frac{[HA^-] \cdot [H^+]}{K_1} \quad [HA^-] = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+]}{K_2}$$

$$c = [H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}] \quad [H_2A] = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+] \cdot [H^+]}{K_1 K_2}$$

$$[H_2A] = \frac{(c - [H_2A] - [HA^-]) \cdot [H^+]^2}{K_1 K_2} = \frac{c \cdot [H^+]^2 - [H_2A] \cdot [H^+]^2 - [H^+]^2 \cdot [HA^-]}{K_1 K_2}$$

$$[H_2A] \cdot K_1 K_2 + [H^+]^2 \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]^2 - [H^+]^2 \cdot [HA^-]$$

$$[H_2A] \cdot K_1 K_2 + [H^+]^2 \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]^2 - [H^+]^2 \cdot \frac{K_1 [H_2A]}{[H^+]}$$

$$[H_2A] \cdot K_1 K_2 + [H^+]^2 \cdot [H_2A] = c \cdot [H^+]^2 - [H_2A] \cdot K_1 \cdot [H^+]$$

$$[H_2A] \cdot (K_1 K_2 + [H^+]^2 + K_1 [H^+]) = c \cdot [H^+]^2$$

$$[H_2A] = \frac{c \cdot [H^+]^2}{K_1 K_2 + [H^+]^2 + K_1 [H^+]}$$

$$[HA^-] = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+]}{K_2} = \frac{[H^+] \cdot c - [H^+] \cdot [H_2A] - [H^+] \cdot [HA^-]}{K_2}$$

$$K_2 \cdot [HA^-] = [H^+] \cdot c - \frac{[H^+] \cdot [H^+] \cdot [HA^-]}{K_1} - [HA^-] \cdot [H^+]$$

$$K_1 K_2 \cdot [HA^-] = K_1 \cdot [H^+] \cdot c - [H^+]^2 \cdot [HA^-] - K_1 [HA^-] \cdot [H^+]$$

$$K_1 K_2 \cdot [HA^-] + [H^+]^2 \cdot [HA^-] + K_1 \cdot [HA^-] \cdot [H^+] = K_1 \cdot [H^+] \cdot c$$

$$[HA^-] = \frac{K_1 \cdot [H^+] \cdot c}{K_1 K_2 + [H^+]^2 + K_1 [H^+]}$$

$$[A^{2-}] = c - [H_2A] - [HA^-]$$

En la Figura 34 y la Figura 35 se muestran los voltamperogramas obtenidos para diferentes concentraciones de Luteolin-7-O-Glucosido y a un valor de pH ácido. Como se puede observar, en disoluciones acidas el potencial de pico aumenta proporcionalmente con la concentración. Esto puede significar un proceso de dimerización.

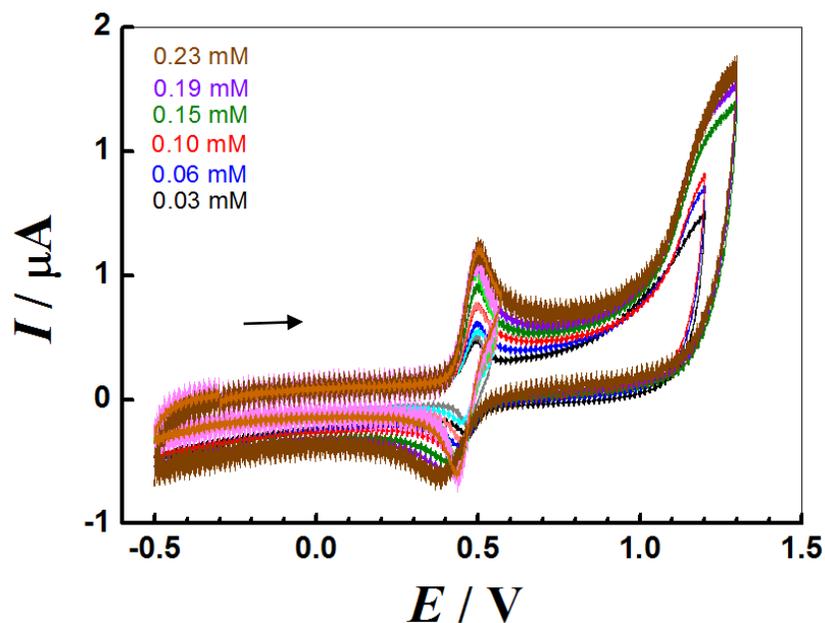


Figura 34. Voltamperograma cíclico a diferentes concentraciones a un pH=5.2. Velocidad de barrido=0.1 V/s.

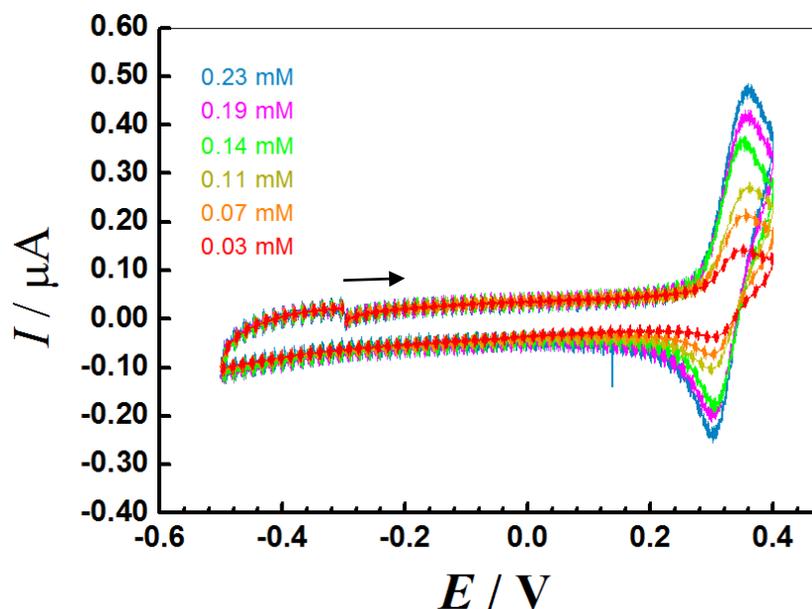


Figura 35. Voltamperograma cíclico a diferentes concentraciones a pH=6. Velocidad de barrido=0.1 V/s.

Al igual que en el estudio con quinina, se realizaron voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido y manteniendo constantes la concentración y el pH. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 36 y la Figura 37.

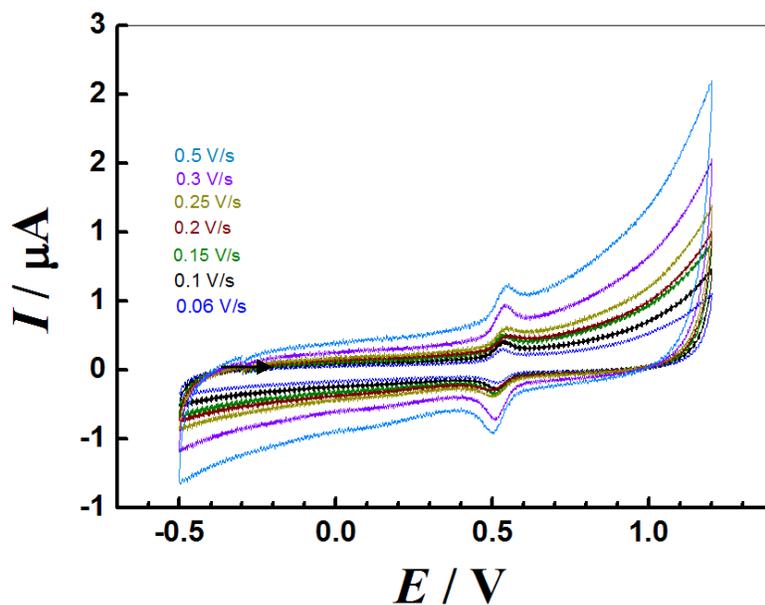


Figura 36. Voltamperograma cíclico a diferentes velocidades de barrido a pH=4.2 y concentración 0.04 mM.

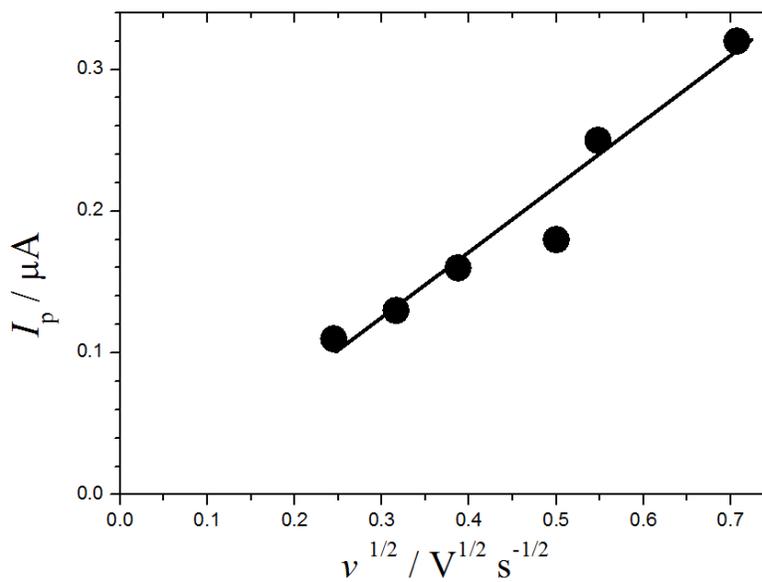


Figura 37. Relación entre los picos de corriente y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. A pH=4.2 y concentración 0.04 mM.

La relación entre la intensidad de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido es lineal, como se observa en la Figura 37, lo que significa que el proceso es controlado por difusión. En la Figura 38 se representa la variación del potencial de pico con la velocidad de barrido. Como puede observarse la dependencia también es lineal y confirma que el proceso está controlado por la difusión.

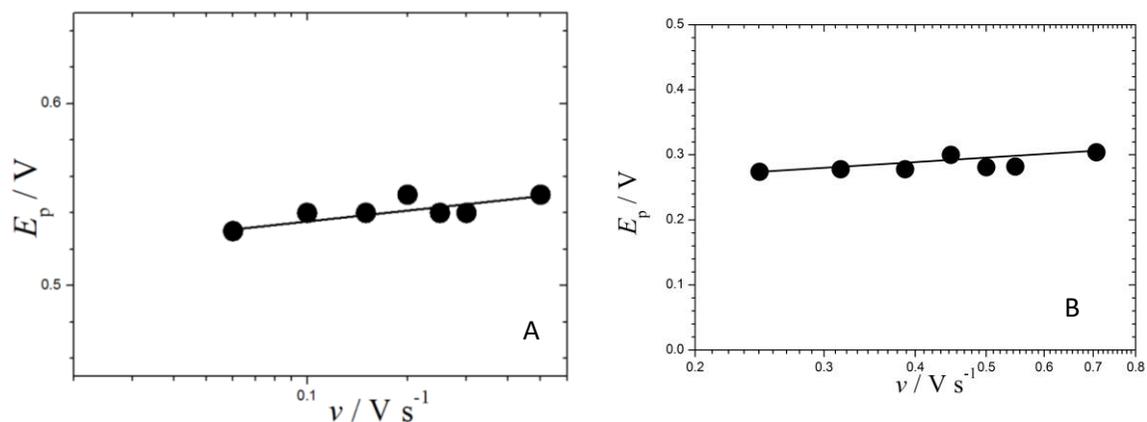


Figura 38. Dependencia de los máximos de potencial con la velocidad. A) pH=4.2. B) pH=9.

En la Figura 39 se representa el potencial de pico frente a la concentración de luteolin-7-O-glucosido:

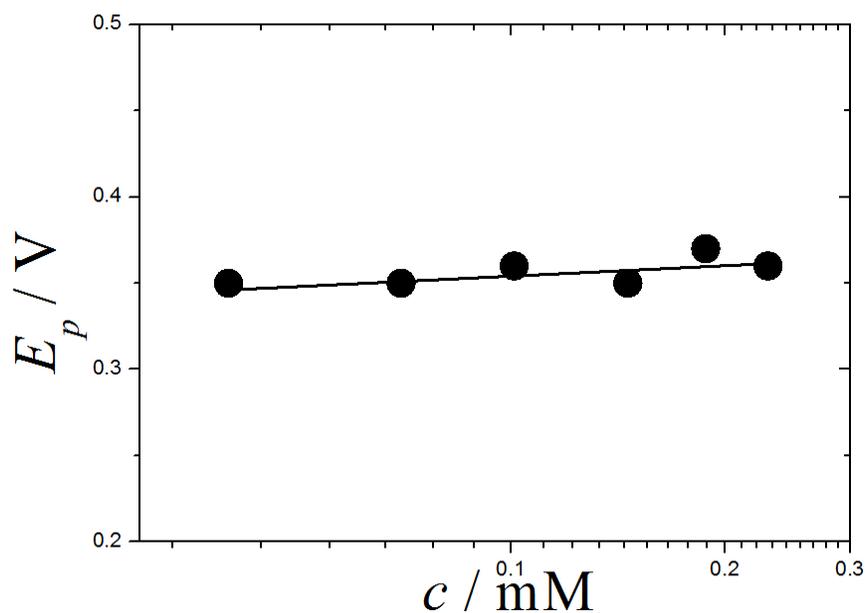


Figura 39. Dependencia de los máximos de potencial con la concentración a pH=7.3, y velocidad de barrido 0.1 V/s.

Al igual que con la quinina los valores de las pendientes en la representación del potencial de pico (E_p) frente a la velocidad de barrido (v) y a la concentración (c) fueron $\delta E_p/\delta \log v = 26 \text{ mV}$ (Figura 38) y $\delta E_p/\delta \log c = 25 \text{ mV}$ (Figura 39), los cuales son próximos a los valores teóricos $\delta E_p/\delta \log v$ y $\delta E_p/\delta \log c = 29 \text{ mV}$ lo que indica que el mecanismo de oxidación se corresponde con el mecanismo tipo ECE⁶³.

En disoluciones alcalinas (Figuras 40-43) el potencial de oxidación se desplazó hacia valores más bajos al aumentar la concentración del luteolin-7-O-glucosido. Esto significa que la adición de compuesto facilita el proceso de oxidación. Por tanto, es posible que se produzca una reacción química que favorece en la transferencia de electrones.

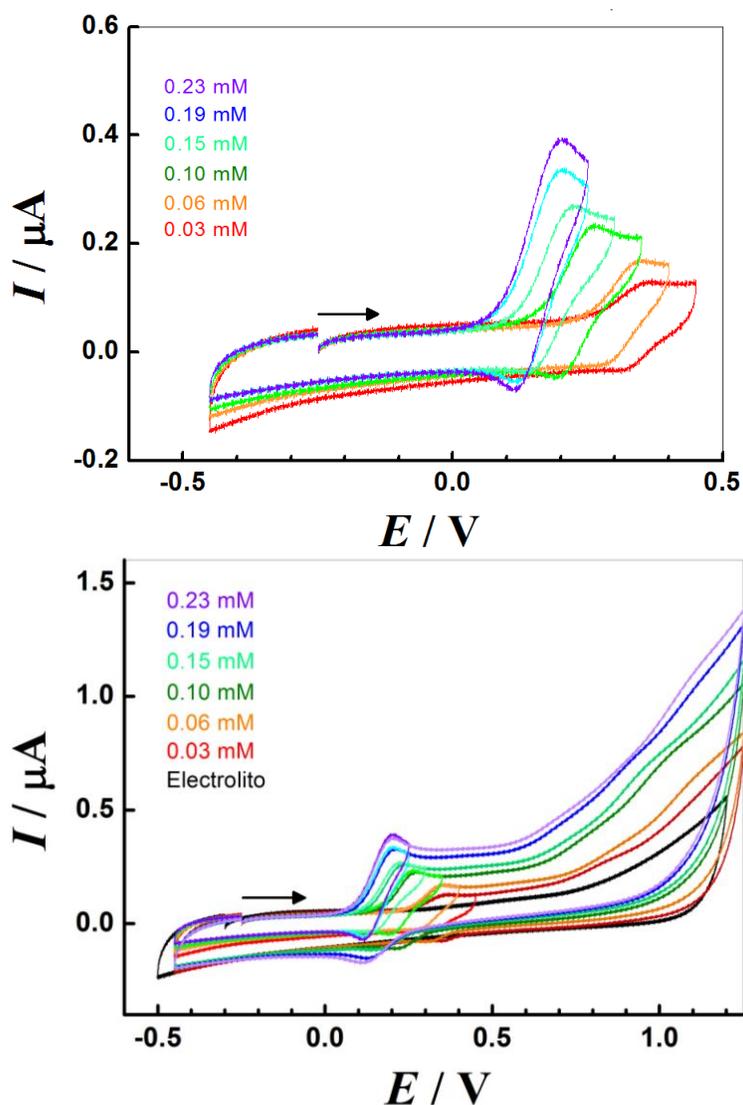


Figura 40. Voltamperograma cíclico a diferentes concentraciones. Velocidad de barrido constante 0.1 V/s y $\text{pH}=8.5$.

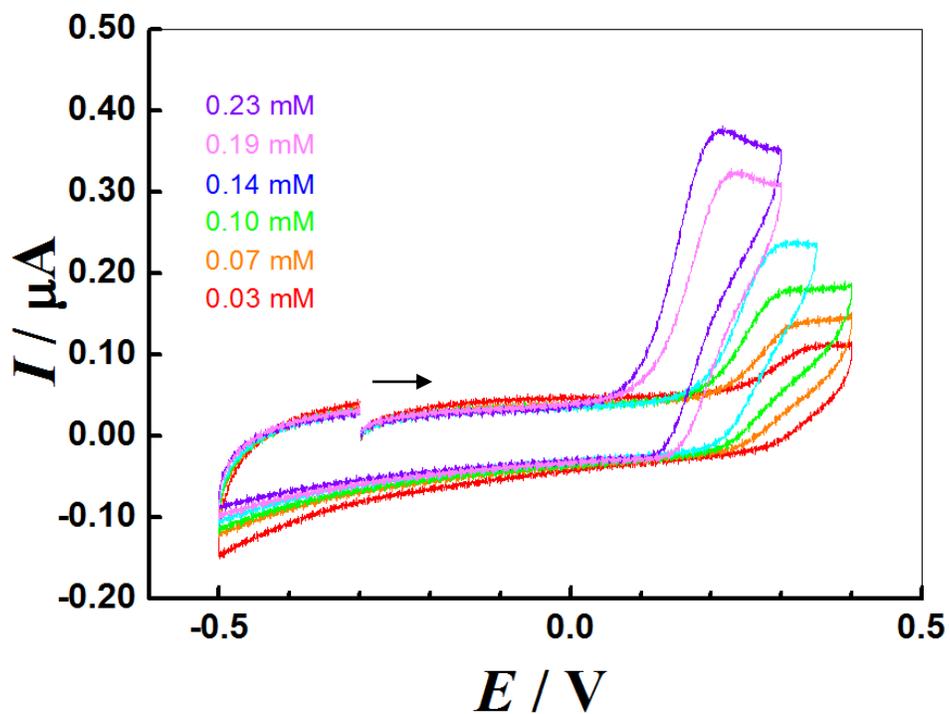


Figura 41. Voltamperograma cíclico a diferentes concentraciones. Velocidad de barrido constante 0.1 V/s y pH=9.

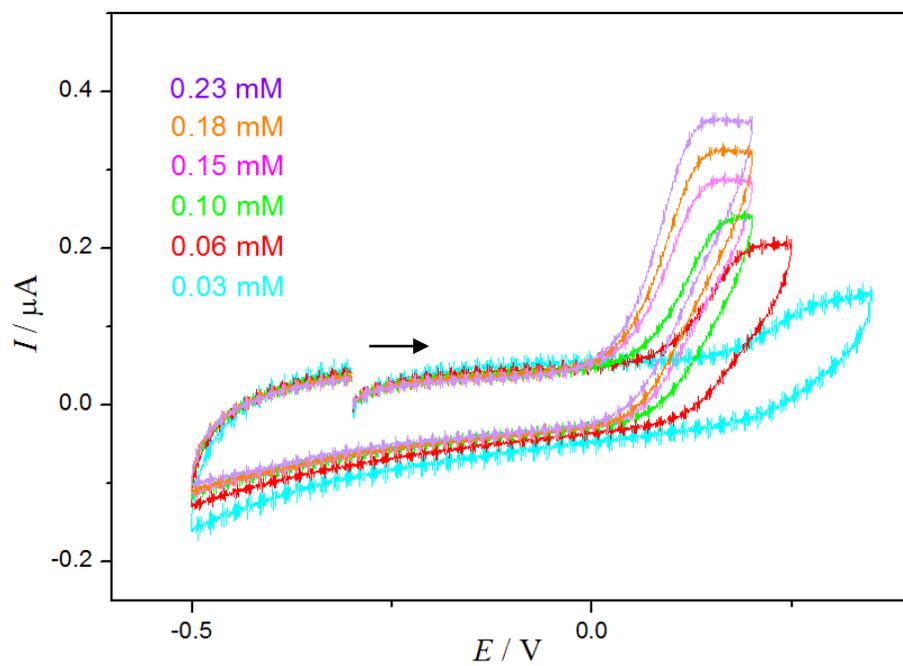


Figura 42. Voltamperograma cíclico a diferentes concentraciones. Velocidad de barrido constante 0.1 V/s y pH=10.

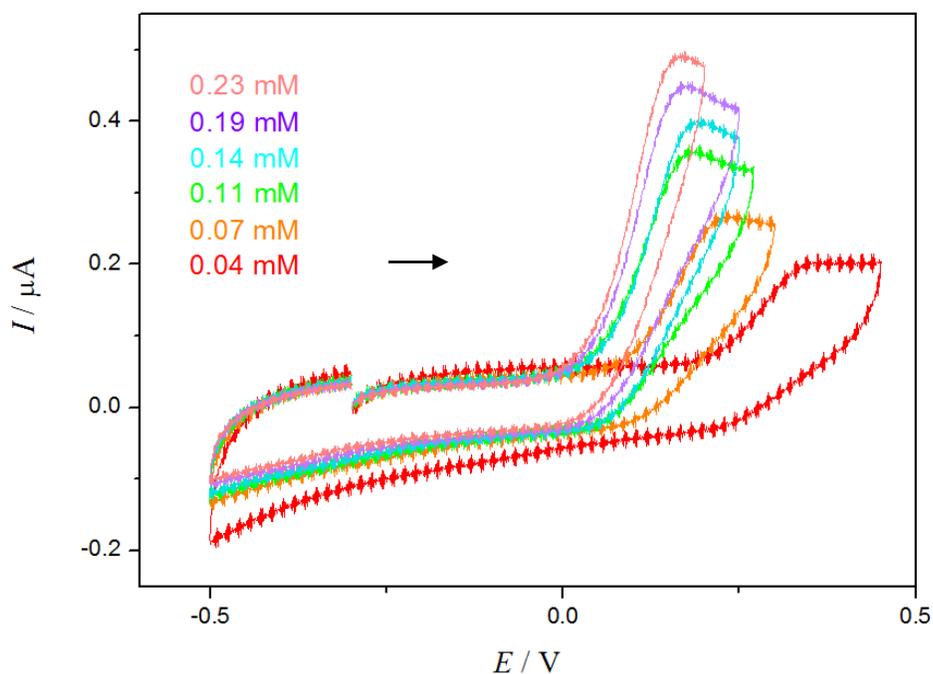


Figura 43. Voltamperograma cíclico a diferentes concentraciones. Velocidad de barrido constante 0.1 V/s y $\text{pH}=11$.

Como se puede observar en la Figura 44, a pH básico la relación entre I_p y la concentración no es lineal, lo que indica que el proceso está controlado por la adsorción, al contrario que en las disoluciones acidas.

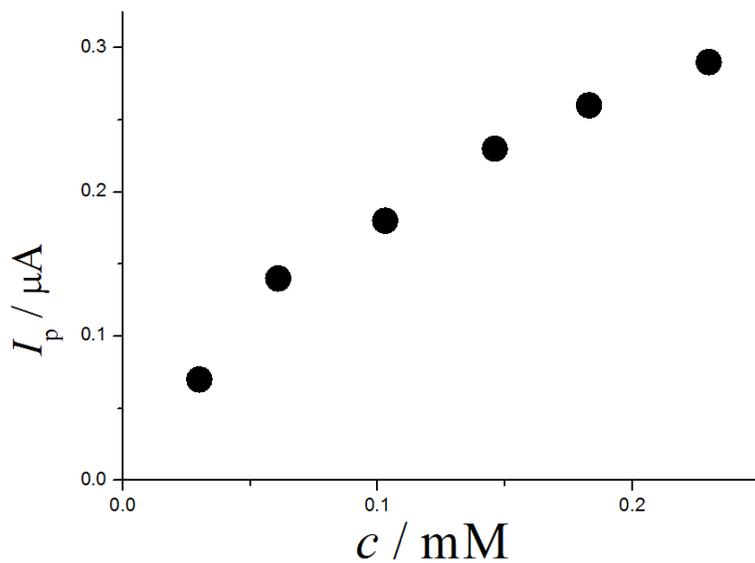


Figura 44. Relación entre los máximos de corriente y la concentración a $\text{pH}=10$ y velocidad de barrido 0.1 V/s.

En disolución alcalina, al representar el potencial de pico frente a la concentración, la pendiente de la recta tiene un valor más alto, $\delta E_p / \delta \log c = 122$ mV. Esto no corresponde con ningún esquema de reacción de los publicados en la literatura. Lo que podría ser debido a una reacción química del compuesto de partida a lo largo de la oxidación.

4.2.2. Espectroelectroquímica UV-Vis.

Al igual que con la quinina, también se realizó una voltamperometría cíclica a la vez que se registraba el espectro de absorción molecular UV/Vis de la capa de disolución cercana al electrodo de trabajo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 45 y Figura 46. El intervalo de potencial fue de -0.5 a 1.0 V para la Figura 45 y de -0.5 a 0.7 V para la Figura 46. En ambos casos la velocidad de barrido fue 5mV/s.

Se pueden observar que en los resultados obtenidos a pH=4.20 (Figura 45), el espectro de absorción cambia. Las bandas de absorción a 205 y 353 nm decrecen, mientras que la banda a 248 aumenta al igual que la absorbancia entorno a 290nm y 430nm y además la banda de 248 se desplaza hacia longitudes de onda más cortas.

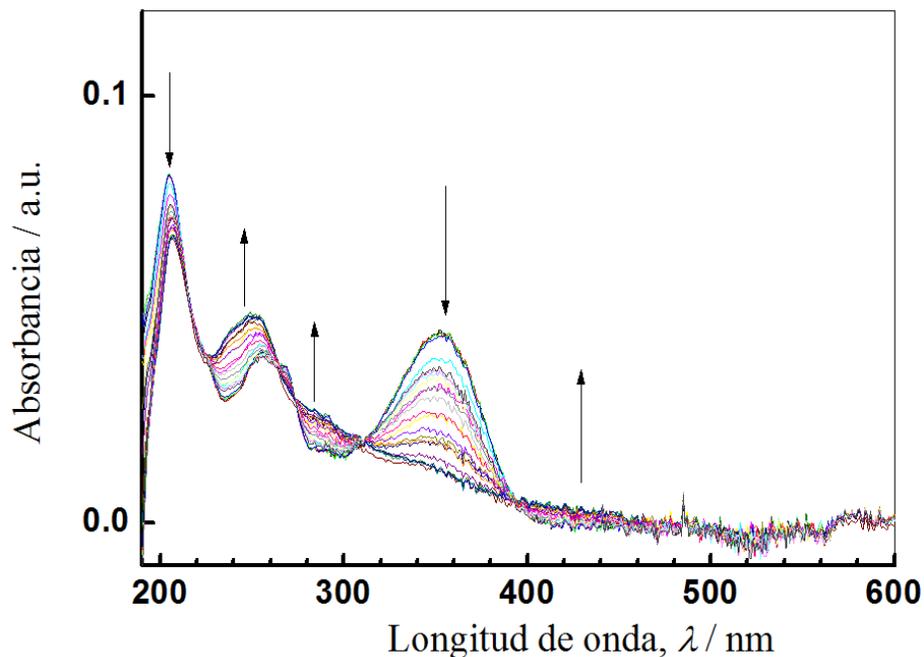


Figura 45. Espectroscopia UV-Vis del Luteolin-7-O-glucosido a pH=4.20.

En el caso del espectro obtenido a pH=8.3, las bandas de absorción que decrecen son a 207, 226, 259 y 379 nm, además la banda de 259nm se desplaza hacia longitudes de onda más cortas. Además, la absorbancia entorno a 243nm, 298nm y 494 nm aumenta.

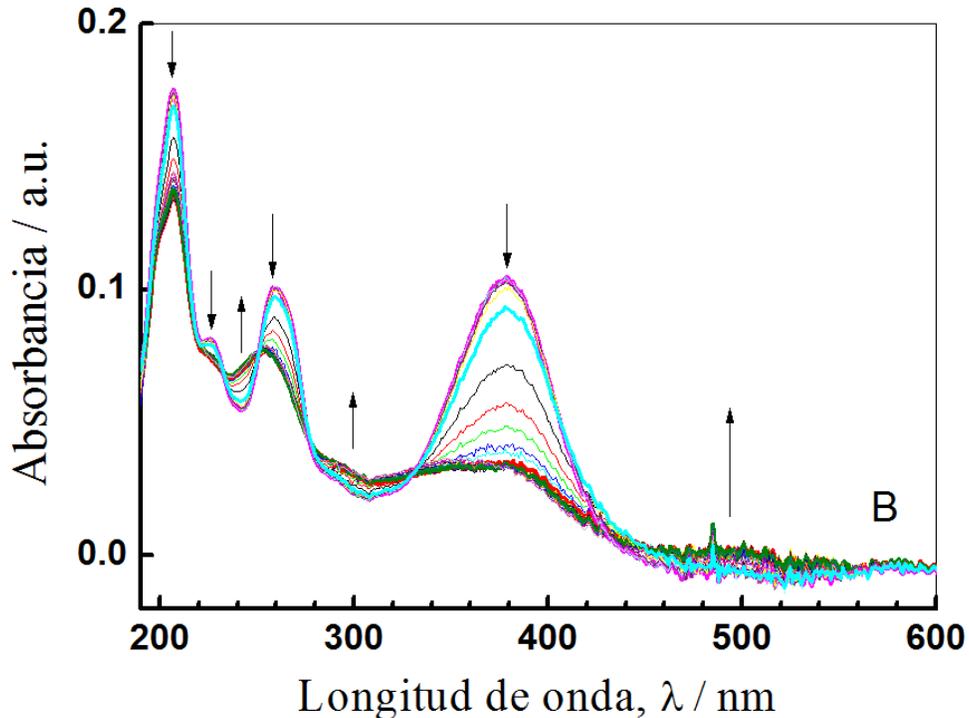


Figura 46. Espectroscopia UV-Vis del Luteolin-7-O-glucosido a pH=8.3.

Aunque la forma química del luteolin-7-O-glucosido es diferente según el pH sea ácido o básico; el comportamiento de los espectros en ambos medios es muy parecido a excepción de la banda entorno a los 250nm, que a pH ácido aumenta durante la oxidación y a pH alcalino disminuye.

Al igual que con la quinina, se realizó un experimento para comprobar la estabilidad del luteolin-7-o-glucosido en condiciones ambientales.

La disolución del luteolin-7-O-glucosido fue preparada en 0.1 M KCl y 4 mM KOH bajo una atmosfera de argón. Esto se realizó inyectando argón para extraer el oxígeno de la solución antes de ser utilizada. El esquema del proceso se muestra en la Figura 47.

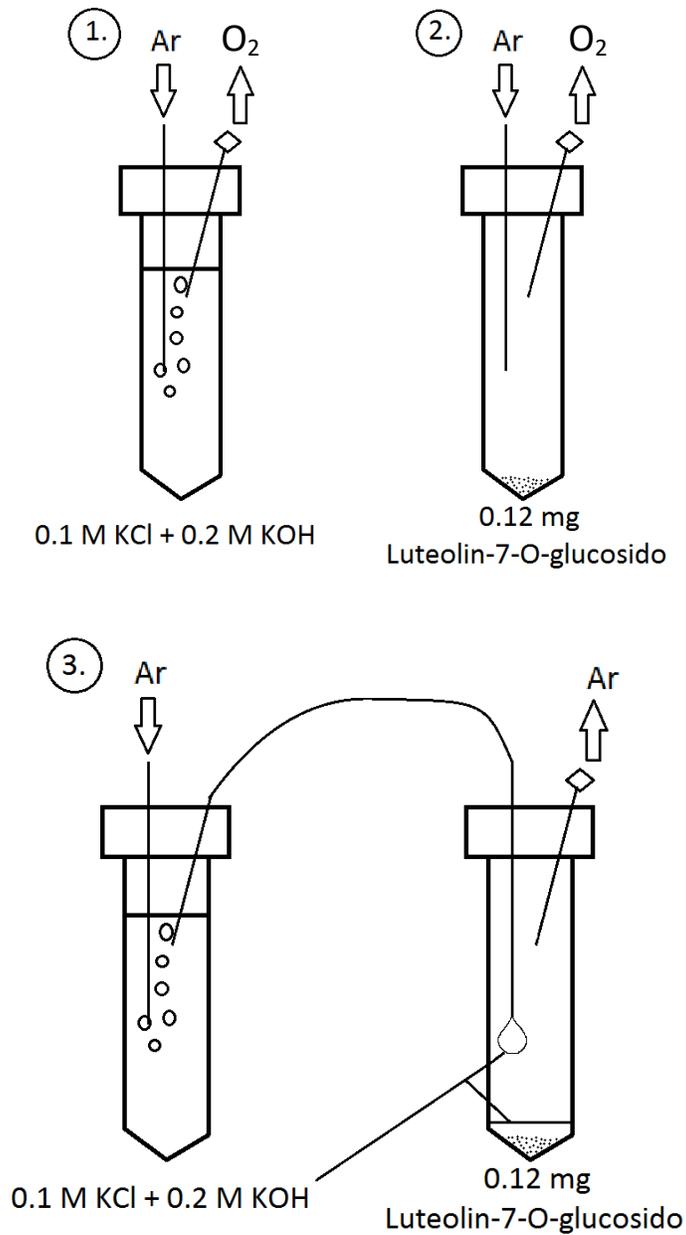


Figura 47. Esquema del proceso de preparación de la disolución $5.5 \cdot 10^{-5}$ M del luteolin-7-O-glucosido en KCl 0.1 M y KOH 0.2 M sin la presencia de oxígeno. 1) Burbujeo en la disolución soporte 2) Burbujeo en el recipiente con el compuesto 3) Traspaso de la solución al tubo con el compuesto por medio de presión del argón.

En primer lugar, se obtuvo el espectro de la disolución libre de oxígeno, y posteriormente los de la disolución habiendo estado expuesta a la presencia de oxígeno durante diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la Figura 48.

Durante la reacción del luteolin-7-O-glucosido con oxígeno las bandas de absorción a 264 nm y 393 nm disminuyen a medida que aumenta el tiempo de exposición al oxígeno. Esto significaría que el luteolin-7-O-glucosido se está degradando.

Por ello en todos los ensayos que se realicen con este compuesto, sería necesario mantener una atmósfera libre de oxígeno.

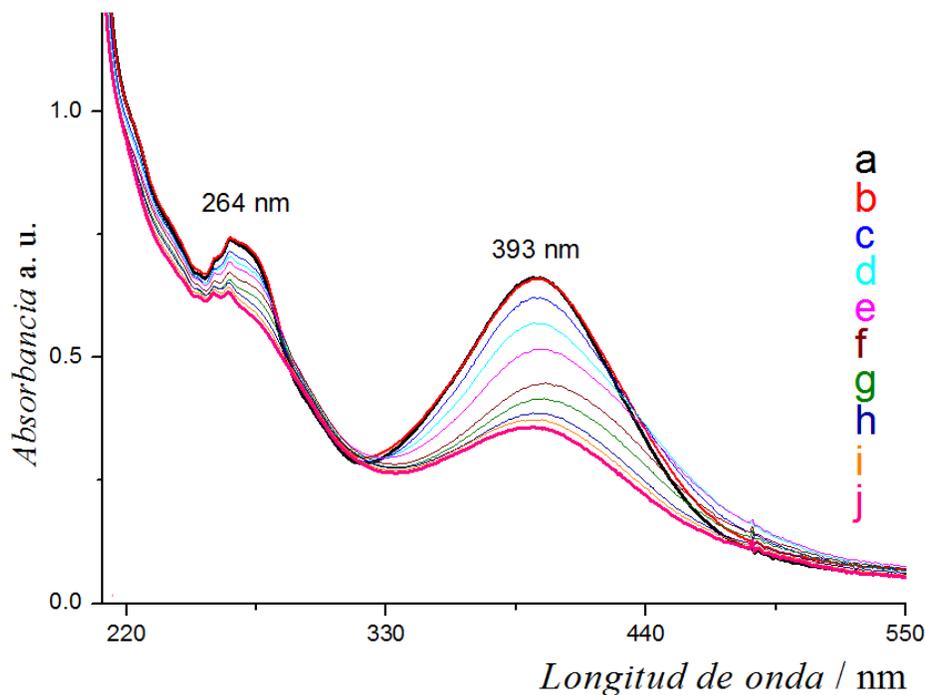


Figura 48. Espectro de absorción de una disolución de $5.5 \cdot 10^{-5}$ M Luteolin-7-O-glucosido a tiempo diferente estando expuesta a oxígeno: a) 0, b) 10 s, c) 400 s, d) 1000 s, e) 2710 s, f) 4900 s, g) 8500 s, h) 15700 s, i) 18700 s, j) 22300 s.

4.2.4. Culombimetría.

En el caso del luteolin-7-O-glucosido, se utilizó una disolución de concentración 0.009 mM preparada en una disolución de KCl 0.1M junto con 600 μ L de una disolución 0.2M de KOH.

Igual que con la quinina, se utilizó la voltamperometría cíclica para saber a qué potencial se producía la oxidación y de esta forma aplicarlo en la Culombimetría.

Este estudio se realizó de forma conjunta con el análisis cromatográfico por HPLC, por tanto, se explica en el siguiente apartado.

4.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución.

Se midieron 8 muestras. La mitad sometiéndolas a una electrolisis y la otra mitad dejándolas en viales abiertos y transparentes para observar el efecto del oxígeno sobre la disolución.

El disolvente estaba formado por 30mL de KCl 0.1M, 600µL de una disolución de KOH 0.2M. La concentración del luteolin-7-O-glucosido en el compartimento catódico era de 0.03mM.

La primera alícuota, **L0**, fue tomada antes de someter a la disolución a la electrolisis y es esta la misma que se deja abierta y se vuelve a analizar dos veces más a lo largo del día, **L0a**, **L0b**, y otras dos veces más al día siguiente **L0c**, **L0d**. En la Figura 49, A y B, se pueden observar los cromatogramas obtenidos y se aprecia que a medida que aumenta el tiempo de exposición al oxígeno aumenta la degradación del luteolin-7-O-glucosido y por lo tanto el número de picos que aparecen en el cromatograma. Además, si se tienen en cuenta los espectros de absorción (Figura 52) se observa que para los picos D1, D2, D6, D7 y D10 no contienen la banda de absorción del luteolin-7-O-glucosido a 347 nm. Esto coincide con los resultados de la espectrofotometría obtenidos durante el experimento para estudiar la estabilidad en presencia de oxígeno del luteolin-7-O-glucosido (Apartado 4.2.3.).

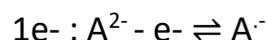
Otras alícuotas en las que se había eliminado el oxígeno atmosférico, fueron analizadas tras someterlas a la electrolisis a un potencial constante de 0.3V.

Usando la ecuación de Faraday (*Ecuación 1.*), se calcula el número de electrones que se intercambian durante la electrolisis. Se calcula que se necesitan 26mC para la transferencia de un electrón.

Durante la electrolisis se tomaron dos alícuotas:

- **L1**, con un paso de carga de 3mC, correspondiente a 0 electrones. Esta alícuota fue tomada al principio de la electrolisis.
- **L2**, con un paso de carga de 80mC, lo que corresponde a 3 electrones intercambiados.

Por último, al finalizar la electrolisis se tomó una última alícuota **L3** con un paso de carga de 82mC. Esta carga también corresponde a 3 electrones intercambiados. Ambas formas de disociación de la quinina fueron oxidadas.



En la Figura 51 se muestran los cromatogramas obtenidos para estas alícuotas, se observó que aparecían unos picos comunes (tanto en tiempos de retención como en los espectros correspondientes) a los que se obtuvieron al analizar las alícuotas en las que no se había realizado la electrolisis pero que se habían expuesto a la acción del oxígeno. Y además en las alícuotas expuestas al oxígeno el número de picos que se observó fue mayor; lo que significa que se originaron algunos compuestos que sólo tenían relación con la oxidación por parte del oxígeno y no con la oxidación electroquímica.

En las Figuras 52-54 se recogen los espectros de absorción para los diferentes picos. Como ya se ha indicado anteriormente, sería necesario continuar el estudio utilizando detectores de espectrometría de masas, para así poder llegar a determinar la estructura de los compuestos de la oxidación del luteolin-7-O-glucosido.

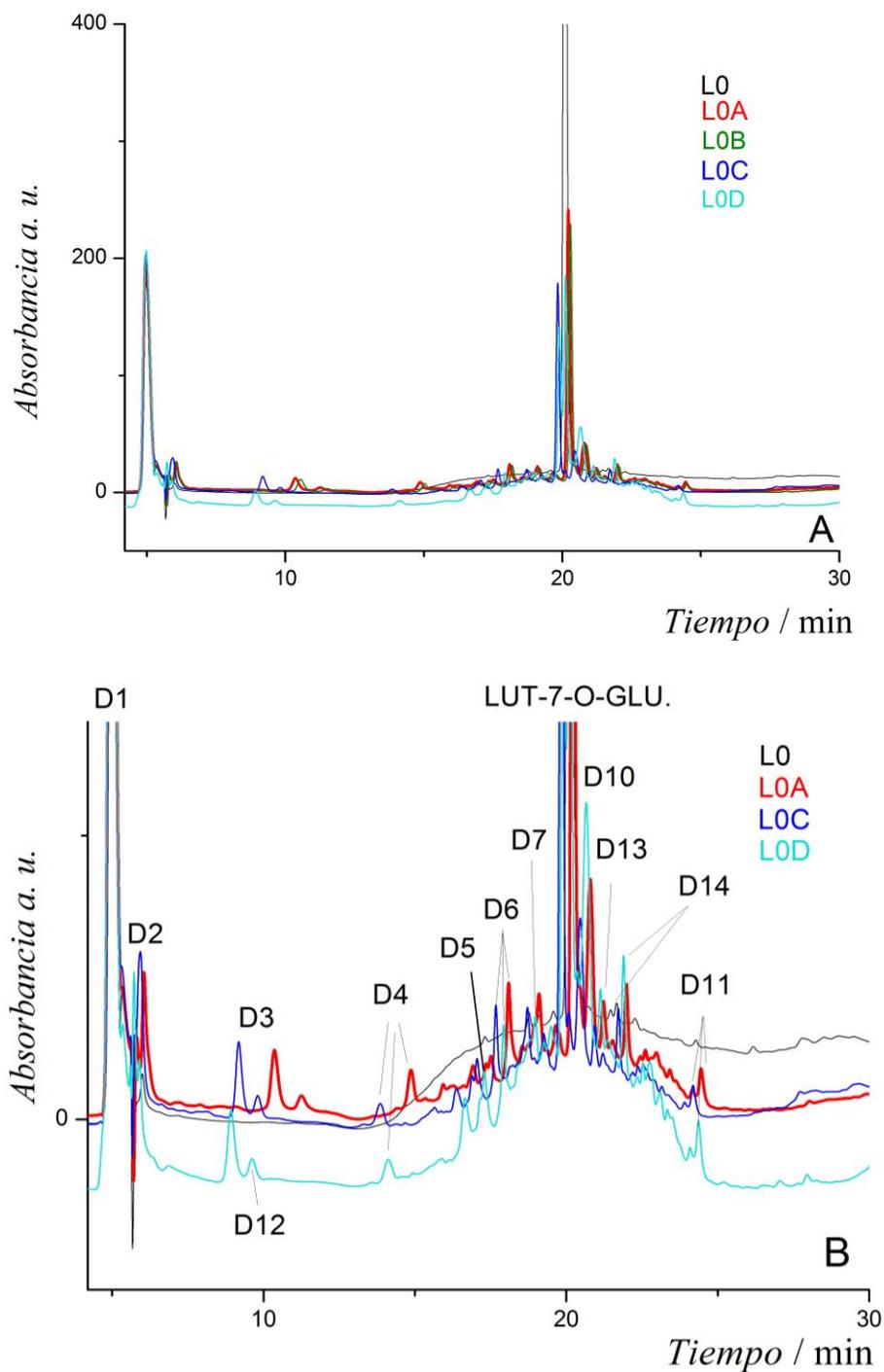


Figura 49. Cromatograma de las alicuotas oxidadas por oxígeno sin someterse a la electrolisis a una longitud de onda de 210nm. A) Cromatograma original, B) Cromatograma ampliado.

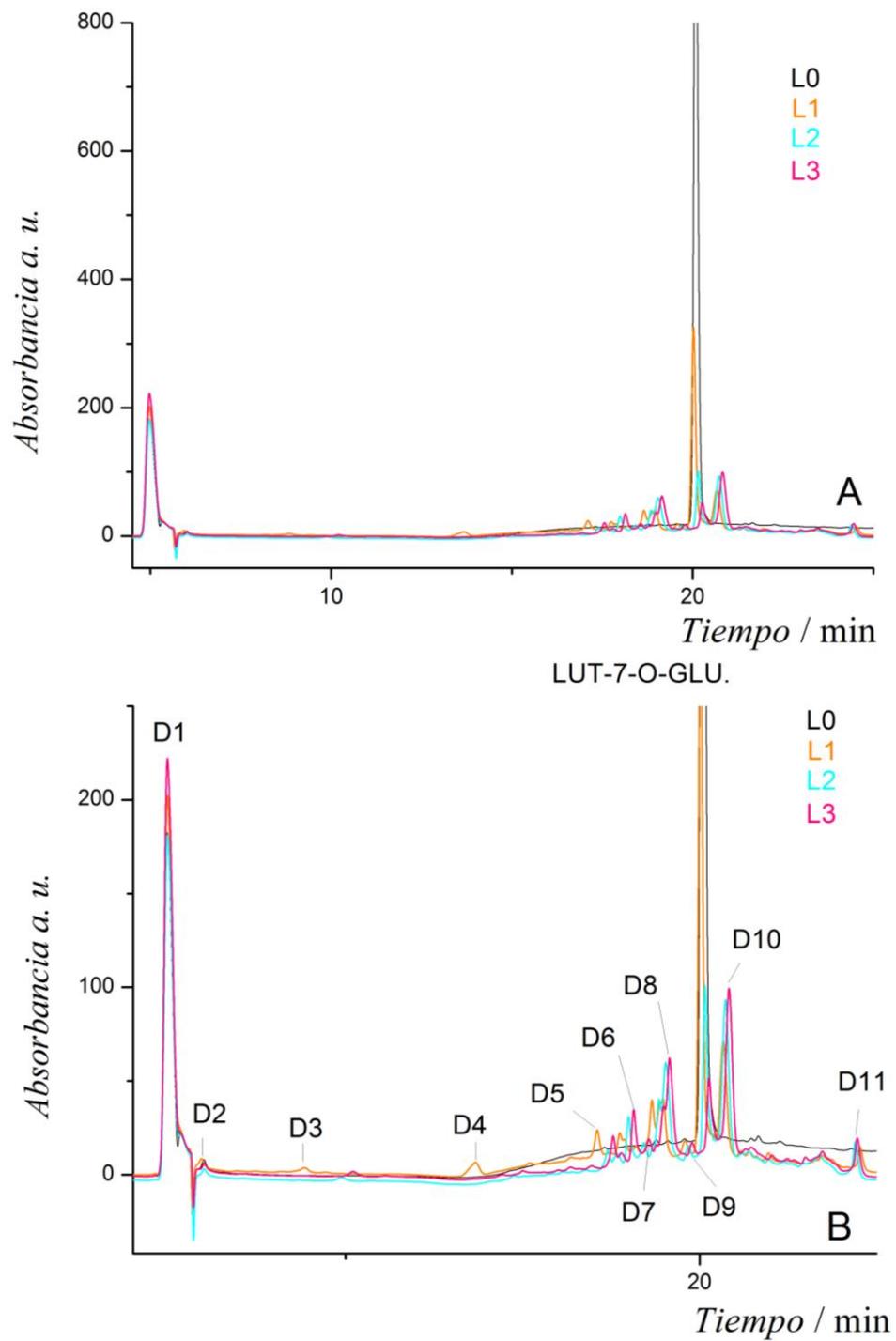


Figura 50. Cromatograma de las alicuotas despues de someterse a la electrolisis a una longitud de onda de 210nm. A) Cromatograma entero, B) Cromatograma ampliado.

Las Figuras 51, 52 y 53 muestran los espectros de absorción obtenidos de los diferentes picos señalizados en los cromatogramas anteriores, ya que en ambos casos coinciden los espectros (Figura 49 y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

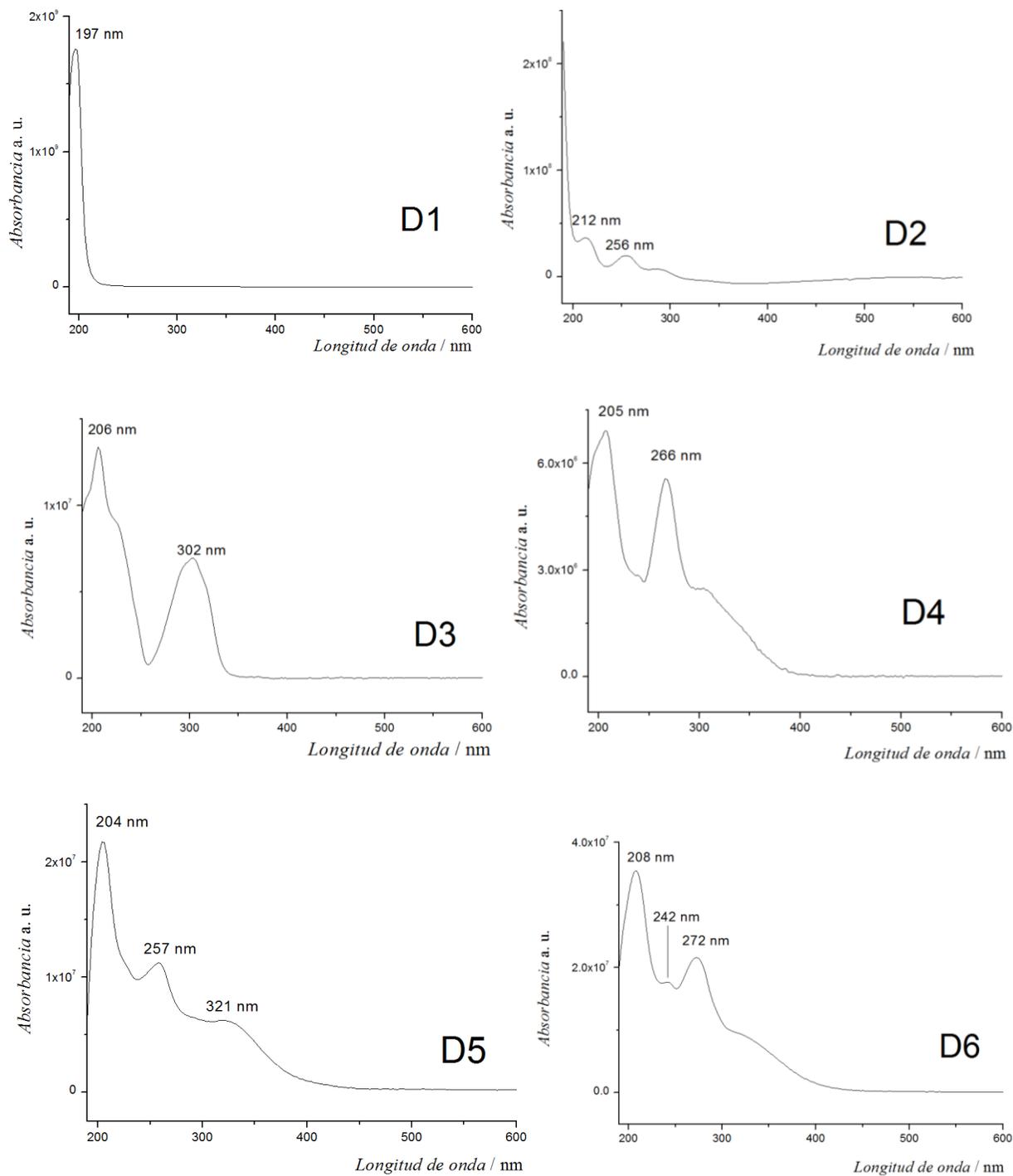


Figura 51. Espectros UV-Vis de los productos de la oxidación del Luteolin-7-O-Glucosido obtenidos por HPLC-DAD.

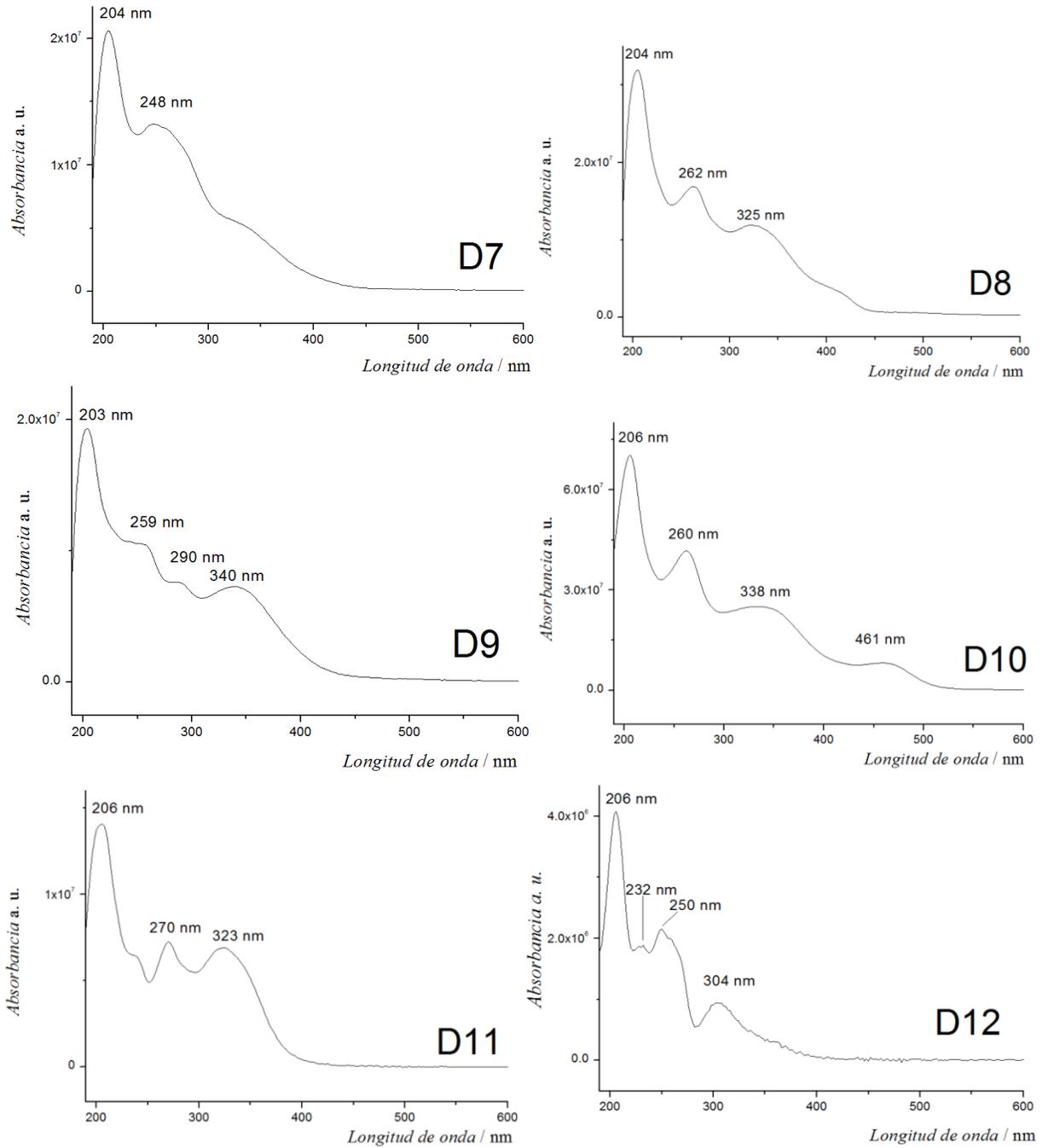


Figura 52. Espectros UV-Vis de los productos de la oxidación del Luteolin-7-O-Glucosido obtenidos por HPLC-DAD.

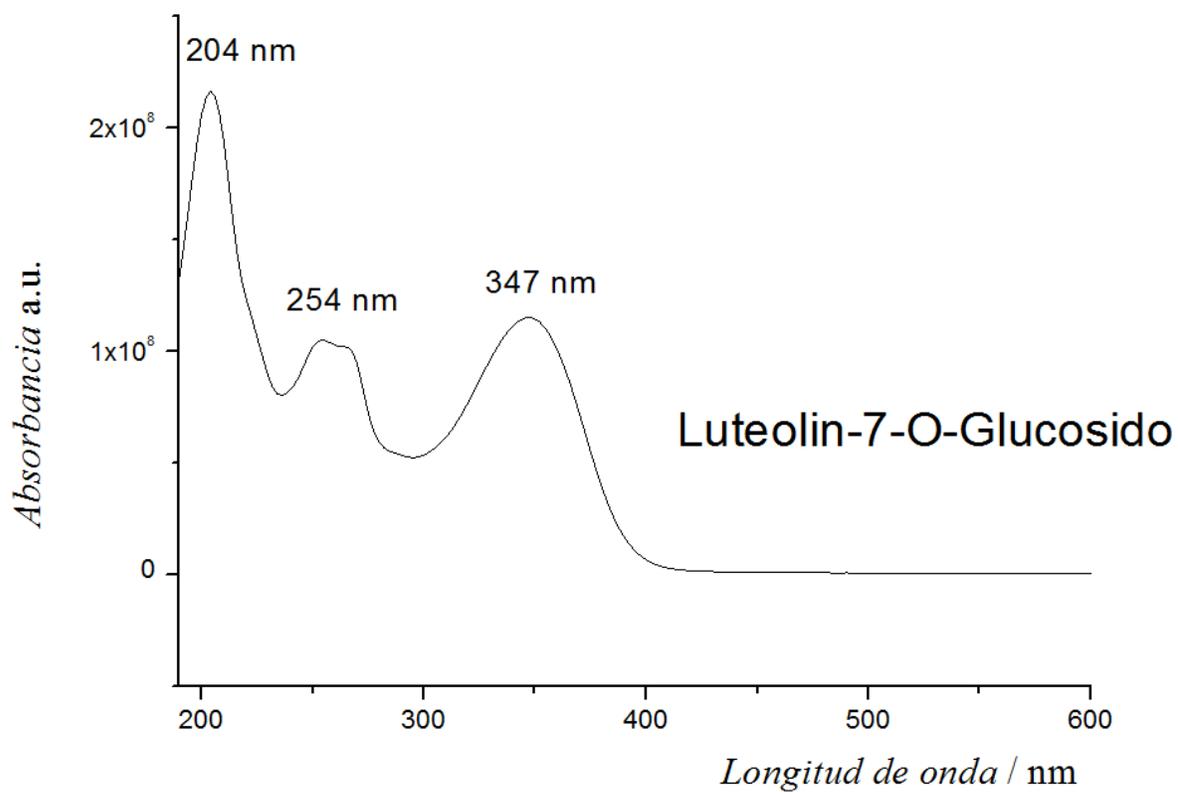
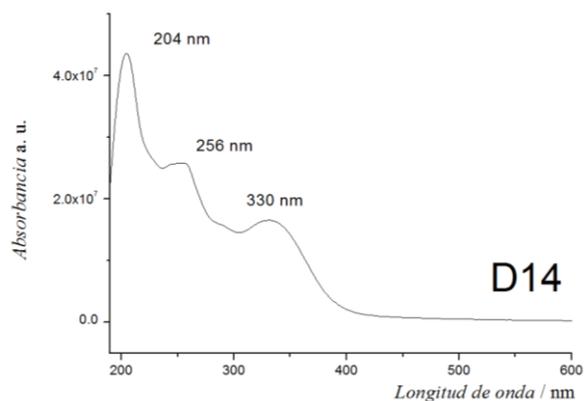
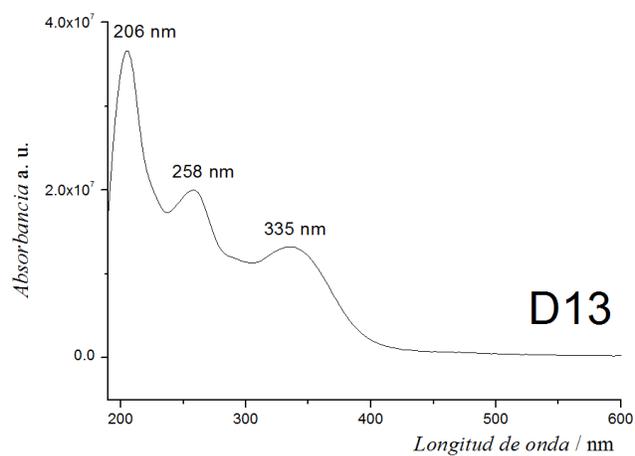


Figura 53. Espectros UV-Vis de los productos de la oxidación del Luteolin-7-O-Glucosido obtenidos por HPLC-DAD (D13, D14) y del Luteolin-7-O-Glucosido.

5. Conclusión

Se ha estudiado el comportamiento electroquímico de dos compuestos naturales bioactivos, la quinina y el luteolin-7-O-glucosido, y se ha encontrado que la oxidación de ambos compuestos está influenciada por sus propiedades acido-básicas.

En el caso de la quinina, las controversias en las publicaciones relativas al número de electrones que participan en el proceso de oxidación se explican en los resultados obtenidos. Las medidas de la voltamperometría cíclica y la coulombimetría muestran que dos electrones y dos protones participan en la oxidación de la quinina en el rango de pH de 2,1 hasta 10. Los resultados de la voltamperometría cíclica muestran que el mecanismo de oxidación de la quinina es complicado, la transferencia electrónica esta acoplada con reacciones químicas y sugiere que el esquema de reacción sea un mecanismo de tipo ECEC.

En los voltamperogramas cíclicos obtenidos en disoluciones acidas donde la molécula de quinina está protonada, se observa la aparición de un producto electroactivo (P). Además, los cálculos teóricos muestran que los orbitales HOMO están localizados en el grupo funcional etenil. Esto sugiere que la molécula protonada de la quinina sufre la oxidación del grupo etenil (Figura 55). Por otro lado, los voltamperogramas cíclicos en disoluciones alcalinas y neutras no muestran la aparición de ningún producto electroactivo. Los cálculos teóricos muestran que los orbitales HOMO están localizados en el anillo de quinolina y en el grupo metoxi. Esto significa que el electrón es extraído de esta parte y que, por tanto, la oxidación sigue el esquema propuesto en la Figura 56. Esta reacción sugiere que después de la oxidación, se produce una adición nucleófila por parte del agua, a las posiciones orto o para del grupo metoxi. Esto estaría de acuerdo con la literatura y con los cálculos realizados de las cargas parciales atómicas.

Aunque la quinina es estable en disoluciones alcalinas en presencia de oxígeno, cuando se realiza una electrolisis se han encontrado muchos productos de oxidación, cuyos espectros de absorción son mostrados en este trabajo.

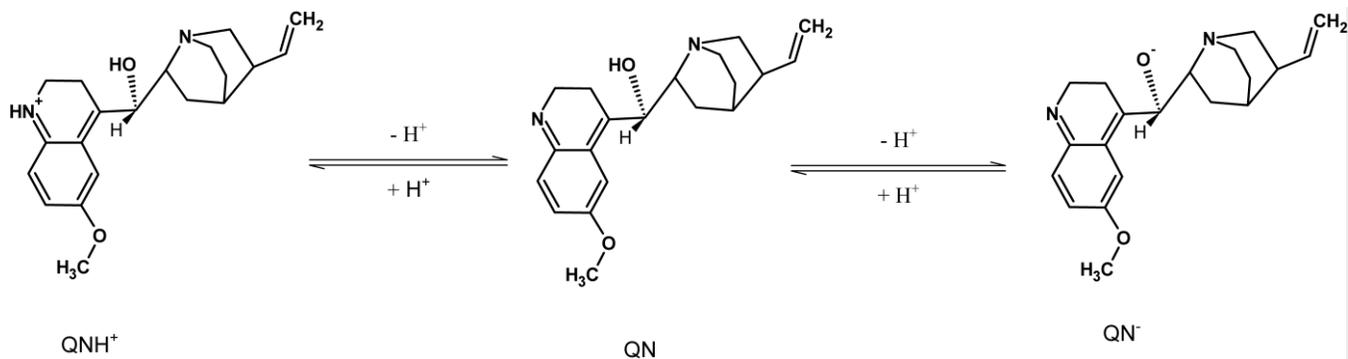


Figura 54. Disociación de la quinina en medio ácido (QNH^+) y en medio alcalino (QN^-).

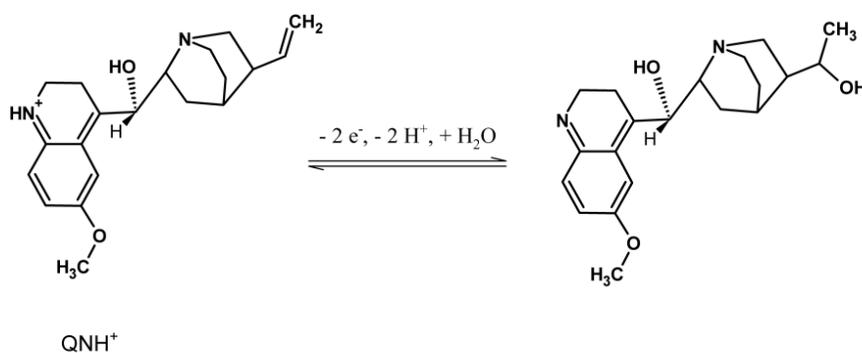


Figura 55. Esquema de la oxidación de la quinina y su posible producto en disoluciones ácidas.

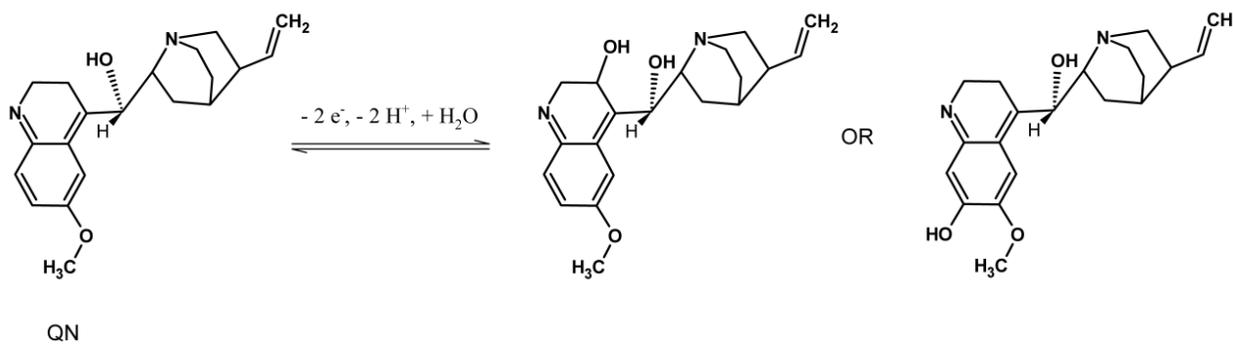


Figura 56. Esquema de la oxidación de la quinina y sus posibles productos en disoluciones neutras y alcalinas.

En el caso del Luteolin-7-O-glucosido los resultados de la voltamperometría cíclica muestran que el potencial de oxidación depende del pH, por tanto, los protones están involucrados en la oxidación. Los esquemas de reacción para el luteolin-7-O-glucosido coinciden con el mecanismo de tipo ECE seguido de adición de agua para formar un producto el cual es hidrolizado al finalizar la reacción. Esto coincide con los resultados obtenidos en espectroelectroquímica UV-Vis, que sugieren que es químicamente irreversible. En disoluciones ácidas y neutras se sugiere el mecanismo de oxidación presentado en el esquema de la Figura 57, y que coincide con el esquema de oxidación del Luteolin según la literatura⁶¹.

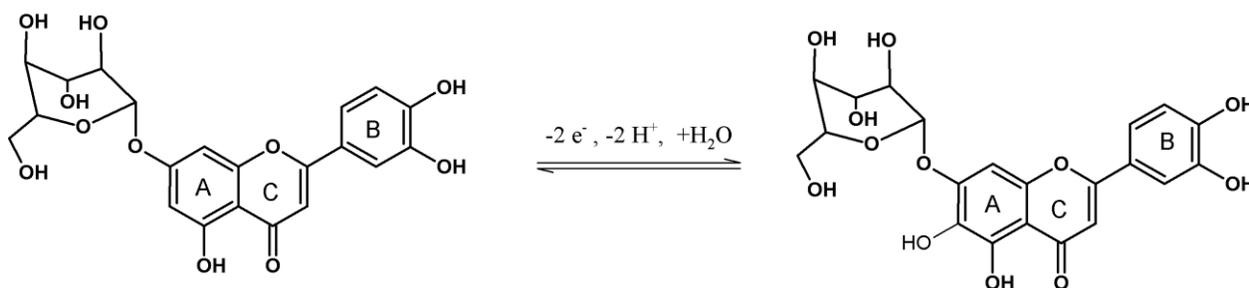


Figura 57. Esquema de la oxidación del Luteolin-7-O-Glucosido en disoluciones ácidas.

En disoluciones alcalinas las propiedades de oxidación son diferentes a las que el luteolin-7-O-glucosido muestra en disoluciones ácidas y neutras. Por otro lado, la oxidación es más fácil, es decir, el potencial de oxidación es menor, a mayores concentraciones. Lo más probable es que esto sea debido a que se produzca una reacción con el compuesto di aniónico formado por la oxidación.

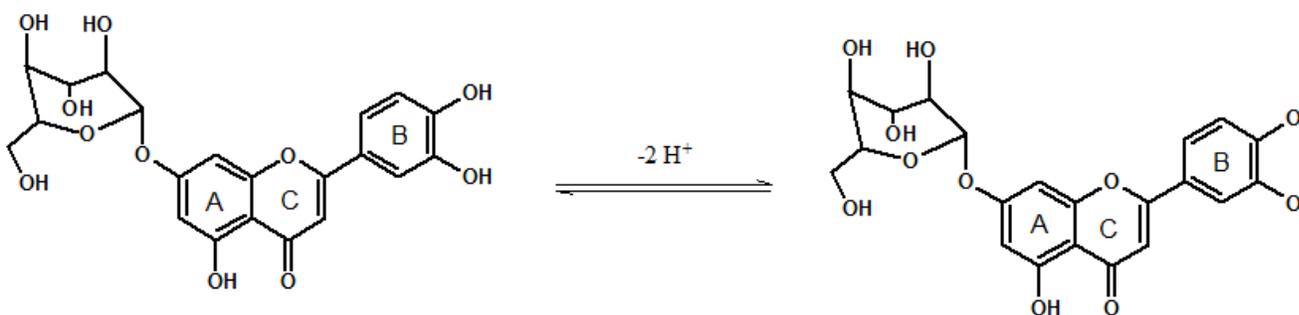


Figura 58. Disociación del Luteolin-7-O-Glucosido en disoluciones alcalinas.

En general, los mecanismos de oxidación electroquímica de la quinina y del luteolin-7-O-glucosido son complejos, la transferencia de electrones está acoplada con la transferencia de protones. Los productos de oxidación se han separado y detectado mediante HPLC-DAD y se han obtenido los correspondientes espectros.

- Parte del trabajo de espectro electroquímica UV-Vis del luteolin-7-O-glucosido ha sido presentado en una conferencia internacional en la Republica Checa. La contribución fue:
- Castano, A. G., Sokolová, R., Degano, I.: "On UV-Vis Spectroelectrochemistry of Luteolin-7-O-Glucoside." In: *Modern electrochemical methods XXXIX. [Sborník přednášek mezinárodní odborné konference XXXIX. Moderní elektrochemické metody]*. Srsenová L. – Best servis Ústí n. L., 2019 - (Navrátil, T.; Fojta, M.; Schwarzová, K.) Jetřichovice (CZ), May 20-24, 2019, p. 31-35. **ISBN 978-80-905221-7-6**.

6. Referencias

1. Baroni, A., Paoletti, I., Ruocco, E., Ayala, F., Corrado, F., Wolf, R., Tufano, M.A. and Donnarumma, G., 2007. Antiviral effects of quinine sulfate on HSV-1 HaCat cells infected: analysis of the molecular mechanisms involved. *Journal of dermatological science*, 47(3), pp.253-255.
2. Wolf, R., Wolf, D. and Ruocco, V., 2000. Antimalarials: unapproved uses or indications. *Clinics in dermatology*, 18(1), pp.17-35.
3. Paton, N.I. and Aboulhab, J., 2005. Hydroxychloroquine, hydroxyurea and didanosine as initial therapy for HIV-infected patients with low viral load: safety, efficacy and resistance profile after 144 weeks. *HIV medicine*, 6(1), pp.13-20.
4. Chavatte, J.M., Chiron, F., Chabaud, A. and Landau, I., 2007. Probable speciations by "host-vector fidelity": 14 species of Plasmodium from magpies. *Parasite (Paris, France)*, 14(1), pp.21-37.
5. Paton, N.I. and Aboulhab, J., 2005. Hydroxychloroquine, hydroxyurea and didanosine as initial therapy for HIV-infected patients with low viral load: safety, efficacy and resistance profile after 144 weeks. *HIV medicine*, 6(1), pp.13-20.
6. Huston, M. and Levinson, M., 2006. Are one or two dangerous? Quinine and quinidine exposure in toddlers. *The Journal of emergency medicine*, 31(4), pp.395-401.
7. Stork, G., Niu, D., Fujimoto, A., Koft, E.R., Balkovec, J.M., Tata, J.R. and Dake, G.R., 2001. The first stereoselective total synthesis of quinine. *Journal of the American Chemical Society*, 123(14), pp.3239-3242.
8. García de Castro, J. C., Sánchez, M. J., Rodríguez Delgado, M. A. and Díaz Romero, C. 1993. 4th order derivative spectrophotometric determination of quinine in soft drinks. *Microchimica Acta* 110, no. 4-6 pp. 263-268.
9. Zheng, X.Y., Peng, Y. and Ren, D.Q., 2000. State Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China: Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English edition 2000). Vol. 1.
10. Li, B., Zhang, Z. and Wu, M., 2000. Flow-injection chemiluminescence determination of quinine using on-line electrogenerated cobalt (III) as oxidant. *Talanta*, 51(3), pp.515-521.
11. Reijenga, J.C., Aben, G.V.A., Lemmens, A.A.G., Verheggen, T.P., De Bruijn, C.H.M.M. and Everaerts, F.M., 1985. Determination of quinine in beverages, pharmaceutical preparations and urine by isotachopheresis. *Journal of Chromatography A*, 320(1), pp.245-252.
12. Zhan, X.M., Liu, L.H. and Gao, Z.N., 2011. Electrocatalytic oxidation of quinine sulfate at a multiwall carbon nanotubes-ionic liquid modified glassy carbon electrode and its electrochemical determination. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 15(6), pp.1185-1192.
13. Ortega-Algar, S., Ramos-Martos, N. and Molina-Díaz, A., 2004. Fluorimetric flow-through sensing of quinine and quinidine. *Microchimica Acta*, 147(4), pp.211-217.
14. Gong, Z. and Zhang, Z., 1997. Cyclodextrin-based optosensor for the determination of quinine. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 357(8), pp.1093-1096.
15. Nuijens, J.M. and van der Velden, H., 1973. Rapid fluorimetric determination of quinine in softdrinks. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 153(2), pp.97-98.
16. van Gils, W.F. and Hidskes, G.G., 1972. Rapid spectrophotometric determination of quinine in tonic waters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 148(2), pp.89-91.
17. Yebra, M.C. and Cespon, R.M., 2000. Automatic determination of quinine by atomic absorption spectrometry. *Microchemical journal*, 65(1), pp.81-86.
18. Issa, Y.M., Ibrahim, H., Shoukry, A.F. and Mohamed, S.K., 1995. Indirect atomic absorption and atomic emission spectrometric determination of antazoline, hydralazine and amiloride hydrochlorides and quinine sulphate. *Microchimica Acta*, 118(3-4), pp.257-263.
19. Zhan, X.M., Liu, L.H. and Gao, Z.N., 2011. Electrocatalytic oxidation of quinine sulfate at a multiwall carbon nanotubes-ionic liquid modified glassy carbon electrode and its electrochemical determination. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 15(6), pp.1185-1192.
20. Soyinka, J.O., Onyeji, C.O. and Omoruyi, S.I., 2009. Simultaneous liquid chromatographic analysis of ritonavir, quinine and 3-hydroxyquinine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 877(4), pp.441-445.
21. Damien, R., Daval, S., Souweine, B., Deteix, P., Eschalier, A. and Coudoré, F., 2006. Rapid gas chromatography/mass spectrometry quinine determination in plasma after automated solid-phase.

-
22. Mirghani, R.A., Ericsson, Ö., Cook, J., Yu, P. and Gustafsson, L.L., 2001. Simultaneous determination of quinine and four metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754(1), pp.57-64.
23. Ibrahim, H., Bouajila, J., Siri, N., Rozing, G., Nepveu, F. and Couderc, F., 2007. Very small injected samples to study chloroquine and quinine in human serum using capillary-LC and native fluorescence. *Journal of Chromatography B*, 850(1-2), pp.481-487.
24. Buleandra, M., Rabinca, A.A., Cheregi, M.C. and Ciucu, A.A., 2018. Rapid voltammetric method for quinine determination in soft drinks. *Food chemistry*, 253, pp.1-4.
25. Awasthi, S., Srivastava, A. and Singla, M.L. 2011. Voltammetric determination of citric and quinine hydrochloride using polypyrrole-pentacyanonitrosylferrate/platinum electrode. 161, pp. 1707-1712.
26. Geto, A., Amare, M., Tessema, M. and Admassie, S., 2012. Polymer-modified glassy carbon electrode for the electrochemical detection of quinine in human urine and pharmaceutical formulations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(2), pp.525-530.
27. Schütz, K., Kammerer, D.R., Carle, R. and Schieber, A., 2005. Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 19(2), pp.179-186.
28. Moiteiro, C., Gaspar, H., Rodrigues, A.I., Lopes, J.F. and Carnide, V., 2008. HPLC quantification of dye flavonoids in *Reseda luteola* L. from Portugal. *Journal of separation science*, 31(21), pp.3683-3687.
29. Hofenk de Graaff, J.H., Roelofs, W.G. and Bommel, M.R.V., 2004. *The colourful past: origins, chemistry and identification of natural dyestuffs*.
30. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), pp.933-956.
31. Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I. and Yoshikawa, M., 2003. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(9), pp.1995-2000.
32. Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D.S., Drzewiecki, G. and Middleton Jr, E., 1991. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer letters*, 56(2), pp.147-152.
33. Papouchado, L., Petrie, G. and Adams, R.N., 1972. Anodic oxidation pathways of phenolic compounds: Part I. Anodic hydroxylation reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 38(2), pp.389-395.
34. Ryan, M.D., Yueh, A. and Chen, W.Y., 1980. The electrochemical oxidation of substituted catechols. *Journal of The Electrochemical Society*, 127(7), pp.1489-1495.
35. Bailey, S.I., Ritchie, I.M. and Hewgill, F.R., 1983. The construction and use of potential-pH diagrams in organic oxidation-reduction reactions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (5), pp.645-652.
36. Laviron, E., 1984. Electrochemical reactions with protonations at equilibrium: part X. The kinetics of the p-benzoquinone/hydroquinone couple on a platinum electrode. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, 164(2), pp.213-227.
37. Sokolová, R., Degano, I., Hromadová, M., Bulíčková, J., Gál, M. and Valášek, M., 2010. Oxidation pathways of natural dye hematoxylin in aqueous solution. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 75(11), pp.1097-1114.
38. Costentin, C., Louault, C. and Robert, M., 2008. Evidence for Concerted Proton-Electron Transfer in the Electrochemical Oxidation of Phenols with Water As Proton Acceptor. Tri-tert-butylphenol. *Journal of the American Chemical Society*, 130(47), pp.15817-15819.
39. Musialik, M., Kuzmich, R., Pawłowski, T.S. and Litwinienko, G., 2009. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *The Journal of organic chemistry*, 74(7), pp.2699-2709.
40. Jacq, J., 1971. SQUARES SCHEME-ESTABLISHMENT AND DISCUSSION OF GENERAL EQUATION FOR INTENSITY-POTENTIAL CURVE IN STATIONARY FLOW AND CONVECTIVE DIFFUSION. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 29(1), p.149.

-
41. Ramešová, Š., Sokolová, R., Degano, I., Bulíčková, J., Žabka, J. and Gál, M., 2012. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(2), pp.975-982.
42. Bettinger, C. and Zimmermann, H.W., 1991. New investigations on hematoxylin, hematein, and hematein-aluminium complexes. *Histochemistry*, 96(3), pp.215-228.
43. Liu, A., Zhang, S., Huang, L., Cao, Y., Yao, H., Chen, W. and Lin, X., 2008. Electrochemical oxidation of luteolin at a glassy carbon electrode and its application in pharmaceutical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(6), pp.745-748.
44. Filipiak, M., 2002. Electrochemical analysis of polyphenolic compounds. In *Analytical Sciences/Supplements Proceedings of IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2001 (ICAS 2001)* (pp. i1667-i1670). The Japan Society for Analytical Chemistry.
45. Nilsson, A., Ronlán, A. and Parker, V.D., 1973. Anodic oxidation of phenolic compounds. Part III. Anodic hydroxylation of phenols. A simple general synthesis of 4-alkyl-4-hydroxycyclo-hexa-2, 5-dienones from 4-alkylphenols. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, pp.2337-2345.
46. Bailey, S.I., Ritchie, I.M. and Hewgill, F.R., 1983. The construction and use of potential-pH diagrams in organic oxidation-reduction reactions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (5), pp.645-652.
47. Zare, H.R., Namazian, M. and Nasirizadeh, N., 2005. Electrochemical behavior of quercetin: Experimental and theoretical studies. *Journal of electroanalytical chemistry*, 584(2), pp.77-83.
48. He, J.B., Yu, C.L., Duan, T.L. and Deng, N., 2009. In situ spectroelectrochemical analysis of quercetin in acidic medium. *Analytical Sciences*, 25(3), pp.373-377.
49. Musialik, M., Kuzmicz, R., Pawłowski, T.S. and Litwinienko, G., 2009. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *The Journal of organic chemistry*, 74(7), pp.2699-2709.
50. Papouchado, L., Petrie, G. and Adams, R.N., 1972. Anodic oxidation pathways of phenolic compounds: Part I. Anodic hydroxylation reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 38(2), pp.389-395.
51. Brett, A.M.O. and Ghica, M.E., 2003. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 15(22), pp.1745-1750.
52. Hendrickson, H.P., Kaufman, A.D. and Lunte, C.E., 1994. Electrochemistry of catechol-containing flavonoids. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 12(3), pp.325-334.
53. Nematollahi, D. and Malakzadeh, M., 2003. Electrochemical oxidation of quercetin in the presence of benzenesulfonic acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 547(2), pp.191-195.
54. Sokolová, R., Degano, I., Ramešová, Š., Bulíčková, J., Hromadová, M., Gál, M., Fiedler, J. and Valášek, M., 2011. The oxidation mechanism of the antioxidant quercetin in nonaqueous media. *Electrochimica Acta*, 56(21), pp.7421-7427.
55. Dangles, O., Fargeix, G. and Dufour, C., 1999. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (7), pp.1387-1396.
56. Steenken, S. and Neta, P., 1982. One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and aminophenols and related compounds of biological interest. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(18), pp.3661-3667.
57. Osman, A., Makris, D.P. and Kefalas, P., 2008. Investigation on biocatalytic properties of a peroxidase-active homogenate from onion solid wastes: An insight into quercetin oxidation mechanism. *Process Biochemistry*, 43(8), pp.861-867.
58. Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R., 2017. *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
59. Kissinger, P.T. and Heineman, W.R., 1983. Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60(9), p.702.
60. Zoski, C.G., "Handbook of electrochemistry", New Mexico State, University Department of Chemistry and Biochemistry Las Cruces, New Mexico, USA, pp.114-143.
61. Ramešová, Š., Sokolová, R., Tarábek, J. and Degano, I., 2013. The oxidation of luteolin, the natural flavonoid dye. *Electrochimica Acta*, 110, pp.646-654.
62. Bard A. J., Faulkner L. R.: *Electrochemical methods. Fundamental and applications*. 2nd edition. John Wiley and Sons, Inc. New York, 2001.
63. Savéant, J.M., 2006. *Elements of molecular and biomolecular electrochemistry: an electrochemical approach to electron transfer chemistry* (Vol. 13). John Wiley & Sons.