



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTADO DEL ARTE DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE  
ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO Y ORO  
PARA SU USO DENTRO DE LA VOLTAMPEROMETRÍA  
DE PELÍCULA DE PROTEÍNA**

*Trabajo Monográfico de Actualización*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA**

**PRESENTA**

**WENDY LYSSET SILVA LUJAN**

**TUTOR**

**DR. ERNESTO CARRILLO NAVA**

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE** Prof.: Aurora de los Ángeles Ramos Mejía

**VOCAL** Prof.: María Cristina Torres Lomeli

**SECRETARIO** Prof.: Ernesto Carrillo Nava

**1° SUPLENTE** Prof.: Sandra Cornejo Tobón

**2° SUPLENTE** Prof.: Alejandro Marín Medina

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Laboratorio 308 de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica,  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. ERNESTO CARRILLO NAVA**

## **SUSTENTANTE:**

---

**WENDY LYSSET SILVA LUJAN**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la valiosa educación que recibí de ella.

A la Facultad de Química, por la excelente formación profesional que me brindó en sus aulas.

Al Dr. Ernesto Carrillo Nava, por su apoyo y dedicación durante la construcción de este trabajo. Gracias por brindarme la oportunidad de trabajar nuevamente bajo su mentoría.

A los miembros del jurado, quienes se tomaron el tiempo de enriquecer mi trabajo con sus valiosas aportaciones.

A mi mamá, por el incontable esfuerzo que realizó para que yo siguiera estudiando, el apoyo y amor infinito.

A mi papá, quien con su crianza y ejemplo logró sembrar dentro de mí todo lo que soy ahora. Siempre vivirás en mi corazón, y espero que donde sea que te encuentres, estés orgulloso de mí.

A mi hermana, para quien no tengo palabras suficientes para agradecerle todo lo que ha hecho, y sigue haciendo, por mí y mi bienestar. Mi amor y admiración por ti perdurarán toda la vida. A Jhon Tapia, mi más profundo agradecimiento por todo el apoyo, por las risas, los consejos, los recuerdos y los momentos.

A mi gran amigo y compañero de carrera M. en C. Jorge Ruvalcaba, con quien he compartido experiencias inolvidables a través de estos años. Gracias infinitas por tu invaluable amistad. Y a mi querida amiga Q. Ángela Selva, por su gran amistad y por todos los bellos momentos compartidos a su lado en la carrera y durante la pandemia.

A mis compañeras de danza, Leinani, Puamana, Lani, Pua Melia y Ñnue, por no soltarme cuando más lo necesitaba, estaré eternamente agradecida con ustedes por todo lo que hicieron por mí.

A mi compañero de vida Biol. Alan Ruiz, por su amor y cariño incondicional, su paciencia, motivación y enseñanza constante para alcanzar este logro, por impulsarme a nuevas metas y acompañarme en ellas. Gracias por mostrarme lo bella que es la vida junto a ti.

# ÍNDICE

<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	8
<b>1.1. Voltamperometría cíclica</b> .....	8
1.1.1. Celdas electroquímicas .....	11
1.1.2. Disolución electrolítica .....	12
1.1.3. Electrodo de trabajo.....	14
1.1.4. Electrodo de referencia .....	16
1.1.5. Electrodo auxiliar .....	17
<b>1.2. Proteínas</b> .....	19
1.2.1. Aminoácidos.....	19
1.2.2. Propiedades físicas y químicas de los aminoácidos .....	20
1.2.3. Enlace peptídico.....	27
1.2.4. Estructura de las proteínas .....	28
<b>1.3. Funcionalización de conductores eléctricos</b> .....	34
1.3.1. Electrodo químicamente modificados .....	34
1.3.2. Tipos de funcionalización de electrodos .....	35
1.3.3. Voltamperometría de película de proteína .....	39
1.3.4. Modificación de electrodos para electroquímica de proteínas .....	43
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	48
2.1. Objetivo general.....	48
2.2. Objetivos particulares .....	48
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	49
<b>4. REVISIÓN Y DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>4.1. Funcionalización de electrodos de carbón vítreo con proteínas</b> .....	51
4.1.1. Electrodo químicamente modificados con diversas proteínas .....	52
4.1.2. Electrodo químicamente modificados con hemoglobina .....	58
4.1.3. Electrodo químicamente modificados con mioglobina.....	67
4.1.4. Electrodo químicamente modificados con enzimas .....	72
<b>4.2. Funcionalización de electrodos de Au con proteínas</b> .....	74
4.2.1. Electrodo químicamente modificados con diversas proteínas .....	74
4.2.2. Electrodo químicamente modificados con hemoglobina y mioglobina.....	88
4.2.3. Electrodo químicamente modificados con citocromo c .....	93

4.2.4. Electroodos químicamente modificados con enzimas .....	104
5. CONCLUSIONES.....	109
6. REFERENCIAS.....	112

## INTRODUCCIÓN

El origen del término “estado del arte” surgió en la década de los ochenta como una estrategia que pudiera hacer visible lo sabido, conocido o trabajado sobre determinado campo de conocimiento [1]. Este concepto tiene diferentes definiciones y una de ellas plantea al estado del arte como una metodología de investigación que permite el estudio del conocimiento acumulado [2,3], cuyo enfoque es recuperar para describir, a través de inventarios bibliográficos donde se realiza una revisión de fuentes y documentos, y su resultado final es la creación de una bibliografía detallada, sistematizada y consistente, que cumpla con un nivel descriptivo del estado de conocimiento de un tema específico [4].

Para la elaboración de un estado del arte es importante delimitar la línea de tiempo que se va a considerar para la búsqueda de información. Pues se plantea que el objetivo de esta metodología es recopilar información de materiales escritos entre un intervalo de tiempo determinado, con el fin de reconocer lo ya elaborado y esclarecer el panorama de investigación. En este trabajo se definió el intervalo de tiempo a partir de 1900 hasta la fecha actual. Además, este estado más allá de informar aspira a difundir la información en relación con una temática particular [5].

Bajo esta visión, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva acerca de la funcionalización de electrodos de carbón vítreo y oro por medio de la adsorción de proteínas. Uno de los aspectos que revela la importancia de la técnica denominada voltamperometría de película de proteína radica en que con ella es posible caracterizar el comportamiento electroquímico de una proteína, pues una vez que el biopolímero se adsorbe a la superficie del conductor y, haciendo uso de técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica u otras, se pueden esclarecer los procesos de óxido-reducción que se llevan a cabo dentro del biomaterial. Sin embargo, esta técnica se desarrolla cada vez más y actualmente, no sólo ayuda al estudio de la transferencia electrónica entre proteínas y electrodos, sino que haciendo uso de electrodos funcionalizados también es posible investigar las interacciones de los biopolímeros con otros sustratos cuando se encuentra

inmovilizada al conductor, por mencionar un ejemplo. Esto, junto con una gran cantidad de aplicaciones enfocadas a sistemas biológicos principalmente, convierte a la voltamperometría de película de proteína en un área de conocimiento desafiante y prometedora para la ciencia.

Para la elaboración de esta investigación se recopiló información sobre el tópico de interés en tres bases de datos de literatura científica: *Scifinder<sup>n</sup>*, *Web of Science* y *Scopus*, se accedió a los textos para su lectura, se sintetizó y clasificó la información obtenida. Finalmente, tras la depuración de esta literatura, se describieron detalladamente en este trabajo 15 diferentes técnicas encontradas para electrodos de carbón vítreo, de un total de 50 documentos recuperados; y 24 técnicas, de un total de 47 textos recolectados para electrodos de oro. Dentro de los cuales se llevó a cabo la funcionalización de los electrodos mediante el fenómeno de adsorción de diferentes proteínas, incluidas: hidrofobina, seroalbúmina, metalotioneína, estreptavidina, hemoglobina, mioglobina, citocromo c, azurina, concanavalina A, ferritina, avadina, proteínas de choque térmico, proteínas porcinas, y enzimas como: glucosa oxidasa, peroxidasa, lacasa, ascorbato oxidasa o citocromo c oxidasa.



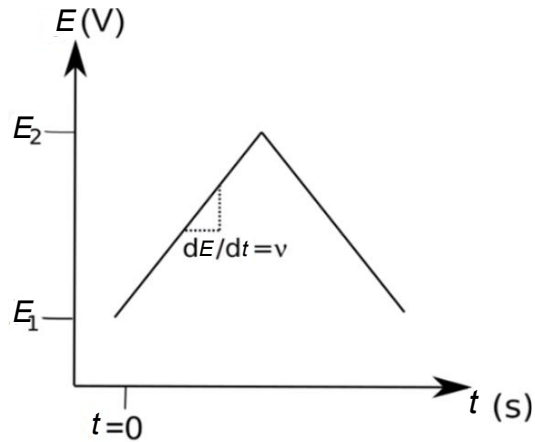
## 1. ANTECEDENTES

Las reacciones de óxido-reducción se encuentran presentes en la vida cotidiana con mayor frecuencia de lo que imaginamos, por lo que la electroquímica representa una poderosa herramienta para analizar procesos que involucran transferencia de electrones. La electroquímica es la rama de la química que se concentra en el estudio de la relación que existe entre efectos químicos y eléctricos. Aborda el estudio de los cambios químicos provocados por el paso de una corriente eléctrica y la obtención de energía eléctrica a través de una reacción química, por lo cual está presente dentro una amplia variedad de áreas como la exploración de la reactividad de compuestos orgánicos e inorgánicos, de sistemas bioquímicos y biológicos, el estudio de diferentes fenómenos tales como la corrosión, entre otras.

### 1.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica, que en adelante se denotará como VC, es una popular técnica electroquímica comúnmente empleada para obtener información acerca del comportamiento de óxido-reducción de diferentes especies. Juega un papel valioso en el esclarecimiento de mecanismos de reacción o bien, permite determinar parámetros termodinámicos, entre otras.

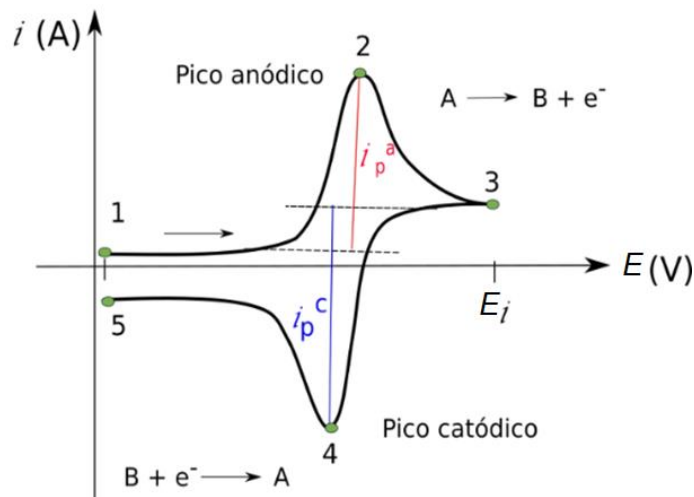
Para un experimento electroquímico el principio general se basa en aplicar una perturbación al sistema y en consecuencia obtener una respuesta [6], teniendo como objetivo extraer información termodinámica, cinética o analítica de este; dependiendo el tipo de perturbación que se aplique, será la respuesta que se observe. En el caso de la VC, la perturbación al sistema se realiza aplicando un potencial ( $E$ ) que cambia con el tiempo ( $t$ ). (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de potencial aplicado como función del tiempo para VC. Donde  $E$  representa al potencial (V),  $t$  es el tiempo (s) y  $v$  es la velocidad de barrido ( $V s^{-1}$ ).

El potencial comienza en un valor inicial  $E_1$  seleccionado previamente en donde las especies químicas de estudio no se oxiden o reduzcan inicialmente. Enseguida, se barre el potencial de manera lineal hasta un valor de potencial  $E_2$  o potencial de inversión ( $E_i$ ), en donde se invierte la dirección de exploración y se regresa generalmente al valor de potencial de inicio. Como podemos observar, en la figura 1, es una señal triangular, cuya pendiente es la velocidad de barrido ( $v$ ) y puede repetirse en un número de ciclos ( $n$ ) necesarios para extraer la información fisicoquímica del sistema bajo estudio.

La respuesta consecuente al potencial aplicado es la construcción de una gráfica de intensidad de corriente contra potencial ( $i$  vs  $E$ ), conocida como voltamperograma (Figura 2) [7].



**Figura 2.** Características importantes de un voltamperograma cíclico de acuerdo con la notación sugerida por IUPAC, para la oxidación de la especie A a B, donde  $i$  representa a la intensidad de corriente (A),  $E$  es el potencial (V),  $i_p^a$  es la corriente de pico anódico y  $i_p^c$  representa a la corriente de pico catódico.

La forma peculiar que adoptan los voltamperogramas es el reflejo de los cambios en la concentración del analito cerca del electrodo a través del tiempo. Para ilustrar el ejemplo de la figura 2, se considera un sistema de óxido reducción reversible  $A \rightleftharpoons B + e^-$ . Se realiza un barrido anódico hacia potenciales positivos desde el punto 1 al punto 3, donde la especie A se agota constantemente cerca del electrodo a medida que se oxida para obtener la especie B. En el punto 2 se observa la máxima corriente de oxidación, denominada corriente de pico anódico ( $i_p^a$ ) donde en la superficie del electrodo ya se ha agotado prácticamente toda la concentración de A y se ha acumulado la especie reducida B, provocando que el transporte de A desde el seno de la disolución hasta el electrodo sea lento y en consecuencia se observe una disminución de corriente del punto 2 al 3. Una vez llegado al punto 3 o potencial de inversión, se cambia la dirección del potencial hacia un barrido catódico del punto 3 al punto 5, donde ahora la especie oxidada B acumulada en la superficie del electrodo se reduce a la especie A, hasta una corriente máxima ahora llamada corriente de pico catódico ( $i_p^c$ ) en el punto 4 [8].

Es necesario subrayar que en algunas ocasiones al realizar estudios electroquímicos se hace uso de estándares electroquímicos para diferentes análisis. Los estándares electroquímicos son sustancias que además de poseer un carácter de óxido-reducción bien conocido, son capaces de transportar carga eléctrica sin sufrir modificaciones. Las características de este tipo de sustancias que permiten considerarlas como sistema de referencia incluyen:

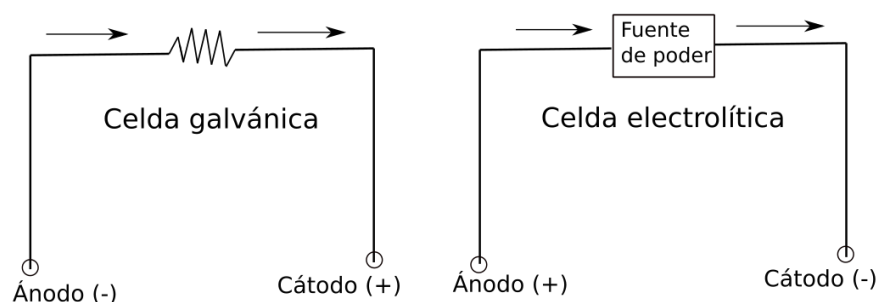
- La reacción electroquímica que presenta se desarrolla bajo un mecanismo de reacción simple, lo que evita que las señales electroquímicas sean complicadas de interpretar.
- Tener un potencial normal reproducible en distintos disolventes.
- Poseer la misma energía de solvatación en distintos disolventes.
- La reacción electroquímica es reversible con una cinética rápida.

El par redox ferrocianuro/ferricianuro  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  con potencial de reducción de 0.36 V vs ENH es un sistema comúnmente utilizado como estándar electroquímico, debido a su estabilidad y a su alta solubilidad en disoluciones. Este compuesto ha sido ampliamente estudiado y es considerado como modelo de una reacción electroquímica reversible, sin efectos complicados asociados al mecanismo de su reacción electroquímica. A lo largo de este manuscrito, se observa constantemente el uso de este sistema redox como sistema estándar [\[6,9\]](#).

### **1.1.1. Celdas electroquímicas**

En una reacción electroquímica la oxidación o reducción de una especie se realiza a través de una transferencia electrónica heterogénea, la cual ocurre en la interfase entre conductores eléctricos (electrodos) y conductores iónicos (electrolito). Experimentalmente se trabaja con un conjunto de estas interfaces electrodo/electrolito denominadas celdas electroquímicas, estos dispositivos están compuestos generalmente por dos electrodos separados por al menos una fase electrolítica [\[6\]](#).

Las celdas electroquímicas están clasificadas en dos tipos: celdas galvánicas y celdas electrolíticas. Las primeras son aquellas donde las reacciones ocurren de forma espontánea ( $\Delta G < 0$ ) cuando los electrodos están conectados a través de un conductor, mientras que en las celdas electrolíticas se requiere aplicar un potencial externo y hacer circular una corriente en el sistema para impulsar el proceso electroquímico, es decir, para reacciones no espontáneas ( $\Delta G \geq 0$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación gráfica de una celda galvánica y una celda electrolítica (izquierda y derecha respectivamente).

A continuación, se describirá el papel de cada uno de los componentes de una celda, sin embargo, nótese que aunque para la VC se trabaja con una celda electrolítica, estos componentes son comunes en ambos tipos de celdas electroquímicas.

### 1.1.2. Disolución electrolítica

Sabiendo que durante un experimento electroquímico se está llevando a cabo la transferencia de electrones, la neutralidad eléctrica debe mantenerse y esto se logra mediante la migración de iones en disolución. Los iones se mueven dentro de ella para compensar la carga y cerrar el circuito eléctrico formado, para ello una sal llamada electrolito soporte se disuelve en un disolvente. A esta mezcla homogénea se le denomina disolución electrolítica [8].

La elección del disolvente ideal para el experimento electroquímico de estudio requiere la consideración de diversos factores. Primeramente, se desea que el disolvente sea capaz de solvatar los reactivos y productos en las reacciones electroquímicas; debe tener la capacidad de disolver y disociar sales, esto con el fin de lograr una alta conductividad, y así soportar el flujo de corriente que se genere. Por otro lado, debe ser estable frente a la oxidación o reducción en el intervalo de potencial del experimento, ya que estará en contacto con especies altamente oxidantes o reductoras generadas al electrodo. No debe promover reacciones con la especie analizada o con el electrolito soporte que interfieran con el estudio. En adición, el disolvente evidentemente debe ser líquido a la temperatura de trabajo, debe poder ser purificado, aunque también se pueden tomar en cuenta características específicas como volatilidad, reactividad química o incluso el costo [\[10\]](#).

En este trabajo nos enfocaremos en el uso del agua como disolvente, sin embargo, existe una gran variedad de disolventes orgánicos ocupados en electroquímica, por ejemplo, el uso de nitrilos, disolventes halogenados, amidas, sulfóxidos, entre otros.

La elección de un medio acuoso para gran parte del trabajo electroquímico se basa en la abundancia que tiene en el planeta, además de su gran capacidad para disolver sales, su bajo costo, bajo impacto ambiental y su alta conductividad iónica. Una de sus desventajas es que el agua se electroliza fácilmente para generar gases, atribuido a la estrecha ventana de potencial que posee, sin embargo, el uso de ciertos electrolitos soporte extiende esta ventana. Dentro de los más populares podemos encontrar al  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{LiNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{LiClO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , entre muchos más. La elección del electrolito soporte adecuado se fundamenta en la capacidad de solvatación que tengan los iones, con la finalidad de disminuir los puentes de hidrógeno presentes y aumentar las interacciones entre cationes y aniones, conduciendo esto a ampliar las ventanas de potencial de trabajo [\[11\]](#).

Por otro lado, un buen electrolito soporte también debe cumplir con las siguientes características:

- Altamente soluble en el disolvente elegido.
- Química y electroquímicamente inerte bajo las condiciones de trabajo.
- Debe poder ser purificado.

Para el caso de disolventes orgánicos el uso de sales que contengan iones tetraalquilamonio es muy común, debido a su reactividad electrorreductora tan baja, también, algunos percloratos, sales de tetrafluoroborato o hexafluorofosfato, entre otros.

El electrolito soporte debe estar presente en altas concentraciones respecto al analito, esto ayuda a la conductividad, disminuyendo la resistencia a la transferencia de carga de la disolución. Además, con ello el transporte de masa del analito desde el seno de la disolución al electrodo vía migración se ve limitado [\[12\]](#).

### **1.1.3. Electrodo de trabajo**

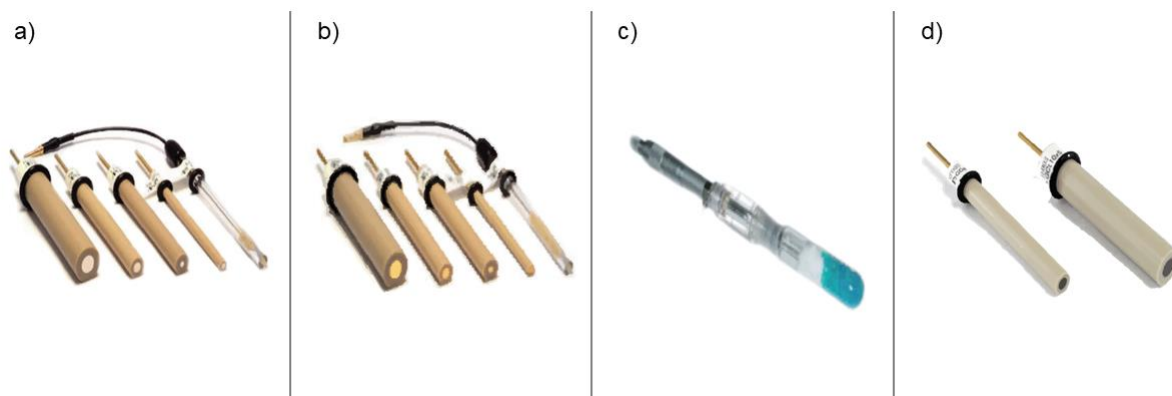
Un electrodo es un conductor eléctrico en una celda electroquímica; es el medio a través del cual la transferencia de electrones ocurre. El electrodo de trabajo (ET) es aquel donde el evento electroquímico de interés se realiza; y una de sus características es que debe estar compuesto de material inerte en el intervalo de potencial de trabajo, además de tener una alta conductividad eléctrica, ser química y electroquímicamente estable, poseer una cinética rápida de transferencia de electrones, poseer propiedades físicas y químicas reproducibles, entre otras. Además, se debe considerar la ventana de potencial que presenta, limpieza de la superficie, costo o toxicidad. El ET puede variar entre un experimento y otro para proporcionar diferentes ventanas de potencial o bien para reducir o promover la adsorción superficial de diferentes especies [\[8\]](#).

Algunos de los materiales más usados para este tipo de electrodos son Pt, Au, C y anteriormente Hg, aunque también puede usarse Ni o Pd. El platino es utilizado ya que es electroquímicamente inerte y de fácil elaboración, sin embargo, tiende a llevar a cabo la reducción de protones para formar hidrógeno gaseoso a una menor

energía y con una cinética rápida, por lo que para medio acuoso no es recomendable, además de lo costoso que es. Los conductores elaborados con oro presentan un comportamiento similar al del platino, y se ven limitados hacia barridos anódicos por la facilidad de oxidación de la superficie, y aunque es de elevado costo, son de gran importancia y utilidad para la biofuncionalización de electrodos (Figura 4 a y 4 b respectivamente).

El electrodo de gota de mercurio había sido ampliamente utilizado, pues presenta una amplia ventana catódica y la superficie del electrodo es reemplazada repetidamente con cada nueva gota del metal, pero la toxicidad de este elemento es determinante para eliminar su uso (Figura 4 c).

El carbono es el material más utilizado en electroquímica, pues se pueden realizar barridos de potencial bastantes amplios tanto catódica como anódicamente y está disponible en diferentes microestructuras como grafito, fibra de carbono, en pasta, diamante o el más común, carbón vítreo (Figura 4 d) [\[10\]](#).



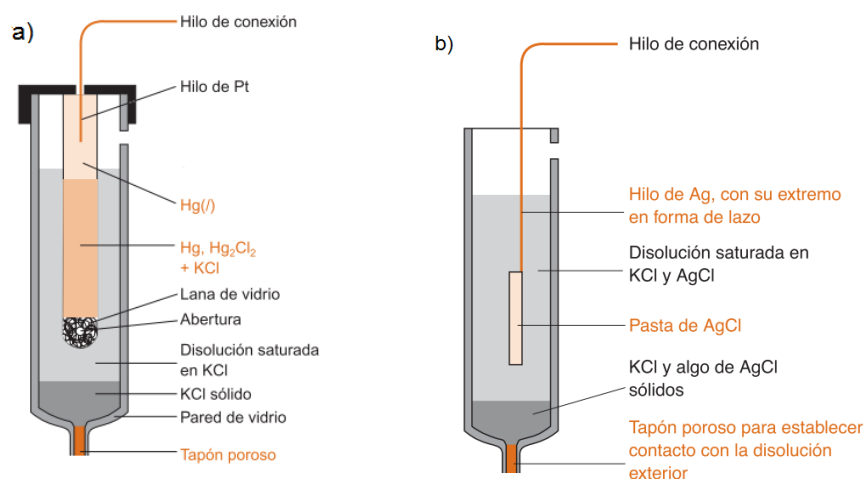
**Figura 4.** Ilustración de diferentes tipos de electrodos de trabajo: a) electrodo de platino, b) electrodo de oro, c) electrodo de gota de mercurio, y d) electrodo de carbono: carbón vítreo. Imágenes tomadas del catálogo de ALS Co., Ltd (Tokio, Japón) [\[13\]](#).



### 1.1.4. Electrodo de referencia

Este electrodo, denotado en este trabajo como ER, como su nombre lo indica, es utilizado como punto de referencia contra el cual se mide el potencial del electrodo de trabajo. Un ER ideal además de tener una composición constante y conocida debe mostrar las siguientes propiedades: 1) su potencial debe ser estable con el tiempo, 2) la reacción redox presente debe ser reversible y obedecer la ecuación de Nernst, 3) su potencial debe volver a su valor inicial después de haber pasado corriente eléctrica a través del electrodo, 4) ser insensible a la composición de la disolución de estudio, entre otras [14].

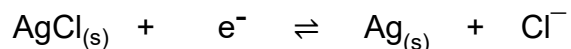
Para medios acuosos, los ER más comúnmente usados son el electrodo de calomel saturado (ECS) y el electrodo de plata-cloruro de plata (Figura 5 a y 5 b respectivamente). Brevemente, el ECS está compuesto por cloruro de mercurio (I),  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , en contacto con un tubo de mercurio metálico bajo una solución de KCl, y está unido a la celda electroquímica regularmente a través de fibra de vidrio poroso que permite el movimiento de los iones. Se utiliza con frecuencia debido a la facilidad con la que puede prepararse, pero una de sus desventajas es que su potencial es sensible a cambios de temperatura.



**Figura 5.** Diagramas representativos de la composición de dos diferentes tipos de electrodos de referencia: a) Electrodo de calomel saturado; b) Electrodo de  $\text{Ag}^+|\text{AgCl}$ . Esquemas tomados y modificados de [15].

El electrodo de  $\text{Ag}^+|\text{AgCl}$  es de los más utilizados debido a su simplicidad, diseño y componentes no tóxicos. Consiste en un alambre de plata de alta pureza (<99.999%  $\text{Ag}^\circ$ ) recubierto por una capa de  $\text{AgCl}$  [10], sumergido en una solución saturada de  $\text{KCl}$  que se ha saturado previamente con  $\text{AgCl}$ . Estos tienen la ventaja frente a los de calomel que pueden ser usados a temperaturas mayores a los  $60\text{ }^\circ\text{C}$  [15].

El potencial de este electrodo está dado por la semireacción:



Se puede notar que su potencial redox se encuentra en función de la concentración de iones cloruro, aunado a que en presencia de estos iones es posible la formación de compuestos solubles tipo  $\text{AgCl}_2^-$ , los cuales incrementan la solubilidad del  $\text{AgCl}$  en presencia del electrolito  $\text{KCl}$ . Entonces, el manejo de la concentración del electrolito es fundamental en este tipo de electrodos, para ello una disolución saturada de  $\text{KCl}$  debe previamente saturarse con  $\text{AgCl}$  [14]. Se recomienda para su elaboración el uso de una disolución  $3.5\text{ mol L}^{-1}$   $\text{KCl}$  y de  $\text{AgCl}$   $3\text{ mol L}^{-1}$  [10].

#### 1.1.5. Electrodo auxiliar

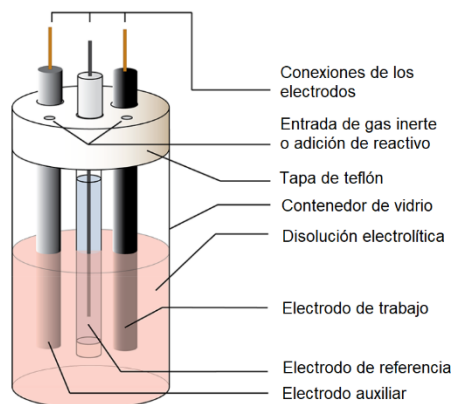
El electrodo auxiliar (EA) o también llamado contraelectrodo tiene la función de completar el circuito eléctrico dentro de la celda, ya que el flujo de corriente eléctrica generada por la transferencia electrónica se registra entre el electrodo de trabajo y electrodo auxiliar. Para asegurar que la cinética de la reacción del contraelectrodo no inhiba la que ocurre en el electrodo de trabajo, es necesario que el área superficial del primero sea más grande en comparación con el ET. Generalmente, el material utilizado para los EA es el platino (Figura 6), debido a la velocidad con la que se realizan las reacciones en su superficie además de ser un material inerte. Aunque también pueden usarse materiales menos costosos como carbono o acero inoxidable [8].

En el EA se lleva a cabo la reacción redox contraria a la que se está realizando en el electrodo de trabajo, y los subproductos generados aquí podrían interferir con el experimento, por lo que algunas veces el electrodo auxiliar es aislado del resto del sistema.



**Figura 6.** Ilustración de diferentes presentaciones para electrodos auxiliares de Pt. Imágenes tomadas del catálogo de ALS Co., Ltd (Tokio, Japón) [16].

El arreglo de celda comúnmente usado para experimentos electroquímicos, incluida la voltamperometría cíclica está representado en la figura 7.



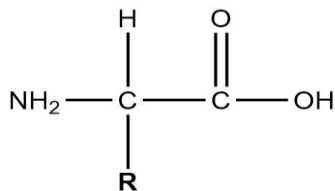
**Figura 7.** Representación sistemática de una celda electroquímica para VC. Imagen tomada y modificada del original de [8].

## 1.2. Proteínas

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en la naturaleza pues participan y se encuentran en los procesos y estructuras más importantes de los organismos vivos. Además, muestran una gran diversidad de propiedades y funciones, desde la queratina que hay en nuestra piel, el transporte de oxígeno en sangre, regulación del metabolismo, hasta la catálisis de reacciones en nuestro cuerpo, entre otras. Las proteínas son biopolímeros de aminoácidos unidos en una cadena polipeptídica, por lo que las propiedades físicas y químicas que presenten estas macromoléculas serán el reflejo de la combinación de sus diversas composiciones de aminoácidos.

### 1.2.1. Aminoácidos

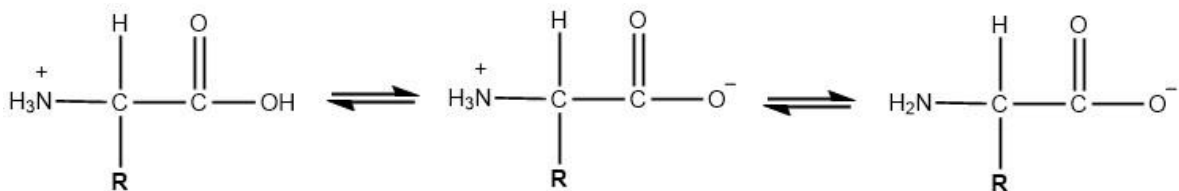
Los aminoácidos, como su nombre lo indica, son moléculas bifuncionales, pues contienen un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas son  $\alpha$ -aminoácidos, lo que quiere decir que el grupo amino está enlazado al átomo de carbono  $\alpha$  adyacente al grupo carbonilo, el cual es quiral pues posee cuatro sustituyentes diferentes: el grupo amino, grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R) (Figura 8).



**Figura 8.** Estructura básica de un aminoácido, donde R representa la cadena lateral unida al carbono quiral, diferente para cada aminoácido.

Para la síntesis de proteínas se utilizan 20 aminoácidos diferentes, de los cuales sólo 11 pueden ser fabricados por mecanismos bioquímicos del ser humano, los nueve restantes, denominados como aminoácidos esenciales, sólo se biosintetizan en plantas y microorganismos, por lo que deben suministrarse a través de la dieta [\[17\]](#).

Los aminoácidos son compuestos anfóteros, ya que pueden reaccionar como ácido o como base en disolución, ahí radica su dependencia con el pH, ya que en una disolución ácida el grupo carboxilo actúa como base y acepta un protón para formar un ácido carboxílico, dejando a la molécula con carga total positiva. Mientras que, a un pH más básico, el ion amonio pierde su protón, actuando entonces como ácido, quedando ahora molécula con carga negativa. (Figura 9). Nótese que, a diferencia de lo que se esperaba, en los aminoácidos la parte básica es el ion carboxilo, mientras que la parte ácida es el ion amonio [18].

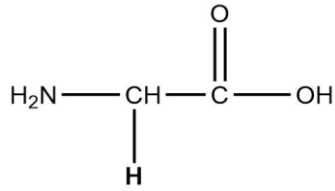


**Figura 9.** Equilibrios ácido-base de los aminoácidos en su forma catiónica en presencia de disoluciones ácidas (izquierda), en su forma neutra conocida como zwitterion (centro), y en su forma aniónica en disoluciones básicas (derecha).

### 1.2.2. Propiedades físicas y químicas de los aminoácidos

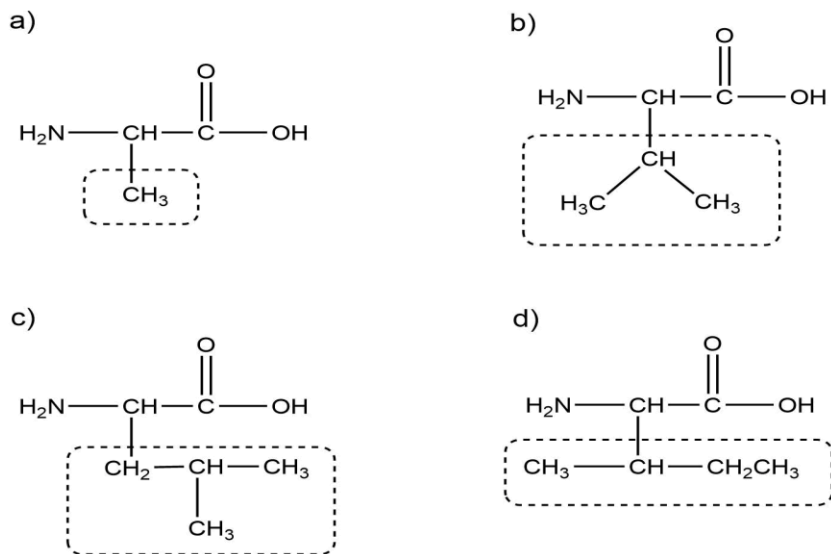
Al ser aislados, los aminoácidos son sólidos cristalinos de color blanco, y debido a esta naturaleza presentan propiedades muy particulares. Poseen altos puntos de fusión y ebullición, resultado de las fuertes interacciones iónicas que mantienen unida la red cristalina que los conforma. También, son solubles en agua y conducen en disoluciones acuosas, es decir son electrolitos, por último, tienen un gran momento dipolar.

Los 20 aminoácidos que constituyen a las proteínas pueden clasificarse en función de la naturaleza de su cadena lateral, ya que será esta la que influenciará a las propiedades de las proteínas una vez que los aminoácidos se unan para formarlas. El aminoácido más simple es la glicina (Figura 10), el cual sólo tiene un átomo de hidrógeno como cadena lateral, por lo que posee poca reactividad química pero una gran flexibilidad conformacional.



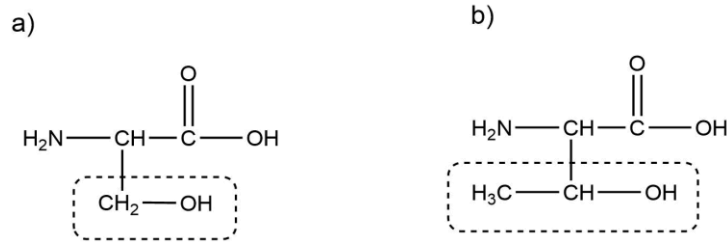
**Figura 10.** Estructura química de la glicina, teniendo como cadena lateral un átomo de hidrógeno.

Los aminoácidos que poseen cadenas alifáticas son: alanina, valina, isoleucina y leucina. La alanina posee como cadena lateral solamente un grupo metilo, químicamente inerte (Figura 11 a); mientras que la valina, posee en su cadena lateral 3 carbonos, dos grupos metilo y un grupo metino (Figura 11 b). Para el par de isómeros leucina e isoleucina están compuestos también de grupos metino y/o metileno, pero únicamente difieren en la posición del grupo metileno, ya que para el caso de la leucina el primer carbono de la cadena lateral es un grupo metileno, mientras que para la isoleucina el primer carbono es un metino unido a un metileno (Figura 11 c y 11 d respectivamente). Estos aminoácidos comparten la característica de poseer cadenas alifáticas ramificadas las cuales son hidrofóbicas, es decir, no serán afines al medio acuoso, por lo que interactuarán entre ellas o con otras cadenas laterales no polares.



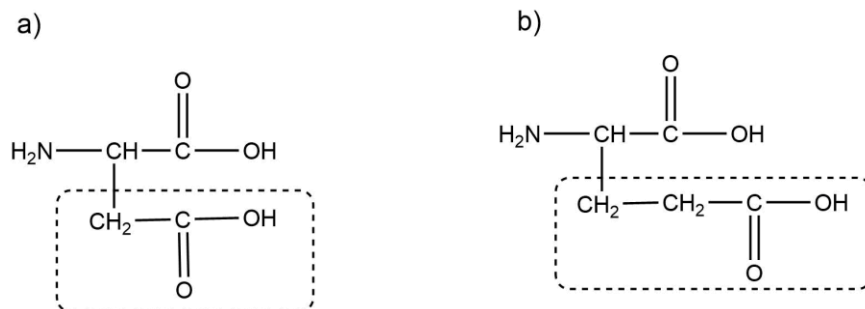
**Figura 11.** Estructura química de cuatro aminoácidos con cadena lateral alifática, donde: a) alanina, b) valina, c) leucina y d) isoleucina.

La siguiente clasificación puede hacerse para los aminoácidos que contienen en su cadena lateral un grupo hidroxilo: serina y treonina. Estas moléculas poseen una cadena lateral pequeña de uno y dos carbonos respectivamente (Figura 12 a y 12 b), sin embargo, la presencia del grupo polar hidroxilo (-OH) los vuelve altamente reactivos, ya que pueden formar puentes de hidrógenos con otros aminoácidos presentes en las proteínas.



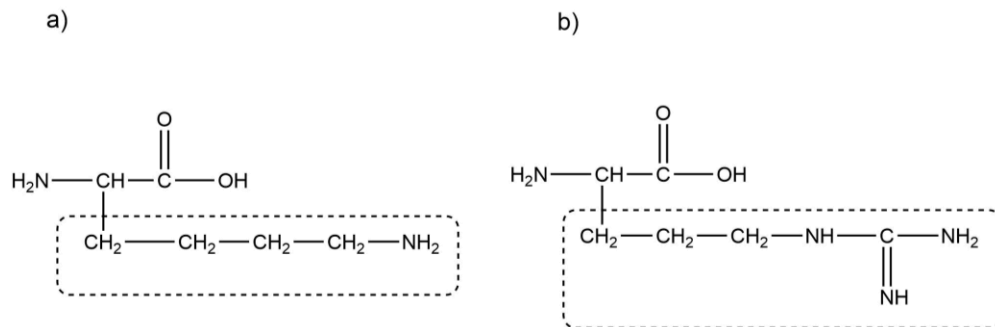
**Figura 13.** Estructura química de aminoácidos con grupo hidroxilo (-OH) en su cadena lateral, donde: a) serina y b) treonina.

Existen dos aminoácidos en cuya cadena lateral contienen un ácido carboxílico, ellos son: ácido aspártico y ácido glutámico (Figura 13). Estas especies difieren únicamente entre ellas en un grupo metileno dentro de su estructura, sin embargo, la presencia del carboxilo les confiere una reactividad extra, ya que la cadena sufrirá las reacciones típicas para este grupo funcional. Además, al pH fisiológico que hay dentro de las células el ácido carboxílico se encuentra desprotonado por lo que ahora como grupo carboxilo, el aspartato y el glutamato pueden actuar como fuertes agentes quelato para iones metálicos [19].



**Figura 13.** Estructura química de aminoácidos con ácidos carboxílicos dentro de su cadena lateral, donde: a) ácido aspártico y b) ácido glutámico.

La lisina y la arginina pueden ser agrupadas debido a la basicidad de su cadena lateral. Por un lado, la lisina está conformada por cuatro grupos metileno, terminando en una amina primaria, la cual tiene propiedades básicas (Figura 14 a). Mientras que la arginina posee tres grupos metileno terminando en el grupo guanidino, este último también es un grupo funcional sumamente básico (Figura 14 b). Pero, dentro de las células, estas estructuras se mantienen protonadas, por lo que interaccionarán con cadenas laterales que estén cargadas negativamente, o bien, si se logra alcanzar un pH muy básico, entonces actuarán como fuertes nucleófilos [18].



**Figura 14.** Estructura química de aminoácidos con propiedades básicas, donde: a) lisina y b) arginina.

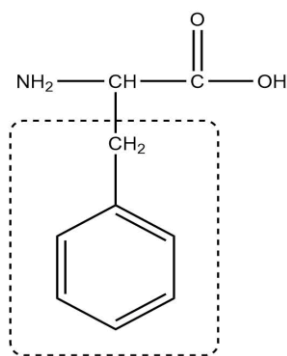
El siguiente par de aminoácidos, asparagina y glutamina, contienen en su estructura un grupo amida, separados por uno o dos grupos metileno respectivamente (Figura 15 a y 15 b). Contrario a lo que se pensaría, el átomo del N que se encuentra al final de su cadena lateral no presenta propiedades básicas, pues al estar como grupo funcional amida, el par electrónico libre del N está comprometido por resonancia con el grupo carbonilo adyacente, por lo que se le dificulta actuar como una base.



**Figura 15.** Estructura química de aminoácidos con grupo amida dentro de su cadena lateral, donde: a) asparagina y b) glutamina.



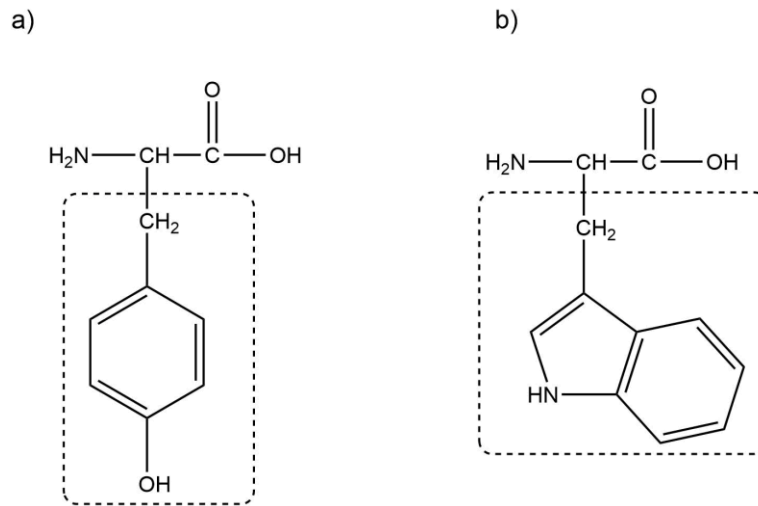
Dentro del siguiente grupo se encuentran los aminoácidos que presentan grupos aromáticos dentro de su estructura, ellos son fenilalanina, tirosina y triptófano. Primeramente la fenilalanina posee un anillo aromático (Figura 16), el cual en similitud a las cadenas alifáticas, es hidrofóbico e interactuará con cadenas no polares o con otros anillos aromáticos. Es químicamente inerte ya que la conjugación de los seis electrones en la nube  $\pi$  que posee el benceno le confiere estabilidad, en consecuencia, si interactúa con otro anillo aromático la interacción tipo  $\pi$  se favorecerá al igual que la deslocalización electrónica, confiriendo mayor estabilidad a la proteína [19].



**Figura 16.** Estructura química de la fenilalanina, teniendo como cadena lateral un anillo aromático.

Para el caso de la tirosina, tiene un anillo aromático sustituido en posición *para*- con un hidroxilo (Figura 17 a), volviendo a la cadena lateral de este aminoácido más reactiva, ya que el OH a través de resonancia activa al anillo aromático y lo vuelve susceptible a sufrir reacciones de sustitución. Interaccionará con otros anillos aromáticos dentro de las proteínas y también la presencia del hidroxilo permitirá la formación de puentes de hidrógeno. El triptófano, representado en la figura 1 b, tiene un anillo de indol como cadena lateral, el cual es un anillo heterocíclico aromático, que contrario a lo que se pensaría por la presencia del nitrógeno, no tiene propiedades básicas, ya que el par libre de electrones que tiene el nitrógeno entra dentro de la conjugación del anillo, por lo que no está disponible para actuar como base, en consecuencia, es poco reactivo y también es hidrofóbico. Sin

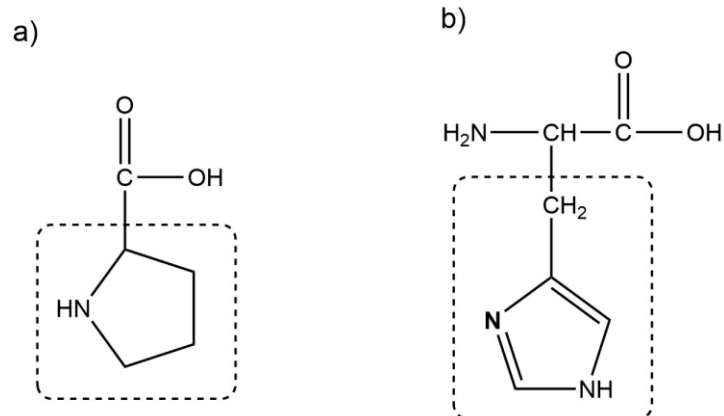
embargo, el indol es el responsable de la mayor parte de la absorbancia y fluorescencia intrínsecas de las proteínas.



**Figura 17.** Estructura química de dos aminoácidos que contienen grupos aromáticos en su estructura. Donde: a) tirosina y b) triptófano.

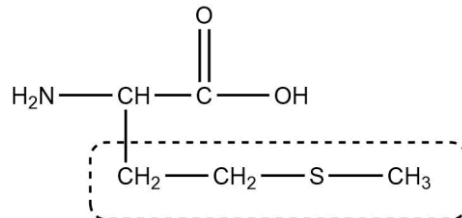
En un caso muy particular, se abordan los aminoácidos prolina e histidina. Como vemos en la figura 18 a, la prolina es diferente a los demás aminoácidos estándar, ya que es el único donde el grupo amino está unido covalentemente dentro de un anillo con su átomo de carbono  $\alpha$ . Esta estructura cíclica le proporciona gran rigidez al enlace N-C, la cual se ve reflejada en los péptidos que contienen prolina, además el ciclo formado es poco reactivo.

La histidina, es otro aminoácido particular, cuenta con un anillo de imidazol, en donde existe una deslocalización de la carga positiva entre ambos nitrógenos una vez que el nitrógeno resaltado en negro en la figura 18 b se protona, pero en el caso contrario donde se encuentre ese nitrógeno libre, es un fuerte nucleófilo e incluso puede formar puentes de hidrógeno [\[17,19\]](#).



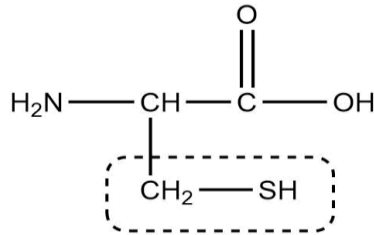
**Figura 18.** Estructuras químicas de los aminoácidos a) prolina y b) histidina.

Por último, se encuentran los aminoácidos que contienen azufre: cisteína y metionina. En la metionina, vemos en su estructura en la figura 19 que el azufre se encuentra como sulfuro (R-S-R) entre dos carbonos, su cadena lateral no es polar, aunque por el tamaño del azufre la hace voluminosa, además de ser el átomo de azufre un nucleófilo en diferentes condiciones.



**Figura 19.** Estructura química de la metionina en cuya cadena lateral posee un azufre en forma de sulfuro.

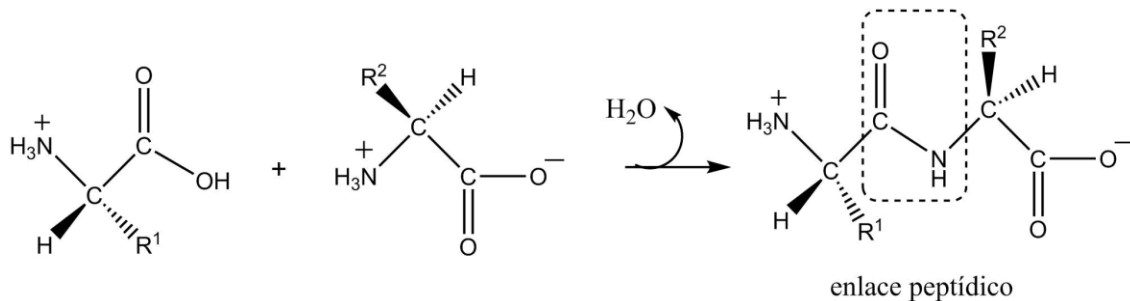
La cisteína es el aminoácido más reactivo de los 20 naturales pues su grupo funcional es el tiol (-SH), el cual es altamente reactivo, y dos grupos tiol de diferentes cisteínas pueden oxidarse para formar un par de residuos de aminoácidos enlazados por un puente disulfuro dentro de una cadena polipeptídica (Figura 20). Además, los tioles pueden sufrir una gran variedad de reacciones dentro de los organismos [\[19\]](#).



**Figura 20.** Estructura química de la cisteína, con un grupo tiol (-SH) en su composición.

### 1.2.3. Enlace peptídico

Dos moléculas de aminoácidos se pueden unir de forma covalente a través de un enlace amida, a este enlace se le llama enlace peptídico. Se lleva a cabo mediante la condensación de la amina de un aminoácido con el ácido carboxílico de otro, eliminándose en este proceso agua (Figura 21). De esta manera, pueden unirse varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

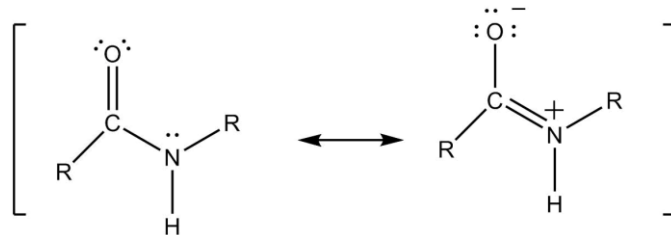


**Figura 21.** Reacción de condensación entre el ácido carboxílico de un aminoácido y la amina de un aminoácido vecino para formar un enlace peptídico.

A cada unidad de aminoácido que forma el péptido se le denomina residuo, que es la parte de la molécula que queda tras perder un átomo de hidrógeno por parte del ion amonio y el grupo hidroxilo del ácido carboxílico.

Un péptido es un compuesto que contiene dos o más residuos de aminoácidos, y a la unión de muchos residuos de aminoácidos se le denomina polipéptido. Las proteínas pueden tener miles de residuos y aunque el término polipéptido y proteína algunas veces se usa indistintamente, por lo general los polipéptidos tienen masas moleculares menores que las proteínas [20].

El enlace peptídico es un enlace único que posee giro restringido alrededor de la unión C-N, esto ocurre debido a la resonancia presente en la amida, confiriendo un carácter de enlace doble parcial dentro de la molécula. Esta resonancia, representada en la figura 22, explica la alta estabilidad de los enlaces y la basicidad débil del átomo de nitrógeno, ya que su par electrónico está conjugado dentro de la estructura [\[21\]](#).

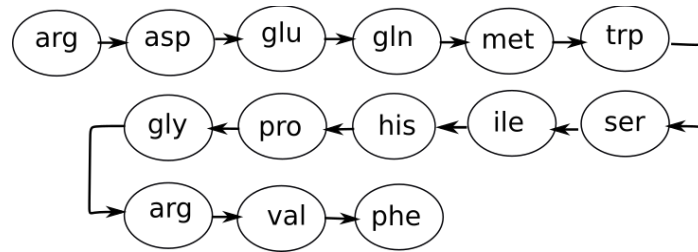


**Figura 22.** Estabilización por resonancia del enlace amida.

#### 1.2.4. Estructura de las proteínas

La conformación de las proteínas está definida en cuatro niveles estructurales: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria. A continuación, se describirá brevemente cada una de ellas.

La estructura primaria no es más que la secuencia lineal de aminoácidos que forman la proteína, figura 23, enlazados covalentemente a través del enlace peptídico, incluidos también cualquier puente disulfuro. Todas las proteínas están sintetizadas en cierto orden y deben leerse de izquierda a derecha, en donde el primer aminoácido, a la izquierda, tiene a su grupo amino libre. A este grupo se le conoce como extremo aminoterminal, mientras que el extremo final, a la derecha, llamado carboxiloterminal tiene en el último aminoácido el grupo carboxilo libre. Esta estructura es importante ya que funge como base para las conformaciones siguientes, además, las propiedades del polipéptido están determinadas directa o indirectamente por su estructura primaria [\[17\]](#).

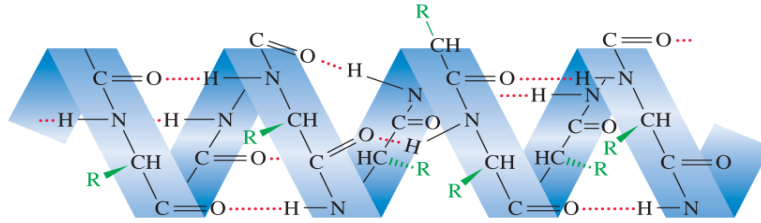


**Figura 23.** Ejemplificación de una secuencia de aminoácidos para estructura primaria, utilizando la abreviación de tres letras para cada aminoácido.

Podemos definir a la estructura secundaria como la descripción de ciertas conformaciones espaciales que adoptan algunas partes de las proteínas bajo diferentes patrones que pueden o no repetirse a lo largo de ella. Ya que en distintas regiones de un solo polipéptido se pueden encontrar diferentes estructuras secundarias, las más comunes son la hélice  $\alpha$  y la hoja plegada  $\beta$  [21].

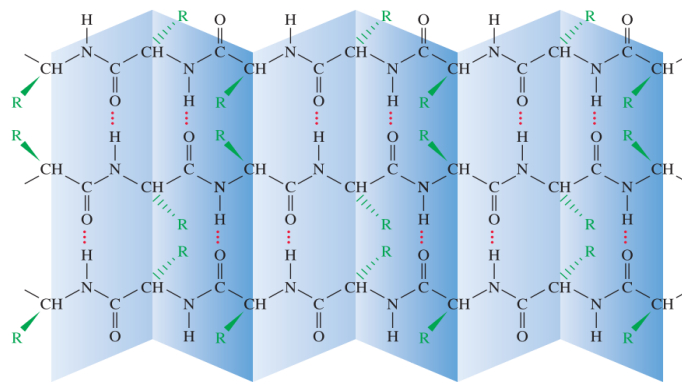
La hélice  $\alpha$  es la estructura secundaria más común, esta se define como un enrollamiento de la secuencia polipeptídica sobre sí misma hacia la derecha. Esta disposición permite que algunos de los átomos de la estructura puedan formar puentes de hidrógeno entre ellos, de hecho, la presencia de esta fuerza intramolecular es la base de la estabilidad de la hélice. Los puentes de hidrógeno se forman entre los átomos de oxígeno del grupo carbonilo de un residuo y el átomo de hidrógeno de la amida que se encuentra a cuatro residuos adelante, es decir, en el siguiente giro de la estructura, como podemos ver en la figura 24 [20].

Cabe señalar que dentro de la hélice se evidencian momentos dipolares, como consecuencia a la diferencia de electronegatividades entre el oxígeno y el hidrógeno, por lo que el grupo carboxilo de manera parcial estará cargado negativamente, mientras que el grupo amino tendrá una carga parcial positiva.



**Figura 24.** Ilustración de la estructura secundaria hélice  $\alpha$ , donde el esqueleto polipeptídico se enrolla en una hélice, formando puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo de un residuo y el grupo amino del siguiente giro. Imagen tomada de [21].

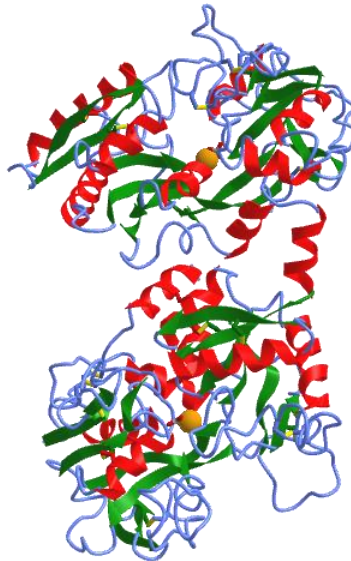
Por otro lado, la hoja plegada  $\beta$  también es estabilizada por puentes de hidrógeno, sin embargo, ahora estos se forman entre los residuos de los aminoácidos de manera lateral entre dos cadenas de péptidos, generando estructuras laminares y proporcionando gran estabilidad a la proteína. En esta estructura el grupo carbonilo interactuará con el hidrógeno del grupo amino de la cadena adyacente dándole forma extendida, además los ángulos de enlace entre los residuos permiten que la lámina se pliegue, teniendo a las cadenas laterales alternadas a la izquierda y a la derecha (en posición perpendicular) a lo largo de la hoja (Figura 25). Estas cadenas pueden alinearse de forma paralela, en la misma dirección, o antiparalela, dirección contraria [19].



**Figura 25.** Estructura secundaria, hoja plegada  $\beta$ , donde los puentes de hidrógeno se forman entre cadenas adyacentes de péptidos de manera lateral. Ilustración tomada de [21].

Para una misma proteína podemos encontrar o no estos dos tipos de estructuras secundarias que se repitan a lo largo de la cadena, esto dependerá de la estructura primaria que las conformen.

El siguiente nivel es la estructura terciaria, y esta se refiere a la conformación tridimensional de las proteínas. La unión de todas las estructuras secundarias, así como todos los pliegues que posee el polipéptido participan para formar la estructura completa en tercera dimensión. En la figura 26, se ejemplifica la estructura terciaria para la proteína lactoferrina, encargada de la producción de leche en las vacas, donde podemos observar la presencia tanto de hélices  $\alpha$  como de hojas plegadas  $\beta$  que juntas conforman el arreglo tridimensional.



**Figura 26.** Estructura terciaria para la proteína lactoferrina. En color rojo se observan las estructuras hélice  $\alpha$ , en color verde las hojas plegadas  $\beta$  y en color azul el enrollado aleatorio que no posee una estructura secundaria ordenada. Estructura tomada del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, E.U.A).

La estabilidad de esta disposición espacial se debe no sólo a las interacciones que existen entre las estructuras secundarias a través de puentes de hidrógeno, como describimos arriba, sino también a la suma de otras fuerzas intermoleculares que hay dentro de ella, como puentes disulfuro, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas e incluso fuerzas electrostáticas [\[20\]](#).



Por ejemplo, los puentes disulfuro son formados entre dos residuos de cisteína y permiten que la proteína se pliegue. El fuerte enlace covalente que hay entre azufre y azufre forma un ciclo dentro de la cadena polipeptídica y en consecuencia se observa el plegamiento en la estructura tridimensional.

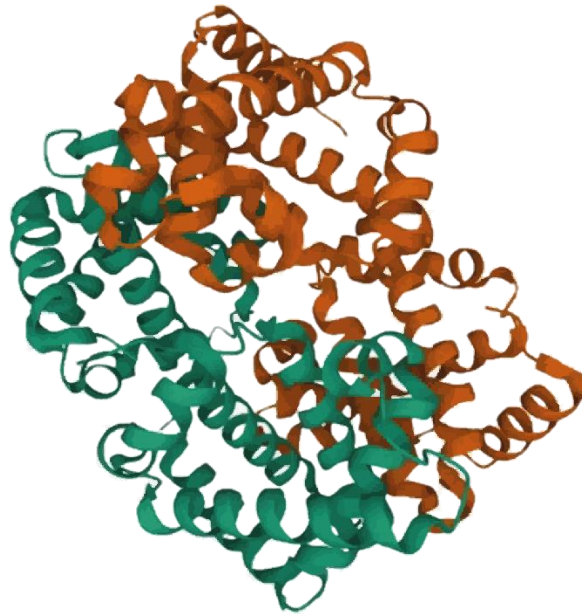
Las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos poseen diferentes propiedades. Algunas de ellas son afines al medio acuoso, hidrofílicas, y podrán interactuar con el disolvente, pero aquellas cadenas no polares, hidrófobas, tendrán una gran repercusión en el plegamiento de las proteínas, pues es su carácter hidrofóbico el que promueve dichos pliegues instantáneos, ya que se favorecerá la interacción entre moléculas no polares formando arreglos repelentes al agua hacia el interior de la estructura aun estando todas las demás cadenas en medio acuoso [\[19\]](#).

La presencia de fuerzas de van der Waals dentro de las proteínas ya sea de atracción, mediante la formación de diferentes tipos de dipolos, como consecuencia de las diferentes densidades de carga que hay en el péptido, o de repulsión, al encontrarse dos átomos demasiado cerca, hacen que la estructura terciaria se mantenga unida, a pesar de que unitariamente estas fuerzas son débiles, la suma de todas y cada una de ellas dentro de la macromolécula favorece el plegamiento y la estabilidad del polipéptido.

Como vimos anteriormente, los aminoácidos dentro de los sistemas biológicos se encuentran como especies ionizadas, por lo que era de esperarse que las interacciones electrostáticas estuvieran presentes entre el grupo amino y el grupo carboxilo en los extremos del péptido, o bien entre cadenas laterales con carga opuesta, sin embargo al estar dichas cargas solvatadas por el agua, este tipo de interacción no aporta estabilidad a la proteína significativamente como otras fuerzas intermoleculares.

El último nivel de organización de las proteínas es la estructura cuaternaria, y se refiere al arreglo espacial de dos o más cadenas polipeptídicas, denominadas subunidades. Aunque no todas las proteínas tienen estructura cuaternaria, las que

la poseen, pueden estar compuestas por subunidades idénticas o distintas [\[17,19\]](#). Para el caso de la hemoglobina, figura 27, proteína con estructura cuaternaria encargada de transportar el oxígeno en la sangre de los mamíferos, es un heterotetrámero que contiene dos pares de subunidades diferentes dentro de su arreglo cuaternario.



**Figura 27.** Estructura cuaternaria de la hemoglobina, formada por cuatro subunidades, se ilustra de color verde las dos subunidades idénticas entre sí, y de color naranja el segundo par de subunidades iguales. Estructura tomada del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, E.U.A).

Las subunidades que forman esta conformación presentan las mismas interacciones que aplican para las estructuras terciarias, tanto dentro de cada una de ellas como para su unión al formar la estructura cuaternaria, confiriendo una mayor estabilidad y una amplia versatilidad de las funciones proteicas.

### **1.3. Funcionalización de conductores eléctricos**

El poder de las técnicas electroquímicas radica en la superficie del electrodo, pues es ahí donde a través del control del potencial aplicado se puede llevar a cabo la transformación química de interés. Sin embargo, la idealidad de los experimentos se aleja cuando se presentan fenómenos ajenos al estudio, como por ejemplo la adsorción de moléculas ajenas a las sustancias de interés a la superficie del conductor, reduciendo su actividad y entorpeciendo el estudio, o bien la precipitación no deseada dentro de la celda electroquímica. La idea de funcionalizar los electrodos surge de la necesidad de los electroquímicos por modificar la naturaleza de la superficie del conductor eléctrico y obtener una nueva herramienta hecha a la medida para aplicaciones concretas.

#### **1.3.1. Electroodos químicamente modificados**

Las superficies de los electrodos se modifican en búsqueda de realizar una función electroquímica que con el uso de electrodos convencionales presenta dificultades o no es posible de hacer. Murray y sus colaboradores fueron los pioneros en esta técnica, ya que aproximadamente en el verano de 1974, a las superficies de electrodos de Pt y SO<sub>2</sub> las funcionalizaron (o modificaron químicamente) con grupos funcionales aminas, para posteriormente acoplar moléculas de interés a esta “nueva superficie” [\[22\]](#). Siendo este el paso determinante que presentaría una nueva perspectiva a la electroquímica para poder diseñar electrodos para cada experimento y planificar reacciones para diversos propósitos.

Un electrodo químicamente modificado o EQM (Chemically modified electrode, CME) es un material conductor o semiconductor cuya superficie ha sido recubierta con una (monocapa) o varias películas delgadas de un reactivo químico elegido intencionalmente [\[23\]](#). Se preparan mediante la inmovilización de dicho reactivo a la superficie con la finalidad de que el electrodo adquiriera las propiedades químicas de los reactivos anexados de manera deliberada y químicamente diseñada, para que posteriormente pueda interactuar con analitos de interés [\[24\]](#).

Modificar un electrodo químicamente trae consigo diversas ventajas, ya que existe una mayor selectividad a la superficie de trabajo, la estabilidad química del conductor aumenta, se tiene una ventana de potencial más amplia, una resistencia al ensuciamiento, y una vez inmovilizada a la superficie, la cantidad de reactivos necesarios para un estudio en particular se minimizan. Por todo ello, la combinación de los electrodos modificados junto con las técnicas electroquímicas, como la voltamperometría cíclica, forman una poderosa herramienta en importantes aplicaciones.

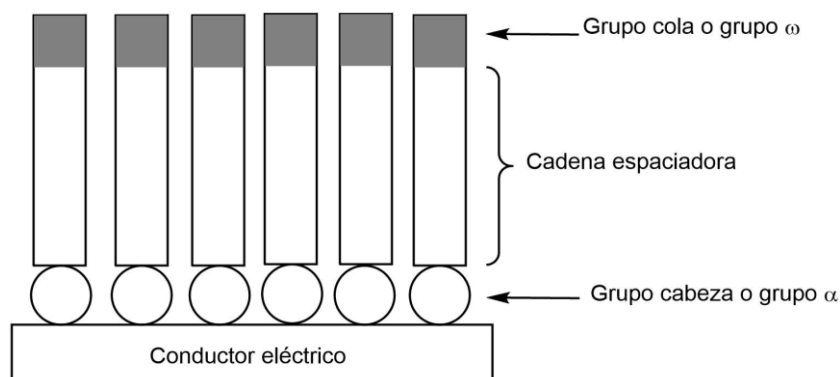
### **1.3.2. Tipos de funcionalización de electrodos**

Los electrodos modificados dependen de la especie que se ha inmovilizado en su superficie, por lo que la forma en que la sustancia se une a ella cobra relevancia. Murray, tiempo después, en 1987 dio a conocer cuatro categorías para inmovilizar reactivos químicos en las superficies de los electrodos: adsorción, modificación covalente entre el electrodo y el reactivo electroactivo, capas multimoleculares de películas poliméricas y formación de capas multimoleculares heterogéneas [\[25\]](#).

Este trabajo se inclinará hacia el estudio de la adsorción en las superficies del conductor eléctrico, por lo que solamente se dará una breve conceptualización de los demás métodos mencionados.

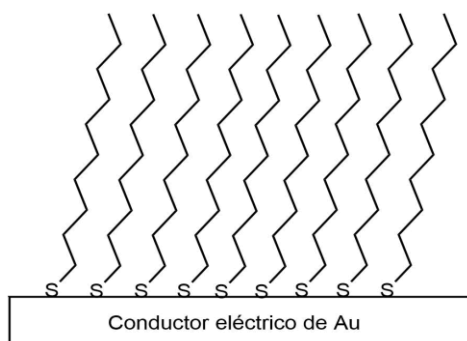
Durante la iniciación de modificación química de los electrodos surgió la funcionalización por adsorción o también llamada autoensamblaje, en donde los reactivos seleccionados que contienen las características que se desean añadir al conductor, pueden adsorberse a la superficie formando estructuras de monocapa. Un método de adsorción consiste en que el reactivo se une al electrodo mediante quimisorción a través de interacciones intermoleculares. La quimisorción es la fuerte adsorción entre el grupo funcional de la molécula elegida y la superficie del electrodo a través de un enlace químico. A las capas resultantes de este fenómeno se les denomina monocapas autoensambladas (Self-assembled monolayers, SAM), y deben considerarse tres partes dentro de la molécula absorbida, como se observa

en la figura 28. Contiene un grupo cabeza o extremo  $\alpha$ , el cual es el encargado de unirse al conductor, una cadena espaciadora que será responsable de las propiedades en la interfase como resultado de las fuerzas intermoleculares de atracción y repulsión que tenga con otras cadenas y los grupos cola o extremo  $\omega$  [10].



**Figura 28.** Esquematación de la estructura de una monocapa autoensamblada adsorbida en la superficie del electrodo, donde se observa el grupo cabeza, la cadena espaciadora y el grupo cola de una molécula unida al conductor eléctrico.

Experimentalmente, diseñar un EQM bajo adsorción es relativamente simple, ya que únicamente se sumerge el electrodo dentro de una disolución que contenga el reactivo que se quiere unir a la superficie. Un ejemplo común de este procedimiento es la funcionalización de electrodos de Au con moléculas que tengan en su estructura átomos de azufre, como se observa en la figura 29 con el uso de alcanotioles.



**Figura 29.** Representación gráfica de la adsorción de alcanotioles sobre una superficie de oro formando una monocapa autoensamblada.

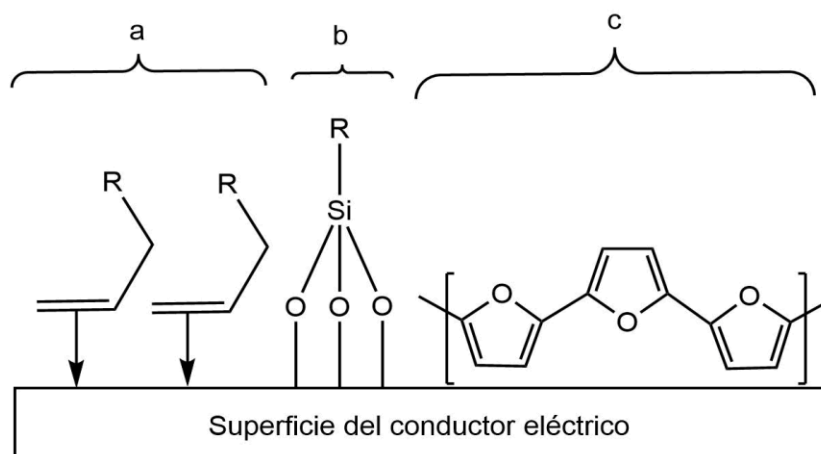
Aquí el grupo cabeza, azufre, se une fuertemente mediante quimisorción a la superficie, que junto con las fuerzas de van der Waals presentes entre las cadenas alifáticas que orientan a la molécula de forma perpendicular a la superficie, conducen a la formación de la monocapa completa y ordenada [26].

También bajo monocapas autoensambladas hay funcionalizados electrodos de C, Cu, Pt, Hg, etc. Los electrodos de carbono son altamente efectivos para la adsorción de reactivos que contengan interacciones  $\pi$  dentro de un sistema conjugado, incluso se han llegado adsorber moléculas como olefinas, porfirinas, quinolinas, etc. (Figura 30 a). Aquí la adsorción no se hace a través de un enlace como en el caso del azufre unido al electrodo de oro, sino que los reactivos permanecen adsorbidos en monocapas debido a las fuertes interacciones que existen entre la superficie del electrodo y los sistemas de electrones  $\pi$  extendidos [27].

Para el caso de la modificación covalente, esta técnica se basa en la formación de nuevos enlaces covalentes a través de una reacción electroquímica entre la superficie del electrodo y el grupo funcional que posea el reactivo añadido, formando sobre ella una monocapa uniforme, confiriendo además de estabilidad la capacidad de ser conductores reutilizables. Puede realizarse mediante electro-oxidación o electro-reducción con la repetición consecutiva de  $n$  número de ciclos de potencial, en voltamperometría cíclica, dentro del intervalo en donde el reactivo sea electroactivo. Bajo esta técnica se han adherido diferentes reactivos a materiales como SnO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Pt, carbón vítreo, entre otras. Por ejemplo, como se observa en la figura 30 b, la química de los organosilanos es muy común, aunque también pueden usarse grupos hidroxilo, ácidos carboxílicos o aminas [28]. Esta técnica es de las más utilizadas, sin embargo, este procedimiento se ve limitado por la cobertura de la superficie de solamente una monocapa, restringiendo la cantidad de analito en su superficie, por lo que alternativamente existe el uso de polímeros para modificar a los electrodos.

El recubrimiento polimérico consiste en colocar múltiples capas de polímero en la superficie del electrodo, donde se encuentra el uso de monómeros como pirroles o

aminas unidos a electrodos de carbono, figura 30 c. Existen diferentes maneras de hacerlo, ya sea mediante el recubrimiento por inmersión del electrodo en una disolución de polímero, donde las moléculas se depositan mediante adsorción, por evaporación de disoluciones de polímero, a través de depositación oxidativa o reductora por polimerización de un monómero electroactivo mediante voltamperometría cíclica, o bien cuando el reactivo no es soluble en el disolvente, este se unirá al electrodo, entre otras. El uso de polímeros se justifica ya que poseen sitios electroquímicamente activos, y debido a la gran cantidad de moléculas adheridas, su respuesta electroquímica es mayor y mucho más fácil de observar, además de su eficiente transporte y transferencia de carga entre su estructura [29].



**Figura 30.** Ejemplificación de diferentes tipos de funcionalización de electrodos. Donde: a) Adsorción espontánea de olefinas, b) Modificación covalente a partir de organosilanos y c) Recubrimiento polimérico mediante unidades monoméricas de pirroles. Imagen tomada y modificada de [27].

Para la siguiente categoría, la formación de multicapas de forma heterogénea se hace a través de compósitos como la arcilla, zeolitas,  $\text{SiO}_2$ , pasta de carbón, resina, etc. Los soportes sólidos se combinan deliberadamente, comúnmente con un aglutinante para poder modificar el electrodo. Estos materiales son seleccionados debido a su facilidad de intercambio iónico o su actividad catalítica, además de que generan una mayor resistencia y son adecuados para experimentos en disolventes no acuosos. Un ejemplo de este método es la captación selectiva de oxígeno entre partículas de zeolita cerca de la superficie del electrodo [25].

Independientemente de la técnica que se utilice para modificar químicamente a un electrodo, el uso de la voltamperometría cíclica está presente tanto para fabricar algunos de ellos, así como para caracterizarlos al seguir el efecto que tiene la funcionalización de la superficie en la transferencia electrónica.

### **1.3.3. Voltamperometría de película de proteína**

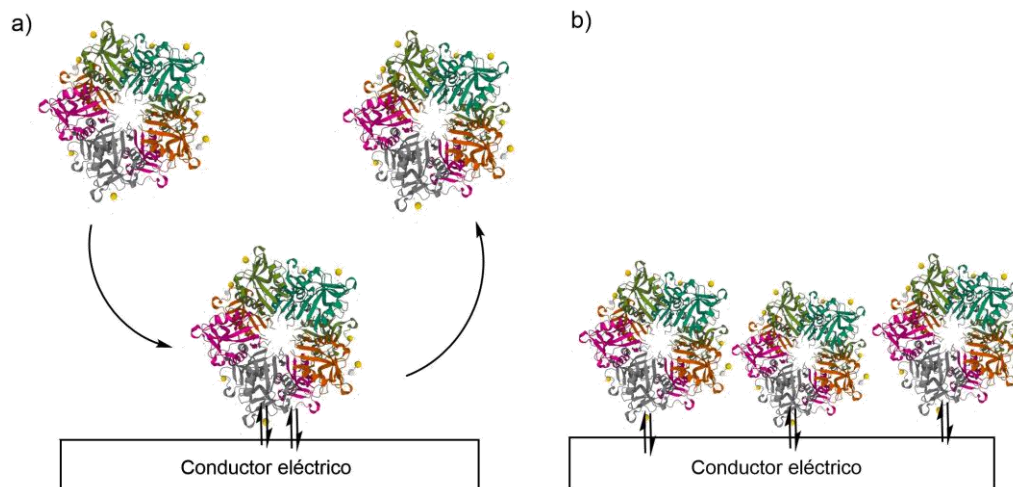
Algunas de las funciones que desarrollan las proteínas dependen en gran medida de su comportamiento electroquímico dentro de sus sitios activos. Anteriormente era difícil estudiar bajo técnicas electroquímicas la transferencia electrónica que había en dichos sitios, pues se creía que las proteínas no podían intercambiar electrones directamente con un electrodo, ya que comúnmente los espacios electroactivos estaban envueltos en cadenas polipeptídicas que los alejaban de la superficie y dificultaban su estudio. Sin embargo, se cambió totalmente esta perspectiva gracias al descubrimiento de Armstrong y sus colaboradores, pues se dieron cuenta que el uso de la electroquímica junto con electrodos modificados mediante la adsorción de proteínas ampliaba el conocimiento entre las interacciones de estos biopolímeros con la superficie de un conductor eléctrico, denominando a esta rama de la electroquímica como voltamperometría de película de proteína (VPP). Este grupo de investigación la define como la electroquímica de proteínas redox adsorbidas que intercambian electrones directamente con el electrodo, la cual es una poderosa herramienta que ayuda a elucidar los mecanismos de transferencia electrónica, brinda el poder para caracterizar a las proteínas y a su vez a sus sitios activos, y en consecuencia permite conocer equilibrios químicos acoplados que ahí sucedan, entre otras [\[30\]](#).

La proteína que se pretenda unir al conductor eléctrico debe cumplir con algunos requisitos, en un principio se estableció que debía ser una proteína redox, es decir que en sus sitios activos se lleven a cabo reacciones de óxido-reducción, no obstante, esto no aplica en todos los casos, pues el biopolímero puede o no tener estas propiedades redox, dependiendo de lo que se pretenda estudiar bajo VPP. Lo cierto es, que la proteína debe poseer la capacidad de adsorberse efectivamente al



electrodo, ya que esta técnica electroquímica se basa en transferencia electrónica directa, en donde el intercambio de electrones entre la proteína y el electrodo es directo, y no involucra mediadores electroactivos. Finalmente, se requiere que no se descomponga químicamente durante el tiempo de estudio, y sus propiedades no deber verse afectadas una vez contenida en la superficie conductora.

Existen diferentes configuraciones en las que la proteína y el electrodo interactúan, una de ellas es mediante difusión libre y otra es mediante la inmovilización de moléculas en la superficie del electrodo (Figura 31), esta última siendo la que se ocupa en VPP y la que es de nuestro interés pues permite realizar EQM, sin embargo, se dará también una breve explicación de la primera interacción [30,31].



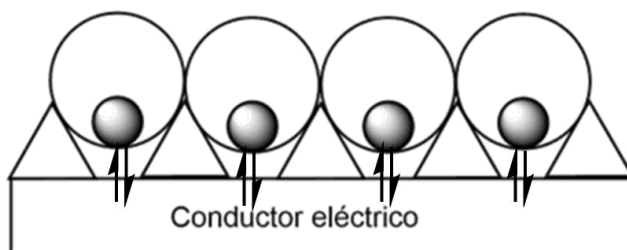
**Figura 31.** Representación gráfica de dos maneras en las que la proteína interactúa con el electrodo. Donde las flechas encontradas representan transferencia electrónica. a) Difusión libre, donde la proteína redox se encuentra dentro de disolución y en momentos específicos se acerca a la superficie del electrodo para el intercambio electrónico, posterior a este vuelve a difundirse, b) Inmovilización de la proteína redox al electrodo, aquí la proteína está adsorbida a la superficie y la transferencia electrónica es directa.

Para la configuración de difusión libre, como se observa en la figura 31 a, se requiere que la proteína interactúe con el electrodo de manera débil y transitoriamente, es decir la proteína en disolución no se encuentra unida al conductor, sino que difunde libremente y cuando se encuentra lo suficientemente cerca de la superficie del electrodo es posible que puedan llevarse a cabo encuentros activos en ciertas zonas del electrodo, ya que algunas otras partes de la superficie se encontrarán bloqueadas por moléculas de proteínas que no estén orientadas efectivamente para

llevar a cabo la reacción electroquímica. Si estas zonas son pequeñas o se encuentran muy alejadas unas de otras, el electrodo ya no se comporta como un macroelectrodo uniforme sino como un conjunto de microelectrodos.

El uso de la voltamperometría cíclica en esta situación no es muy útil, ya que aparecen ondas anchas que dificultan su estudio, por lo que se prefiere voltamperometría de onda cuadrada, pues se pueden detectar reacciones lentas, sin embargo, se pierde información que podría elucidar los mecanismos de transferencia electrónica proporcionada en voltamperometría cíclica [31].

La siguiente configuración se logra con la inmovilización de proteínas en un electrodo, representada grosso modo en la figura 31 b. Aquí se forma una película electroactiva de moléculas de proteína fuertemente adsorbida al conductor. Generalmente esta película se forma como una capa estable orientada para facilitar la transferencia electrónica directa entre el electrodo y los sitios activos de la proteína, figura 32, además el biopolímero presenta retención en sus propiedades estructurales y su reactividad. Las ventajas que tiene esta interacción electrodo-proteína son mayores en comparación con la de difusión libre.



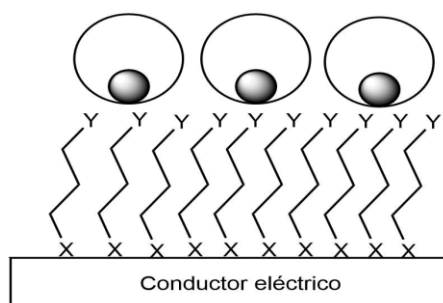
**Figura 32.** Representación gráfica de la idealización de una monocapa de películas de proteína en la superficie de un electrodo. Donde las formas circulares representan a las proteínas, las flechas bidireccionales la transferencia electrónica y los triángulos esquematizan la funcionalización en la superficie necesaria para el intercambio electrónico interfásial directo.

En primera instancia, se tiene un control del estado redox de los sitios activos de la proteína, ya que al estar unida a la superficie se puede aplicar un potencial eléctrico y los electrones entran y salen de los sitios dando una señal de corriente en voltamperometría cíclica específica y útil para su estudio, y como consecuencia se

pueden controlar, detectar y cuantificar reacciones acopladas que ocurren ahí [32]. En ese sentido, la forma de los voltamperogramas que se obtienen contiene ondas bien definidas y finitas en todas las velocidades de exploración, esto porque se experimenta una transferencia electrónica reversible.

También el electrodo químicamente modificado con proteínas se puede utilizar en diferentes disoluciones electrolíticas para diferentes experimentos, incluyendo medios en donde la proteína en disolución se desnaturizaría, esto gracias a que la transferencia electrónica es rápida y se pueden estudiar las proteínas en estos medios antes de que se deterioren. No menos importante, otra ventaja es que se necesita una pequeña cantidad de proteína para inmovilizarla en el electrodo, y en contraste se obtiene una alta sensibilidad de la técnica, ya que, aunque el tamaño de la muestra es pequeño, la concentración en la superficie es alta.

Ahora bien, en voltamperometría de películas de proteínas es importante la manera en la que la proteína se inmoviliza a la superficie. Como vimos en secciones anteriores, la funcionalización química de electrodos a través de adsorción de diferentes moléculas se realiza mediante la formación de monocapas autoensambladas. Para el caso específico de las proteínas, la manera más común de hacerlo es utilizando diferentes moléculas capaces de formar estas monocapas y en cuya cola contengan grupos funcionales que proporcionen sitios de adsorción para las proteínas (Figura 33).



**Figura 33.** Inmovilización de proteínas mediante la modificación de la superficie del electrodo con monocapas autoensambladas. Donde X representa en una molécula un grupo capaz de adsorberse a la superficie conductora, y Y un grupo funcional capaz de interactuar fuertemente con la proteína representada en formas circulares.

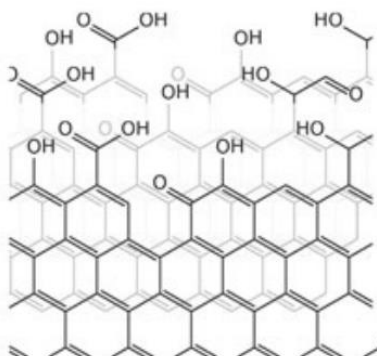
Esto es, las moléculas que forman la estructura de monocapa se adsorben al electrodo a través de su cabeza, y a su vez en su cola las proteínas pueden adsorberse a sus grupos terminales, esto se logra gracias a todas las interacciones electrostáticas, hidrofílicas, hidrofóbicas o dipolares, así como las fuerzas intermoleculares de van der Waals que pueden presentar las proteínas frente a esos grupos. La cantidad tan grande de interacciones intermoleculares que poseen las proteínas dentro de sus estructuras explica que se adsorban fuertemente [\[33,34\]](#).

Armstrong describe el ejemplo de la inmovilización del citocromo c a un electrodo de Au. El electrodo modificado contiene monocapas autoensambladas de alcanotioles que se unieron a la superficie mediante quimisorción, y que poseen en su cola grupos carboxilatos y alcóxidos, al contener esta proteína residuos de lisina con carga positiva alrededor de su sitio activo, puede formar una capa electroactiva estable al interactuar con la cola de los alcanotioles. El principio de esta técnica básicamente consiste en modificar al electrodo con moléculas que presenten en sus terminaciones grupos que tengan afinidad con los residuos que estén en el sitio activo de la proteína que se desea estudiar, para que así el biopolímero se adsorba fuertemente y pueda ser caracterizado. Sin embargo, se debe tener cuidado con la molécula que formará las monocapas, ya que la transferencia electrónica depende su naturaleza, ya sea en sus grupos terminales o en el largo de su cadena espaciadora [\[35\]](#).

#### **1.3.4. Modificación de electrodos para electroquímica de proteínas**

La elección del material del electrodo para modificarlo con proteínas también es importante y se apoya entre otras cosas en las características básicas de cada conductor y en la química de superficie que presente, pues de la interacción de la proteína-electrodo dependerá la respuesta electroquímica que presente. A continuación, se dará una descripción breve de algunas maneras en las que se han funcionalizado electrodos de oro y carbón vítreo con biopolímeros.

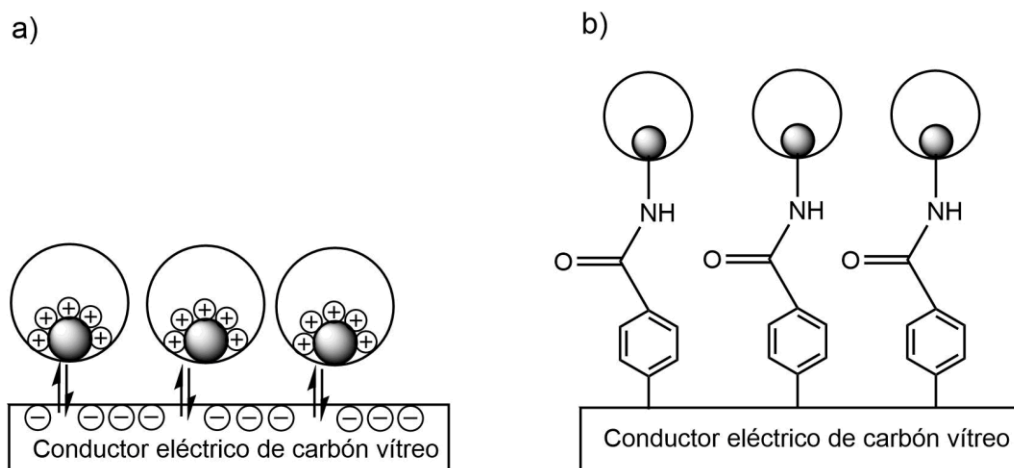
Comúnmente el carbón es el material más utilizado para la bioelectroquímica, pues como se vio en secciones anteriores su accesibilidad, abundancia y estabilidad son altas. El carbón vítreo es un material extremadamente inerte y resistente, y al igual que el grafito se compone de carbonos con hibridación  $sp^2$  conformados en similitud a la condensación del benceno en forma de hexágonos. A este plano hidrófobo, con forma de panal de abeja, se le denomina plano basal y a la superficie del electrodo en dirección perpendicular se le llama plano de borde. Para este electrodo se conoce que en el plano de borde contiene oxígeno, volviéndolo hidrofílico, aunque su estructura exacta aún no está bien definida se considera que la superficie de este conductor es una mezcla de planos basales y de borde, figura 34 [36].



**Figura 34.** Representación de la estructura del carbón vítreo. Se observa que posee el ordenamiento en forma de panal de abejas y también enlaces carbono-oxígeno correspondientes a la mezcla de plano basal y de borde respectivamente. Imagen tomada de [10].

Algunos de los métodos para inmovilizar proteínas en electrodos de carbón vítreo incluyen la adsorción directa de proteínas, figura 35 a, para el caso de este material esto es posible ya que la superficie hidrofílica del carbón vítreo compuesto de oxígenos en sus planos de borde permiten que los biopolímeros interactúen fuertemente con ella a través de la combinación de fuerzas hidrofílicas y electrostáticas. También, como se vio en la sección anterior, se puede modificar químicamente con la formación de monocapas autoensambladas para adaptar la superficie y adsorber la proteína fuertemente. En la figura 35 b se ejemplifica uno de los casos más utilizados bajo esta técnica, que consiste en la formación de

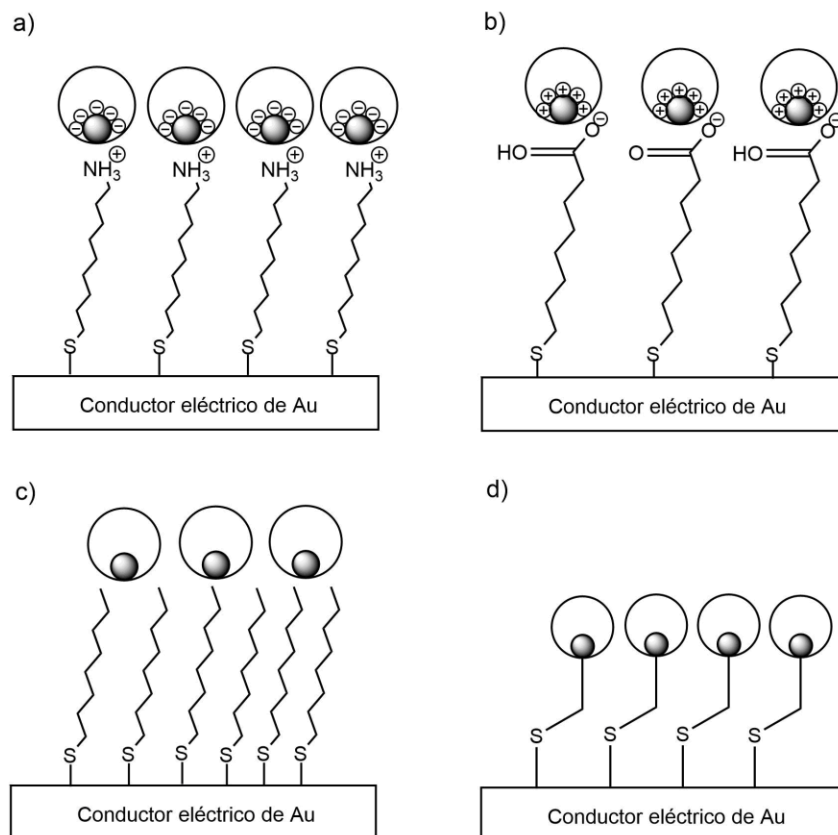
monocapas que contengan en su grupo terminal ácidos carboxílicos, los cuales interactuarán con los grupos aminos que contenga la proteína en su superficie activa y podrán unirse covalentemente a través de la formación de un enlace peptídico [37].



**Figura 35.** Representación esquemática de dos diferentes métodos de preparación de películas de proteínas, simbolizadas en formas circulares, inmovilizadas en electrodos de carbono vítreo. En a) Se observa que las proteínas se adsorben de manera directa a la superficie gracias a las fuerzas intermoleculares y electrostáticas que presenta la superficie del carbono vítreo con las proteínas y b) Muestra la unión covalente de la proteína a través de la formación de un enlace peptídico entre el ácido carboxílico terminal y la amina proveniente de la proteína.

Para el caso de electrodos de oro, este material es preferentemente usado ya que es bien sabido que puede ser fácilmente modificado con compuestos que contengan sulfuro, preferentemente provenientes de alcanotioles, formando monocapas autoensambladas en donde las cadenas de carbono estabilizan la estructura. De igual manera, aquí se pueden realizar diferentes inmovilizaciones dependiendo de la electroquímica de proteínas que se desea observar, y se hace variando los grupos funcionales que se presentan al final de las moléculas de la monocapa, por ejemplo, pueden tener una carga positiva para interactuar con una proteína cargada negativamente o viceversa, figura 36 a y b, cabe mencionar que este principio, aunque es abordado para el oro también puede aplicarse en electrodos de carbono vítreo mediante la utilización de sales aromáticas de diazonio con terminaciones cargadas positivamente. También es posible funcionalizar al conductor de oro añadiendo únicamente cadenas de alcanotioles sin grupos funcionales en su cola

para lograr la adsorción de proteínas hidrófobas figura 36 c, o bien, un método adicional es acoplar directamente la proteína a la superficie del conductor cuando el biopolímero presente en su sitio activo residuos de cisteína figura 36 d [26].



**Figura 36.** Representación gráfica de electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de alcanotioles para adsorber proteínas, simbolizadas mediante las formas circulares. En a) La monocapa de alcanotiol posee en su grupo cola animas cargadas positivamente que inmovilizan proteínas cargadas negativamente, b) El grupo cola de los alcanotioles es un carboxilato e interacciona con proteínas cargadas positivamente. En c) Las cadenas hidrocarbonadas de la capa mono-ensamblada interacciona con proteínas hidrófobas y d) Los residuos de cisteína presentes en la proteína pueden unirse covalentemente a la superficie del conductor a través del enlace  $\text{Au}-\text{S}$ .

La ventaja que presenta este material respecto al carbono es que la formación de la monocapa se puede controlar sin correr el riesgo en que se formen multicapas, ya que el enlace  $\text{Au}-\text{S}$  a pesar de ser algo lábil permite el empaquetamiento ideal en toda la superficie. Sin embargo también presenta algunas desventajas, ya que cambiar las longitudes de la cadena repercute en la velocidad de transferencia electrónica, mientras más grande sea la distancia entre el electrodo y el sitio activo

redox de la proteína menor será la velocidad de transferencia, aunque de igual manera si la cadena es demasiado corta y la distancia disminuye al contrario de lo que se pensaría, la cinética se ve limitada pues la monocapa se vuelve inestable, por lo que se debe encontrar un balance en el número de carbonos que contenga la cadena espaciadora para optimizar el estudio. Otra limitación que presenta el metal es que la ventana de potencial en donde las monocapas son estables es estrecha, pues el enlace entre el azufre y el oro puede romperse separando al azufre de la superficie permitiendo que ahora sufra procesos de oxidación que desaparecen la modificación química del electrodo [\[37\]](#).

Finalmente, la electroquímica de las proteínas representa una poderosa herramienta para proporcionar información respecto a la función y estructura de estos biopolímeros, con múltiples posibles aplicaciones no sólo en áreas como la química, sino también en biología y medicina [\[38\]](#). Por lo que estudiar la manera en la que pueden llegar a optimizarse estos estudios mediante el uso de electrodos químicamente modificados representa el desafío inmediato para la investigación científica.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Elaborar una revisión bibliográfica detallada acerca de la funcionalización de electrodos de carbón vítreo y oro mediante la adsorción de proteínas, para su uso dentro de la técnica de voltamperometría de película de proteína.

### **2.2. Objetivos particulares**

Realizar una revisión bibliográfica exhaustiva en tres bases de datos diferentes en torno a la funcionalización de electrodos de carbón vítreo y oro por medio de la adsorción de proteínas.

Recopilar, sintetizar, describir y clasificar la información obtenida para cada uno de los electrodos y exponer las diferentes técnicas que se han utilizado con diversas proteínas.

Comparar los avances que se han logrado para ambos electrodos y evaluar aquellos que tengan potencial para su implementación y desarrollo en proyectos de investigación que se lleven a cabo en el laboratorio 308 del Departamento de Físicoquímica de esta Facultad.

Presentar este documento como una fuente de consulta primaria para alumnos que trabajen o estén interesados en proyectos experimentales asociados a la formación de electrodos modificados con proteínas para estudios fisicoquímicos de complejos proteína-ligante.

### 3. METODOLOGÍA

Para recabar la información presentada en este trabajo se realizaron varias búsquedas en tres bases de datos bibliográficas de literatura científica: *Scopus* (de la editorial Elsevier), *Web of Science* (de la editorial Clarivate Analytics) y *CAS SciFinder<sup>n</sup>* (de la editorial Chemical Abstracts Service).

El método de búsqueda descrito a continuación se replicó para cada una de las bases de datos anteriormente mencionadas. Cada búsqueda individual estuvo compuesta por dos tipos de grupos de palabras claves basados en diferentes operadores booleanos (AND y NOT). El primer grupo fue constituido por aquellos conceptos relacionados con voltamperometría de película de proteína y el fenómeno de adsorción: *Protein Voltammetry Film*, *Adsorption*, *Protein*, *Chemical modified electrodes*, *Cyclic Voltammetry* y *Protein Adsorption*. Inicialmente se seleccionó de manera arbitraria una de estas palabras y se colocó en la barra de búsqueda principal de la base de datos, posteriormente se añadieron, con el operador booleano AND, los elementos restantes. En cada búsqueda se intercambió una palabra clave principal por otra del conjunto para obtener un mayor número de combinaciones.

Asimismo, se construyó un segundo bloque que contenía los siguientes términos: *Electropolymerization*, *Electrodeposition*, *Lipid*, *Nanotubes*, *Nanoparticles*, *Composites*, *Mesoporus*. Los cuales se tomaron en cuenta para excluirlos por medio del uso del operador booleano NOT, debido a que dentro de la VPP existen diferentes tipos de funcionalización de electrodos aparte de la adsorción, y con otro tipo de biomoléculas que no sean proteínas.

Finalmente, se adicionó con el operador AND el tipo de material del electrodo: *Glassy carbon electrode* o *Gold electrode* según fuera el caso.

Una vez obtenida la primera recolección de literatura arrojada por el proceso anterior reproducido en cada base de datos, se realizó una depuración exhaustiva para cada

una de ellas, mediante la lectura de sus contenidos y se eligió la que presentó información sobre la funcionalización de electrodos de carbón vítreo y oro mediante la adsorción directa de proteínas al conductor eléctrico. Sin embargo, se encontraron algunas fuentes bibliográficas cuyos métodos no llevaban a cabo una interacción directa proteína-electrodo, sino que mediante un reactivo intermedio entre conductor y biopolímero se lograba la elaboración del EQM, de igual manera elaborado bajo el fenómeno de adsorción. Por esta razón, dichos trabajos también se consideraron dentro del presente manuscrito.

## **4. REVISIÓN Y DISCUSIÓN**

Una vez finalizada la búsqueda bibliográfica sobre la funcionalización de electrodos de carbón vítreo y oro para su uso dentro de la VPP los resultados mostraron que aproximadamente a partir del año 1990 la modificación de electrodos con proteínas para diferentes aplicaciones tomó fuerza. Sin embargo, del número total de artículos que arrojaron las bases de datos consultadas, sólo un pequeño número de ellos fue seleccionado bajo el criterio de llevar a cabo, mediante una metodología simple, la funcionalización de la superficie del electrodo a través la adsorción de las proteínas sobre ella.

A continuación, se describirán las metodologías encontradas para modificar electrodos de carbón vítreo y oro con diferentes proteínas. Para practicidad del lector los resultados se encuentran en orden cronológico y al final de cada sección se presenta una tabla resumen de los resultados.

### **4.1. Funcionalización de electrodos de carbón vítreo con proteínas**

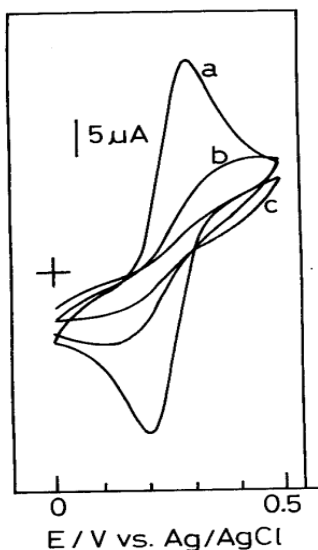
En la investigación sobre la funcionalización de electrodos de carbón vítreo con diferentes proteínas se obtuvieron alrededor de 50 artículos en las tres bases de datos empleadas. Aproximadamente 15 de ellos fueron seleccionados puesto que describían en su metodología la elaboración del EQM únicamente mediante la adsorción directa del biopolímero sobre la superficie del conductor eléctrico. Cabe destacar que, en la recolección de información, algunos trabajos encontrados inmovilizaban a las proteínas, aun bajo una metodología simple, con ayuda de monocapas autoensambladas con diferentes tensoactivos, también mediante el fenómeno de adsorción, por lo que de igual manera fueron incluidos en este estudio de arte.

Dentro de las proteínas que fueron inmovilizadas en la superficie del electrodo de carbón vítreo se encontraron a las hidrofobinas, proteínas de choque térmico, citocromo C y la seroalbúmina, estas primeras 4 están concentradas en el siguiente

apartado, mientras que la hemoglobina y la mioglobina son descritas por separado en secciones posteriores para una mejor distribución.

#### 4.1.1. Electrodo químicamente modificados con diversas proteínas

En 1996 la adsorción directa de la seroalbúmina, proteína mayoritaria dentro del plasma sanguíneo, en electrodos de platino, oro y carbón vítreo fue estudiada por Guo y colaboradores [39]. En su trabajo describen sus resultados en torno a un electrodo de Pt, el cual fue sumergido en una disolución de seroalbúmina humana (ASH) al 0.4 % m/v durante 30 s y 2 min en experimentos independientes, no se menciona la temperatura, y después fue estudiado bajo VC en una disolución de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . Reportan que la adsorción de la monocapa de la proteína sobre la superficie fue capaz de bloquear la reacción redox del par  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  que se lleva a cabo en el electrodo. Esto se ve reflejado en los voltamperogramas cíclicos obtenidos, mostrados en la figura 37, donde se observa que la intensidad de pico para la reacción  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  disminuye considerablemente en los diferentes experimentos con respecto a los picos originales donde no hubo contacto con la disolución de ASH, además de un aumento en la resistencia del sistema. Poniendo al descubierto que al impedir el contacto eficaz entre la molécula redox y el electrodo, es posible monitorear el comportamiento de la adsorción de la proteína sobre la superficie de este.

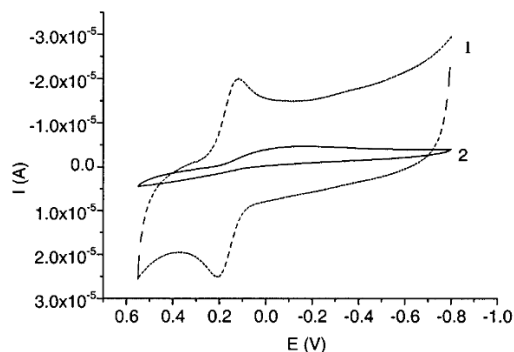


**Figura 37.** Voltamperogramas cíclicos de una disolución  $0.25 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  sobre un electrodo de Pt a una velocidad de barrido de  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ , antes (a) y después de tratamiento en disolución de ASH por 30 s (b) y 2 min (c). Imagen tomada y modificada de [39].

También mencionan que la cinética de adsorción de ASH se ve acelerada cuando al electrodo sumergido en disolución de la proteína le es aplicado un potencial positivo durante diferentes periodos de tiempo previo al estudio de VC. Esto como resultado de la interacción electrostática entre la carga negativa de las moléculas de la ASH y la carga positiva del electrodo, de igual manera la actividad electroquímica de la molécula redox se vio afectada. El comportamiento de la adsorción de la ASH fue verificado también en electrodo de carbón vítreo, para este último se concluyó que la adsorción de la proteína fue exitosa pero menor en comparación con el electrodo metálico, aunque no muestra los voltamperogramas en su artículo [\[39\]](#).

En el 2001 Bilewicz junto con su equipo de trabajo mostraron que las hidrofobinas, pequeñas proteínas presentes en los hongos, podían ser inmovilizadas de manera directa sobre superficies hidrofóbicas, como la del electrodo de carbón vítreo. El electrodo fue modificado con una disolución de la proteína a diferentes concentraciones en experimentos independientes y se registró el tiempo en el que cada uno registró voltamperogramas cíclicos reproducibles. Para esto el electrodo fue pulido y limpiado con ácido nítrico concentrado, su superficie fue cubierta mediante el contacto horizontal del electrodo con la superficie de la disolución de hidrofobina. Las concentraciones reportadas fueron 0.2, 2, 25 y 260  $\mu\text{g}$  por 1 mL de disolución amortiguadora de Tris-HCl 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , durante 24 h, 16.6 h, 20 h y 1.5 h respectivamente a 20 °C [\[40\]](#).

El comportamiento de la adsorción de la proteína fue estudiado por VC utilizando  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  como molécula electroactiva y al electrodo modificado con hidrofobina con una concentración de 0.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los voltamperogramas arrojaron una visible disminución de corriente con el EQM en comparación con el electrodo sin modificar, demostrando que se logró la cobertura de la superficie del conductor a través de monocapas autoensambladas y se reporta que dichas capas estaban fuertemente adsorbidas pues los voltamperogramas no cambiarían a lo largo de varias semanas (Figura 38).



**Figura 38.** Voltamperogramas cíclicos de  $0.75 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en Tris  $0.1 \text{ mol L}^{-1}/\text{HClO}_4$  a un valor de pH de 7, sobre un electrodo de carbón vítreo a una velocidad de barrido de  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ . En donde (1) sin modificar y (2) modificado con hidrofobina, tiempo de autoensamblado 24 h. Imagen tomada de [\[40\]](#).

El procedimiento de adsorción directa mediante del autoensamblaje de las hidrofobinas resultó sencillo y simple, siendo una metodología factible para reproducir y abrir las posibilidades de elaborar nuevas superficies funcionalizadas.

El citocromo c (Cyt c) proteína redox encontrada dentro de las membranas de la mitocondria en las células, y sus interacciones con el ácido desoxirribonucleico (ADN) fueron estudiadas por Bi y su equipo en 2005 mediante VC [\[41\]](#). La metodología que describe el artículo fue basada en el trabajo de Zhao y Pang [\[42\]](#), para la funcionalización de un electrodo de oro con ADN. A la superficie del electrodo de carbón vítreo previamente limpiada con  $\text{HNO}_3$  y sonicada por 3 minutos en acetona y agua respectivamente, fue cubierta con  $50 \mu\text{L}$  de una disolución de ADN ( $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) por 18 h y finalmente se dejó sumergido por 4 h en agua. Posteriormente, el citocromo c se unió a este electrodo funcionalizado a través de otra serie de pasos.

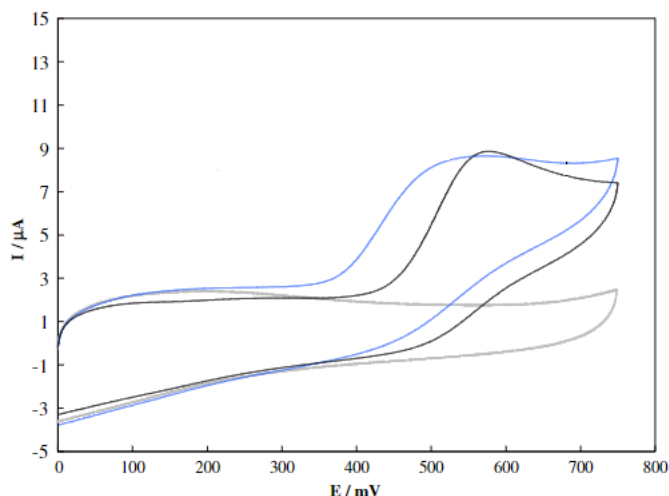
El estudio menciona que haciendo uso de la modificación de un electrodo se demostró que el Cyt c y el ADN pueden interactuar entre sí fuertemente mediante fuerzas electrostáticas, aunque bajo un método más elaborado en comparación a los descritos anteriormente [\[41\]](#).

Heli y colaboradores en el 2007 decidieron retomar la funcionalización de un electrodo de carbón vítreo directamente con ASH [43]. La adsorción directa de la proteína en el conductor fue estudiada bajo voltamperometría cíclica y reportan que este método es una forma sencilla de construir un electrodo modificado con una pequeña cantidad de muestra.

Para su elaboración las películas de la proteína fueron formadas sobre el electrodo previamente pulido y enjuagado con agua destilada, transfiriendo una gota de 2.5 - 3  $\mu\text{L}$  de disolución de ASH con una concentración entre 3 y 5  $\text{mg mL}^{-1}$  sobre la superficie y dejando secar el electrodo a temperatura ambiente. Aunque no se especifica el tiempo exacto de secado la metodología expuesta presenta poca complejidad para inmovilizar a esta proteína en el electrodo, poniendo a este proceso en miras de reproducción. A continuación, se enjuagó con agua destilada y electrolito soporte para eliminar la sustancia no absorbida [43].

La finalidad de este grupo de trabajo al elaborar un EQM adsorbiendo ASH sobre la superficie, fue investigar las interacciones que existen entre la proteína y un ligando. Para esto el ligando usado fue el ácido 8-anilinofteno-1-sulfónico (ANS), compuesto orgánico útil como indicador de cambios conformacionales en las proteínas gracias a sus propiedades de fluorescencia. El ANS presenta un proceso de oxidación irreversible (Figura 39) y el voltamperograma cíclico utilizando el electrodo previamente inmovilizado con albúmina en una disolución de ANS 1  $\text{mmol L}^{-1}$  en disolución amortiguadora de fosfatos 100  $\text{mmol L}^{-1}$ , muestra que su potencial de oxidación se desplaza en dirección positiva, reportan esto como consecuencia de la presencia de ASH en la superficie y de las interacciones electrostáticas y/o covalentes de la proteína con el ligando, sin embargo la electroactividad de ANS no desapareció con el uso del EQM.





**Figura 39.** Voltamperogramas cíclicos de 1 mmol L<sup>-1</sup> ANS en 100 mmol L<sup>-1</sup> de disolución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.4 sobre un electrodo de carbón vítreo a una velocidad de barrido de 0.50 mV s<sup>-1</sup>, donde (gris) electrolito soporte, (azul) sin modificar y (negro) modificado con ASH. Imagen tomada y modificada [43].

A manera de mención, se encontró que en el 2016 la proteína de choque térmico 70 (HSP70) fue estudiada con ayuda de voltamperometría cíclica a través de un biosensor basado en un electrodo de carbón vítreo [44]. En este trabajo el conductor eléctrico fue funcionalizado primero con fullereno C<sub>60</sub> para formar monocapas autoensambladas que permitieran la posterior adsorción de la proteína HSP70 sobre ellas.

Para ello se incubó el electrodo previamente pulido y limpio en una disolución de fullereno a una concentración de 4 mg mL<sup>-1</sup> en tolueno durante 15 minutos. Se secó cuidadosamente con una corriente de Ar y se dejó inmerso toda la noche en una solución 0.018 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Una vez inmovilizado el fullereno sobre la superficie, el conductor fue sumergido en un frasco ámbar que contenía una mezcla de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) con *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (0.4 mmol L<sup>-1</sup> EDC, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> NHS) en un cuarto oscuro por 60 minutos. El EDC fue usado como agente activante de los grupos carboxilo presentes en el fullereno, de esta manera la inmovilización de la HSP70 sobre el fullereno sería más efectiva, además, la presencia de la NHS incrementa la eficiencia del EDC.

Después, el electrodo fue limpiado con agua desionizada y secado con Ar, finalmente 5  $\mu$ L de HSP70 fue depositada en la superficie del conductor previamente funcionalizado con fullereno con una micropipeta y encubado por 45 minutos en un ambiente húmedo. El estudio reporta que este biosensor puede ser fácilmente preparado y responde a concentraciones muy bajas de HSP70 en muestras de suero humano analizadas por ese equipo de trabajo [44].

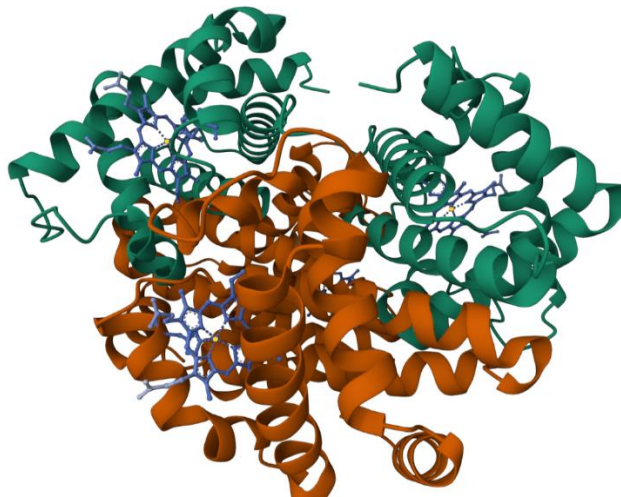
**Tabla 1. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de carbón vítreo químicamente modificados con diversas proteínas.**

Año	Proteína	Reactivo previamente inmovilizado	Sistema electroquímico <sup>a</sup>	Referencia
1996	Seroalbúmina	Directa	ET: Carbón vítreo EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: - Tiempo: 30s; 2 min [39]
2001	Hidrofobina	Directa	ET: Carbón vítreo EA: Lámina de Pt ER: ECS	Temperatura: 20°C Tiempo: 24h; 16.6 h; 20 h; 1.5 h. [40]
2005	Citocromo c	ADN	ET: Carbón vítreo EA: Alambre de Pt ER: ECS	Temperatura: - Tiempo: - [41]
2007	Seroalbúmina	Directa	ET: Carbón vítreo EA: Carbón vítreo ER: Ag <sup>+</sup> /AgCl	Temperatura: 20 °C Tiempo: - [43]
2016	HSP70	Fullereno C <sub>60</sub>	ET: Carbón vítreo EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: - Tiempo: 2 h [44]

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica  
Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos, a excepción del citocromo c, cuya información se omitió por alejarse de nuestros criterios de búsqueda.

### 4.1.2. Electrodo químicamente modificados con hemoglobina

Para el caso de la hemoglobina, hemoproteína encargada del transporte del oxígeno en todo el cuerpo, no fueron encontrados trabajos cuya metodología llevara a cabo la adsorción directa de la proteína al electrodo, únicamente fue reportada su inmovilización sobre monocapas autoensambladas de diferentes tensoactivos, también mediante adsorción. Puesto que tanto los tensoactivos como la hemoglobina (Hb) se unieron con simplicidad al electrodo bajo el mismo fenómeno, se decidió incluir estas metodologías en este estudio del arte. La hemoglobina está conformada por cuatro subunidades, dos de tipo  $\alpha$  y dos de tipo  $\beta$ , en cada una de ellas contiene un grupo hemo electroactivo con un átomo de Fe, razón por la cual esta proteína se vuelve un tema de estudio para entender la transferencia electrónica en macromoléculas biológicas [45]. Este proceso se dificulta debido a que como se observa en la figura 40 los centros redox están inmersos en la estructura del polipéptido, sin embargo, para promover y mejorar la transferencia directa de los electrones se utilizan algunos tensoactivos para modificar al electrodo.

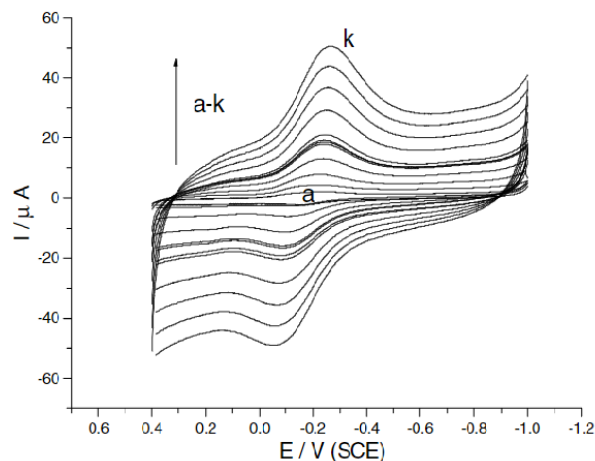


**Figura 40.** Estructura de la hemoglobina donde se ilustra en color azul la presencia de los grupos hemo electroactivos dentro de las subunidades de la proteína, con un átomo de Fe en su interior de color amarillo. Estructura tomada del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Bethesda, E. U. A).

En el 2006 se estudió a la Hb con ayuda de un EQM, mediante la inmovilización de una película de tensoactivo iónico: bromuro de cetilpiridinio (BCP) sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo, y la adsorción de la proteína sobre esta monocapa [\[46\]](#).

El electrodo de carbón vítreo fue cuidadosamente pulido y ultrasonificado en acetona, etanol, NaOH al 5% m/v y agua destilada, posteriormente 10  $\mu\text{L}$  del polímero poliacrilamida (PAM) saturada en cloroformo fueron goteados y secados al aire sobre la superficie, esto con la finalidad de aumentar la estabilidad del electrodo modificado. Después se mezclaron 3  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de BCP  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  y 5  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de Hb  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$ , y fueron goteados sobre la superficie del conductor, finalmente se dejó secar al aire toda la noche. Cuando el electrodo no estaba en uso, era guardado en un cuarto a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  [\[46\]](#).

He y Zhu estudiaron bajo voltamperometría cíclica el comportamiento electroquímico de la Hb una vez absorbido sobre la superficie del electrodo modificado con el BCP. Los voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades usando el EQM en una disolución amortiguadora de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  con pH de 4.22 libre de proteína, muestran un pico de oxidación correspondiente al par redox Fe (III) / Fe (II), y uno de reducción en el barrido de potencial contrario (Figura 41). Este comportamiento denota que el grupo hemo electroactivo de Fe (II) adsorbido en la superficie del electrodo es capaz de oxidarse a Fe (III) y reducirse para volver a la especie Fe (II) en un proceso reversible.



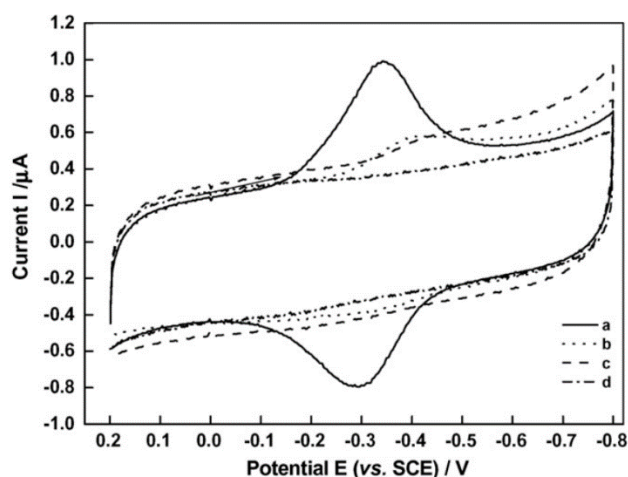
**Figura 41.** Voltamperogramas cíclicos sobre electrodo de carbón vítreo modificado con BCP y Hb ( $0.001 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $0.001 \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente) en disolución amortiguadora de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  libre de proteína  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , a un valor de pH de 4.22. Velocidad de barrido de la a-k: 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5,  $3.0 \text{ V s}^{-1}$ . Imagen tomada [46].

En cuanto a la estabilidad de EQM se reportó que después de un uso continuo del electrodo durante 3 h la corriente de pico de reducción disminuyó un 2%, y tras el almacenamiento al aire durante 7 días la corriente del pico de reducción disminuyó 10%. Aunque no se muestran los voltamperogramas de lo descrito, la electroquímica de la Hb utilizando un EQM a base de películas de tensoactivo pudo realizarse satisfactoriamente.

De acuerdo con Wang y colaboradores en el 2007 [47], la comunicación electrónica directa entre la hemoglobina y superficie de un conductor de carbón vítreo fue estudiada mediante la inmovilización de la Hb sobre monocapas autoensambladas de un tensoactivo tipo géminis mediante el fenómeno de adsorción.

Volúmenes iguales de una disolución de Hb  $16 \text{ mg mL}^{-1}$  y una disolución del tensoactivo  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  fueron mezclados, posteriormente  $3 \mu\text{L}$  de la mezcla tensoactivo-proteína fueron puestos sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo y se dejó secar al aire durante varias horas. El conductor fue mecánicamente pulido y sonicado en  $\text{HNO}_3$ , etanol y agua por 2 minutos cada uno antes de su modificación [47].

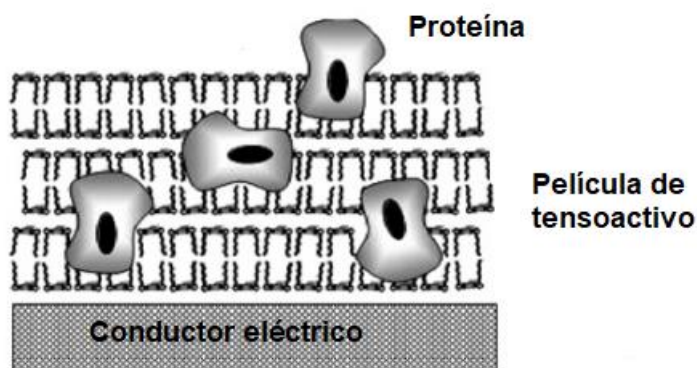
La técnica de voltamperometría cíclica fue ocupada para estudiar el comportamiento electroquímico de la Hb. Los voltamperogramas cíclicos usando el electrodo modificado con Hb y tensoactivo, en una disolución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a un valor de pH de 7.4, muestran un par de picos redox bien definidos de un sistema reversible correspondiente al par Fe (III) / Fe (II) (Figura 42 a). El artículo menciona que se realizaron voltamperogramas con el electrodo modificado solamente con el tensoactivo (Figura 42 c) y con el electrodo sin modificar (Figura 42 d), en ambos casos no se observa ninguna actividad redox. Al modificar el electrodo únicamente con la Hb (Figura 42 b) se observa una débil señal de pico de reducción para Fe (III) / Fe (II), lo que indica que la hemoglobina puede intercambiar electrones directamente con la superficie del conductor eléctrico de manera eficaz cuando ha sido inmovilizada sobre una película de tensoactivo.



**Figura 42.** Voltamperogramas cíclicos sobre electrodo de carbón vítreo en disolución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , a un valor de pH de 7.4 a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Para (a) EQM con tensoactivo tipo géminis y Hb, (b) EQM con película de Hb, (c) sin modificar y (d) EQM con película de tensoactivo. Imagen tomada y modificada de [\[47\]](#).

Los tensoactivos tipo géminis consisten en dos o más pares de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos unidos por un espaciador, por lo que los autores adjudican el éxito de su estudio al tipo de tensoactivo usado. Describen que existen dos tipos de interacciones una de ellas es la interacción electrostática que se desarrolla entre los grupos cabeza del tensoactivo cargados positivamente y la carga negativa de los

residuos de aminoácidos. La segunda es la interacción hidrofóbica entre las zonas hidrófobas dobles del tensoactivo y las regiones hidrofóbicas de las moléculas de Hb. Gracias a estas interacciones la Hb pudo quedar atrapada dentro de la película del tensoactivo (Figura 43) en el ambiente adecuado para la transferencia electrónica directa de la proteína con el conductor de manera satisfactoria.



**Figura 43.** Representación gráfica de la inmovilización de la Hb en la película de tensoactivo tipo géminis. Imagen tomada y modificada de [\[47\]](#).

En el 2010 Mai junto con su grupo de investigación estudiaron a voltamperometría de película de proteína para especificar no sólo los eventos de desdoblamiento de la Hb, sino también como una forma de entender sus cambios conformacionales y alteraciones estructurales. La hemoglobina fue atrapada sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de bromuro de didodecil dimetilamonio (BDDA) [\[48\]](#). En este trabajo el desdoblamiento de proteína inducido por clorhidrato de guanina, agente desnaturizante, fue investigado basándose en la reacción redox que los iones de  $\text{Fe}^{2+}$  inmersos en la estructura de Hb. Se reporta que moléculas de desnaturizante penetraban dentro de la película de tensoactivo permitiendo las alteraciones estructurales de la Hb inmovilizada en el electrodo.

Para elaborar el EQM, se preparó una suspensión BDDA  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  en agua bidestilada y fue sonicada por 30 minutos para su homogenización, después la suspensión fue mezclada a volúmenes iguales con una disolución de hemoglobina  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , en disolución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a un valor de

pH de 7, por 5 minutos. Después 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla fueron esparcidos en la superficie del electrodo de carbón vítreo pulido, limpiado con etanol y sonificado con agua por un minuto con anterioridad, se dejó secar a 4  $^{\circ}\text{C}$  por 1.5 h [48].

Los autores presentan su método como una estrategia no sólo para investigar las contribuciones de los componentes desnaturalizantes sobre la Hb, sino también para las posibilidades de controlar las conformaciones de la proteína mediante VPP.

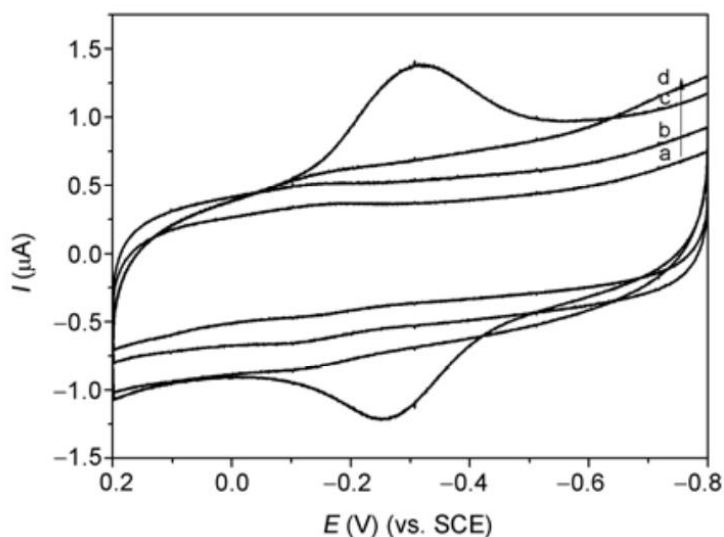
Nuevamente la transferencia electrónica directa y el comportamiento de adsorción de la Hb sobre un electrodo de carbón vítreo fue estudiada en el 2012 ahora utilizando un tensoactivo neutro: éter polioxietileno de alcohol láurico (AEO) [49], tensoactivo neutro con una cola alquílica hidrofóbica en un lado y grupos etoxi hidrofílicos en el otro. Estos grupos fueron variados de 3, 9 y 23 unidades de largo en experimentos independientes.

Para la construcción del dispositivo 5  $\mu\text{L}$  de una disolución de AEO 3  $\text{mg mL}^{-1}$ , con la longitud de grupos etoxi deseada, fueron colocados sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo pretratado para generar la película de tensoactivo. Después, la superficie ya modificada fue cubierta con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de Hb 3  $\text{mg mL}^{-1}$ , a continuación, se limpió con agua destilada para eliminar los restos que no fueron adsorbidos y se secó con  $\text{N}_2$ . Finalmente 8  $\mu\text{L}$  de disolución de quitosano fueron agregados únicamente con la intención para mejorar la unión entre la hemoglobina y el AEO. El electrodo fue guardado en el refrigerador a 4  $^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso y antes de una serie de experimentos, se dejaba al aire a temperatura ambiente para permitir que el disolvente se evaporara [49].

Bajo voltamperometría cíclica, utilizando al electrodo en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  a un valor de pH de 7.0, se denota la importancia que tiene el AEO para el estudio de la transferencia electrónica directa entre proteína y superficie del electrodo. En la figura 44 se observan diferentes voltamperogramas de diferentes EQM elaborados, en la curva (a) EQM con quitosano y Hb, (b) EQM con quitosano y tensoactivo con cadena de 9 unidades de



longitud de grupos etoxi (AEO9) y (d) electrodo de carbón vítreo sin modificar, estas no presentan ninguna respuesta electroquímica en el intervalo de potencial empleado. En contraste con la curva (c) EQM con quitosano, AEO y Hb, dos picos bien definidos están presentes, aludidos a la electroactividad conocida de la Hb. Esto indica la presencia de la transferencia de electrones entre la superficie del conductor y el centro redox del biopolímero inmovilizado. Lv y su equipo de trabajo evidenciaron que el uso de un tensoactivo neutro juega un papel sumamente importante para el estudio de la electroquímica de las proteínas sobre electrodos de carbón vítreo.



**Figura 44.** Voltamperogramas cíclicos sobre electrodo de carbón vítreo en disolución de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a un valor de pH de 7 a una velocidad de barrido de  $200 \text{ mV s}^{-1}$ . Para (a) EQM con quitosano y Hb, (b) EQM con quitosano y AEO9, (c) EQM con quitosano, AEO9 y Hb, y (d) sin modificar. Imagen tomada de [\[49\]](#).

Concluyen que las monocapas autoensambladas del AEO permitieron una adsorción estable y efectiva de la proteína, y que se pueden inmovilizar grandes cantidades de hemoglobina con las unidades de longitud de cadenas hidrofílicas apropiadas. Presentan entonces un método simple y de bajo costo para funcionalizar un electrodo con esta proteína basándose en tensoactivos neutros.

Wu y sus colaboradores en el 2013, utilizaron prácticamente la misma metodología usada por Mai tres años antes y no sólo investigaron el desdoblamiento controlado de la proteína bajo voltamperometría cíclica, sino que el método descrito facilitó el estudio y esclarecimiento de las interacciones que existen entre el óxido nítrico (NO) y las proteínas hemo dentro de la ruta electrocatalítica [50]. Aquí la hemoglobina fue atrapada en un electrodo de carbón vítreo con una película de BDDA, después se agregó urea como desnaturizante para lograr el desdoblamiento del biopolímero. El artículo menciona que, con el desdoblamiento adecuado de la Hb, promovido por los agentes desnaturizantes, se obtuvo un estado de mayor exposición de la proteína sin la pérdida de los grupos hemo para el estudio de sus centros redox, aumentando la sensibilidad de la técnica y promoviendo la capacidad catalítica de la Hb sobre el NO, mostrando una transferencia electrónica directa efectiva.

El conductor de carbón vítreo fue pulido, limpiado con etanol y sonicado con agua destilada por un minuto. Por otra parte, una suspensión de BDDA  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  fue preparada en agua doblemente destilada y sonicada por 30 minutos hasta formar una suspensión homogénea, una vez hecho esto, se mezcló con una disolución de hemoglobina  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , en disolución amortiguadora de fosfatos  $0.7 \text{ mol L}^{-1}$  con un valor de pH de 7, por 5 minutos a volúmenes iguales. Después  $10 \mu\text{L}$  de esta mezcla fueron esparcidos en la superficie previamente tratada del electrodo y secada a  $4^\circ\text{C}$  durante 1.5 h [50]. Finalmente, el método propuesto por los autores parece ser una plataforma prometedora para el estudio sencillo de la transferencia electrónica directa entre proteína y superficie de un conductor eléctrico para las proteínas hemo.

En esta sección el uso de diferentes tensoactivos, tanto iónicos como neutros para una misma proteína, juega un papel importante al momento de elaborar un EQM, pues la transferencia directa de electrones y la respuesta electroquímica de las proteínas aumenta en presencia de monocapas autensambladas de un tensoactivo, como consecuencia de las fuertes interacciones que existen entre ambos [51], permitiendo abrir un campo de aplicaciones para una misma proteína.

Aun teniendo esta versatilidad dentro de los tensoactivos a elegir, los procedimientos expuestos por cada autor, a pesar de involucrar la previa adsorción de otros reactivos, continúan permaneciendo bajo la simplicidad del mismo fenómeno, por lo que representan un escenario factible y prometedor para modificar a un conductor eléctrico bajo alguna de estas metodologías.

**Tabla 2. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de carbón vítreo químicamente modificados con hemoglobina.**

Año	Proteína	Reactivo previamente inmovilizado	Sistema electroquímico <sup>a</sup>	Referencia
2006	Hemoglobina	BCP	ET: Carbón vítreo EA: Pt ER: ECS	Temperatura: 4°C Tiempo: Toda la noche <a href="#">[46]</a>
2007	Hemoglobina	Tensoactivo tipo géminis	ET: Carbón vítreo EA: Alambre de Pt ER: ECS	Temperatura: 20°C Tiempo: Varias horas <a href="#">[47]</a>
2010	Hemoglobina	BDDA	ET: Carbón vítreo EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 1.5 h <a href="#">[48]</a>
2012	Hemoglobina	AEO	ET: Carbón vítreo EA: Alambre de Pt ER: ECS	Temperatura: 4 °C Tiempo: - <a href="#">[49]</a>
2013	Hemoglobina	BDDA	ET: Carbón vítreo EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 1.5 h <a href="#">[50]</a>

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica. Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos.

### 4.1.3. Electrodo químicamente modificado con mioglobina

La mioglobina (Mb), es una pequeña proteína comparada estructural y funcionalmente con la hemoglobina con un solo grupo hemo electroactivo y utilizada por el organismo como proteína de almacenamiento de oxígeno en los músculos [52]. Su transferencia electrónica fue estudiada mediante su inmovilización sobre una capa autoensamblada de un tensoactivo neutro, Tritón X-100 en el 2001, sobre un electrodo de carbón vítreo [53].

Chattopadhyay y Mazudmar llevaron a cabo tres métodos para fabricar el EQM, el primero basado en contener a la proteína en disolución y realizar los experimentos de voltamperometría cíclica correspondientes, en el segundo se recubrió el electrodo con tensoactivo y proteína aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  de cada uno y posteriormente fue cubierto herméticamente con una membrana sutilmente colocada sobre la superficie. Por último, en el tercer método las cantidades deseadas de Tritón X-100 1  $\text{mmol L}^{-1}$  y Mb fueron mezcladas en una disolución amortiguadora de fosfatos 25  $\text{mmol L}^{-1}$  a un valor de pH de 7.0, aproximadamente 20  $\mu\text{L}$  de esta mezcla fue usada para recubrir la superficie del electrodo, sin embargo, no se especifica el tiempo de secado ni las concentraciones con exactitud [53].

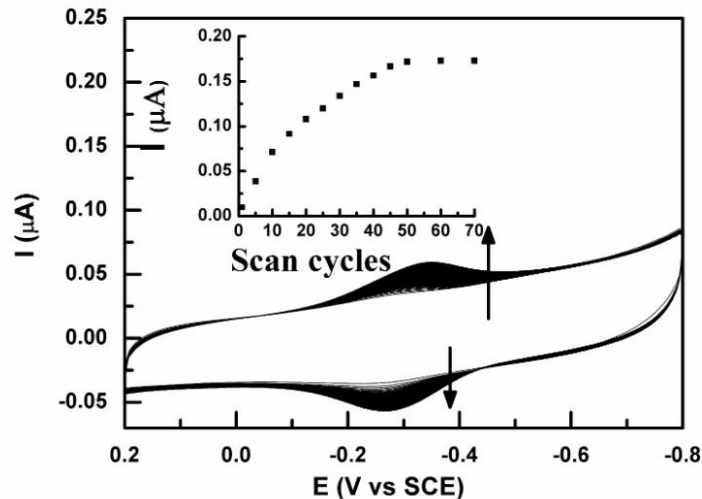
Los autores concluyeron que la modificación del electrodo de carbón vítreo con tensoactivos neutros dio lugar a una mejora en la respuesta electroquímica directa de la Mb, además que dicho comportamiento depende de la estructura y cantidad del tensoactivo. Describen que las moléculas del tensoactivo interactuaron en la superficie del conductor de manera específica y eran capaces de anclar las moléculas de la Mb en una orientación adecuada, esto como resultado de la hidrofobicidad del Tritón X-100.

En el 2015 la inmovilización de la Mb sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de tensoactivo Brij 56 fue llevada a cabo [54].

El Brij 56, éter hexadecil polietilenglicol, es un tipo de tensoactivo neutro con una larga cola de hidrocarburo escasamente utilizado para VPP, por lo que este trabajo buscó reconocer la viabilidad del uso de este reactivo para el estudio de la transferencia electrónica directa entre la proteína y la superficie del electrodo.

En la mayoría de los casos, las proteínas y los tensoactivos usadas para elaborar un EQM eran mezcladas y posteriormente cubrían la superficie del electrodo, sin embargo, Xu y sus colaboradores cuestionan que bajo este proceso es difícil controlar la cantidad y la orientación de las proteínas, por lo que la intención de su investigación fue proporcionar un nuevo método para inmovilizar y orientar las proteínas de manera más eficiente.

Para fabricar el EQM fueron expuestos dos procedimientos, en el primero mediante método voltamperométrico, el conductor de carbón vítreo recién pulido se sumergió en una disolución de Brij 56  $8 \text{ mg mL}^{-1}$  a  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 1 hora. Posteriormente se lavó con agua destilada, se colocó en una disolución  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  de Mb con disolución amortiguadora de fosfatos  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  con un valor de pH de 7.0, y se realizaron voltamperogramas cíclicos consecutivos (Figura 45), donde se observa el par de picos redox obtenidos característicos para el par Fe (III)/Fe(II). La intensidad de corriente estable se alcanzó aproximadamente después de 50 ciclos, indicando la saturación de la proteína en la película de Brij 56 previamente inmovilizada [\[54\]](#).

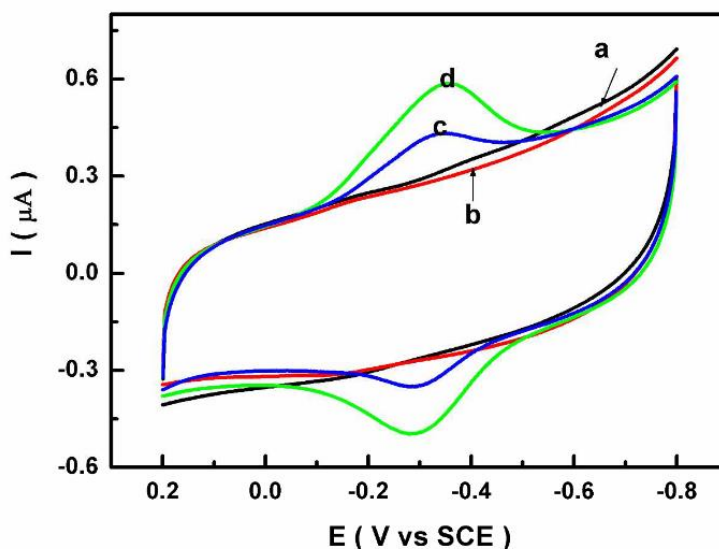


**Figura 45.** Voltamperogramas cíclicos consecutivos sobre electrodo de carbón vítreo modificado con Brij 56 en una disolución amortiguadora de fosfatos  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  con un valor de pH de 7.0 con disolución de Mb  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . En la gráfica insertada: Relación entre el número de ciclos y la corriente de pico anódico. Imagen tomada de [54].

En el segundo procedimiento, para un electrodo de carbón vítreo diferente, bajo la adsorción directa de proteína y tensoactivo, se mezclaron  $10 \mu\text{L}$  de una disolución de Mb y  $10 \mu\text{L}$  de una disolución de Brij 56 ambas a concentración  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ , y una alícuota de  $5 \mu\text{L}$  de esa mezcla se extendió sobre la superficie limpia del electrodo, se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó en el refrigerador durante toda la noche antes de ser utilizado [54].

Ambos EQM fueron caracterizados por voltamperometría cíclica, en la figura 46, se observan los gráficos realizados para los electrodos sin modificar (curva a), EQM con Brij 56 (curva b), EQM elaborado bajo la mezcla de Mb y Brij 56 (curva c) y EQM elaborado bajo el método voltamperométrico (curva d). Todos estudiados en disolución amortiguadora de fosfatos  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  a un valor de pH de 7.0. Para el electrodo sin modificar y modificado solamente con tensoactivo (curva a y b) no aparece ninguna señal electroquímica, mientras que en los electrodos modificados con Mb y tensoactivo para ambos procedimientos (curva c y d) existe la presencia de los picos de óxido-reducción atribuidos al grupo hemo presente

en la Mb, lo que sugiere que Brij 56 podría actuar como un promotor para ayudar a la transferencia electrónica.



**Figura 46.** Voltamperogramas cíclicos sobre un electrodo de carbón vítreo en una disolución amortiguadora de fosfatos  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  un valor de pH de 7.0 libre de Mb a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , para (a) electrodo sin modificar, (b) modificado con Brij 56, (c) modificado con Mb y Brij 56 mezclando proteína y tensoactivo y (d) electrodo modificado con Mb y Brij 56 bajo método voltamperométrico. Imagen tomada de [54].

Sin embargo, la diferencia en las respuestas electroquímicas para la Mb entre los EQM hechos bajos dos metodologías distintas se puede observar entre la curva c y d, ya que la intensidad de corriente para el EQM hecho bajo el método voltamperométrico es mayor frente al segundo EQM elaborado mediante adsorción directa. Xu y su equipo explica que el fenómeno podría deberse a la orientación favorable de la Mb en la película de Brij 56 cuando se inmovilizó bajo voltamperometría, aumentando de esta manera la exposición de su centro redox, facilitando la transferencia electrónica entre la superficie del electrodo y el sitio activo de la Mb, y en consecuencia incrementando la señal de intensidad de corriente. A pesar del contraste que presentan los autores entre dos metodologías distintas, ambos EQM se fabrican con sencillez, son controlables y reproducibles.

En el artículo de Chattopadhyay y Mazumdar [53], publicado en el 2001, y bajo el procedimiento descrito anteriormente fue estudiada también la peroxidasa del rábano picante, la cual pertenece al grupo de las enzimas oxidorreductasas y cumple procesos dentro de la producción y degradación de diferentes substratos [55,56], obteniendo resultados exitosos. Cabe mencionar que, dentro de la búsqueda que se realizó entre las bases de datos fueron encontrados algunos trabajos donde se funcionalizaban electrodos con enzimas también bajo el fenómeno de adsorción, como consecuencia, a pesar de no ser nuestro sustrato de interés se describe muy brevemente el diseño de EQM con enzimas en el siguiente apartado.

**Tabla 3. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de carbón vítreo químicamente modificados con mioglobina.**

Año	Proteína	Reactivo previamente inmovilizado	Sistema electroquímico <sup>a</sup>		Referencia
2001	Mioglobina	Tritón X-100	ET: Carbón vítreo EA: Rejilla de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: - Tiempo: -	[53]
2015	Mioglobina	Brij 56	ET: Carbón vítreo EA: Lámina de Pt ER: ECS	Temperatura: 20°C Tiempo: -	[54]
2015	Mioglobina	Brij 56	ET: Carbón vítreo EA: Lámina de Pt ER: ECS	Temperatura: 35°C Tiempo: 1 h	[54]

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica. Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos.



#### 4.1.4. Electrodo químicamente modificados con enzimas

El método de inmovilización de enzimas ofrece la posibilidad de aplicaciones médicas y de la industria alimentaria, es por ello que Nancy Ferreyra en conjunto con su grupo de investigación en el 2004, con el objetivo de producir películas estables y reproducibles, investigaron la posibilidad de funcionalizar un electrodo de carbón vítreo con glucosa oxidasa (GOx), basándose en una reacción entre la enzima y una monocapa de antígenos previamente adsorbida sobre la superficie, sin embargo, el procedimiento descrito resulta complejo y poco práctico para los fines de esta investigación [57].

Por otro lado, en 2005 Corvis y su equipo de trabajo estudiaron la inmovilización de dos enzimas, peroxidasa del rábano picante y glucosa oxidasa la cual se llevó a cabo con gran éxito por adsorción sobre un electrodo de carbón vítreo con ayuda de hidrofobinas [58], que como se mencionó en la sección 4.1.1 estas pequeñas proteínas son reconocidas por su capacidad de adherencia en las superficies, además de fungir como vínculo entre las superficies y moléculas electroactivas. Bajo voltamperometría cíclica y amperometría se siguió la actividad catalítica de las enzimas con miras a tomar dicha actividad para aplicaciones en tecnologías basadas en catálisis.

El electrodo de carbón vítreo fue recubierto con una disolución acuosa de hidrofobina con concentración  $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$  durante 30 minutos. Luego, fue limpiado con agua destilada y sumergido en una disolución amortiguadora de fosfatos  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  con un valor de pH de 7.0 con glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano de concentraciones  $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $0.7 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivamente en experimentos independientes durante 30 minutos. Finalmente, las partículas no absorbidas fueron retiradas con agua destilada. Una vez funcionalizado el conductor se dejó secar en un cuarto a una temperatura de  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  [58].

Los autores concluyeron que el planteamiento presentado en su trabajo permite preparar de manera fácil y con estable manufactura superficies de electrodos basados en enzimas para posibles aplicaciones en biosensores.

Por último, la lacasa es una enzima singular y versátil, al igual que las peroxidasas se encuentra dentro del grupo de las reductasas, y una de sus funciones es catalizar la oxidación de una gran variedad de compuestos fenólicos, aminas aromáticas e incluso iones inorgánicos [55,56]. Con el fin de evaluar la utilidad de esta enzima en aplicaciones bioeléctricas, se monitoreó la transferencia directa de electrones a través de voltamperometría cíclica a temperaturas altas y moderadas haciendo uso de un electrodo inmovilizado con esta enzima en [59].

Para fabricar el EQM, primeramente, se preparó una disolución a 0.5 mg mL<sup>-1</sup> de lacasa con 0.2% de soporte de agarosa, este polisacárido es comúnmente usado para mejorar la adsorción de la enzima, basándose en el enlace que resulta entre las lisinas presentes en las lacasas y los grupos aldehído de la agarosa [60]. A continuación, se aplicaron 50 µL de esta mezcla sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo y se dejó secar por 24 h a 4 °C [59]. La electroactividad fue monitoreada por voltamperometría cíclica, y sus propiedades físicas lograron ser caracterizadas.

**Tabla 4. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de carbón vítreo químicamente modificados con enzimas.**

Año	Proteína	Reactivo previamente inmovilizado	Sistema electroquímico <sup>a</sup>		Referencia
2005	Glucosa oxidasa y peroxidasa	Hidrofobina	ET: Carbón vítreo EA: Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 1 h	[58]
2011	Lacasa	Directa	ET: Carbón vítreo EA: Lámina de Pt ER: ECS	Temperatura: 4°C Tiempo: 24 h	[59]

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica. Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos.

## **4.2. Funcionalización de electrodos de Au con proteínas**

Tras la investigación exhaustiva en las tres bases de datos diferentes sobre la funcionalización de electrodos de oro con proteínas, se obtuvieron un total de 47 artículos, de los cuales 24 fueron seleccionados para este estudio del arte. Los criterios de selección se basaron en la búsqueda de la inmovilización de las proteínas sobre la superficie metálica mediante el fenómeno de adsorción. Caso parecido al electrodo de carbón vítreo, durante la recolección de información se encontró el uso de alcanotioles para la adsorción de los biopolímeros, en consecuencia, tanto la adsorción directa de la proteína como su adsorción sobre alcanotioles fueron incluidas en esta revisión bibliográfica.

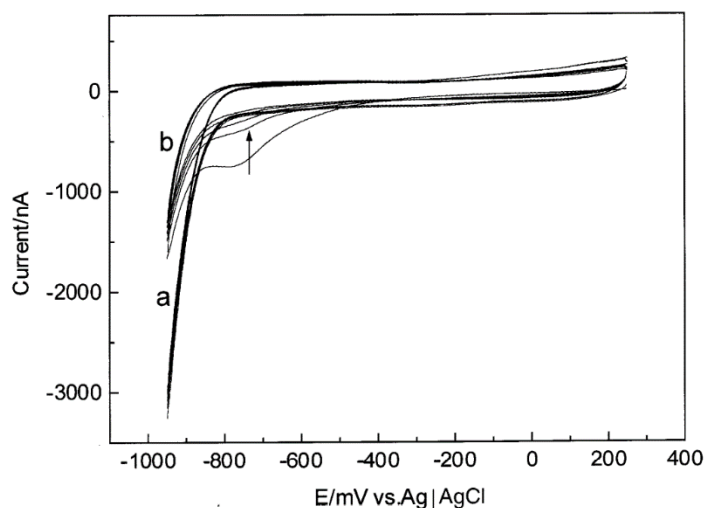
Se encontró una gran diversidad de proteínas usadas para VPP como la azurina, concanavalina A, avadina, ferritina, entre otras concentradas en la primera sección, mioglobina, hemoglobina y citocromo c en las secciones posteriores. Debido a la frecuencia con la que se encontraba la funcionalización de electrodos con enzimas, también se incluyó un apartado describiendo el uso de este biomaterial.

### **4.2.1. Electrodos químicamente modificados con diversas proteínas**

Las metalotioneínas (MT) son un grupo de proteínas de baja masa molar y ricas en residuos de cisteína, gracias a lo cual tienen la capacidad selectiva de fijar iones metálicos como Zn, Cd, Hg y Cu a través de enlaces tiolato [\[61\]](#). Estas proteínas desempeñan un importante papel biológico en el transporte y almacenamiento de iones metálicos esenciales y en la desintoxicación de iones metálicos tóxicos [\[62\]](#). El hecho de que estas proteínas contengan un gran número de cisteínas en su estructura les permite unirse directamente en superficies de oro a través de sus grupos tiol, por lo cual en el 2000 Ju y colaboradores estudiaron bajo voltamperometría cíclica una metalotioneína autoensamblada sobre un conductor de oro [\[63\]](#).

Para la fabricación del EQM el electrodo de oro fue pulido mecánicamente con alúmina, después de eliminar las trazas de alúmina de la superficie con agua y limpiando brevemente en un baño ultrasónico, el electrodo se sumergió en una disolución amortiguadora de Tris-HCl  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  a un valor de pH 7.4 que contenía  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de MT durante 48 h para el autoensamblaje de la proteína en la superficie de oro. La MT con un contenido de Cd del 6.7% y un contenido de Zn del 0.5% provenía de hígado de conejo [63].

Para los voltamperogramas cíclicos realizados en una disolución amortiguadora de Tris-HCl  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  comparando el electrodo de oro sin modificar y el electrodo con MT adsorbida, el EQM muestra un pico de reducción a  $-0.77 \text{ V}$  (Figura 47 curva b) el cual los autores proponen como resultado de la reducción del CdMT adsorbido y con lo cual se indica que la MT se adsorbió exitosamente sobre la superficie del electrodo Au, sin embargo, la corriente de pico catódico disminuye tras barridos cíclicos continuos.



**Figura 47.** Voltamperogramas cíclicos sobre electrodo de oro en disolución amortiguadora de Tris-HCl  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  con un valor de pH de 7.4 a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Para el electrodo de Au sin modificar (a) y el electrodo de Au con MT adsorbida (b). Imagen tomada de [63].

Se describió que la MT puede entonces adsorberse sobre las superficies de electrodos de Au a través de sus residuos de cisteína gracias a la formación de enlaces tiolato para formar una monocapa autoensamblada, la cual reportan puede contribuir a la determinación de iones  $\text{Hg}^{2+}$  en trazas.

Por otro lado, la azurina es una proteína de color azul intenso que contiene un ion de cobre en su sitio activo y fue estudiada por Jeuken y Armstrong en el 2002. Llevaron a cabo la elaboración de un EQM para la inmovilización de azurina en una monocapa autoensamblada de 1-decanotiol sobre un electrodo de oro estudiado bajo voltamperometría cíclica [\[64\]](#).

Para la fabricación del EQM la superficie del electrodo de oro se limpió mecánicamente mediante pulidos sucesivos con alúmina, después de ello el electrodo fue sonicado con agua. A continuación, la superficie se limpió electroquímicamente ciclando 10 veces entre 0.2 - 1.0 V frente a un ECS en una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Los átomos de oro expuestos en la superficie del conductor se oxidan y se reducen durante esta exploración. Para producir la monocapa autoensamblada de alcanotiol, el electrodo de oro se sumergió en una disolución de 1-decanotiol 1-5 mmol  $\text{L}^{-1}$  en etanol durante 24 h a 22 °C, se enjuagó con etanol y se secó al aire. Finalmente se formó una película de proteína sobre el electrodo sumergiéndolo en 100 mL de una disolución de azurina 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  por 16 h a 22 °C [\[64\]](#).

En su investigación los autores dejaron al descubierto la capacidad de la VPP para detectar la transferencia electrónica entre la proteína adsorbida y la superficie del conductor eléctrico sin el impedimento de la difusión lenta.

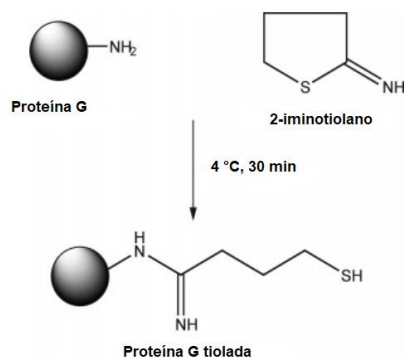
Tres años después, en el 2005 Schön y su equipo de trabajo elucidaron mediante técnicas electroquímicas el mecanismo de acción de sensores de canales iónicos basados en electrodos de oro modificados con proteínas [\[65\]](#). Para la fabricación de los EQM utilizaron como proteínas a la concanavalina A y tiroglobulina en experimentos independientes. El electrodo de oro fue limpiado y pulido con alúmina hasta un acabado espejo, enjuagado con agua destilada y limpiado por 30 s con

una disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%v/v y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en proporción 2:3. Posteriormente el electrodo recién limpiado se incubó en una disolución de la proteína correspondiente a una concentración de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  en  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl durante 1 h, y después se enjuagó con agua destilada para su uso [65].

Además de los conocimientos fundamentales que se abordan en esta investigación sobre el mecanismo de estos sensores con aplicación en el contexto biológico, los autores mencionan que con el uso de EQM mediante la adsorción directa de las proteínas se halló nueva información acerca de la transferencia electrónica entre el biopolímero y el electrodo. A parte de presentar un nuevo panorama para el diseño, la optimización y la adaptación de nuevos biosensores bajo esta técnica.

En el 2007 la viabilidad de formar una capa de proteína G tiolada directamente sobre la superficie de un electrodo de Au como método para la inmovilización de anticuerpos en un inmunosensor electroquímico fue estudiada por Flower y su grupo de investigación [66]. En su trabajo los autores mencionan que su metodología elimina la necesidad de formar una monocapa autensamblada previa de alcanotioles para la posterior adsorción de la proteína, a través de la unión directa a una capa del biopolímero con el conductor eléctrico, simplificando de esta manera la elaboración del EQM y reduciendo el tiempo de autoensamblaje.

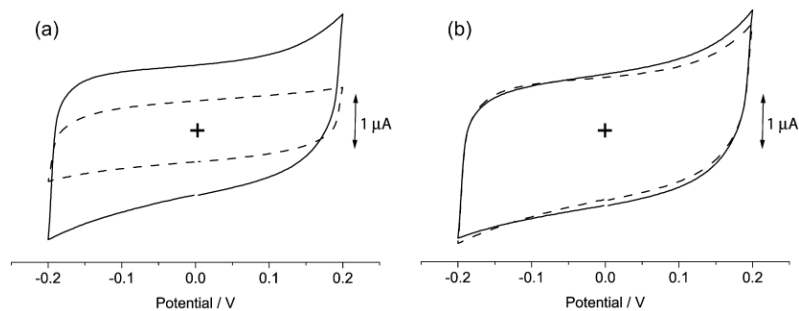
Para ello los grupos amina de los residuos de lisina dentro de la proteína G, proteína de la pared celular bacteriana de *Streptococci* [67], fueron primeramente convertidos a grupos tiol usando 2-iminotiolano. Se hizo reaccionar un exceso molar de 10 veces de 2-iminotiolano preparado en disolución amortiguadora de fosfatos (con un valor de pH 7.6  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) con proteína G previamente disuelta en disolución de fosfatos durante 30 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 48).



**Figura 48.** Modificación de residuos de lisina de la proteína G con 2-iminotiolano. Imagen tomada y modificada de [66].

Posteriormente el exceso de 2-iminotiolano se eliminó mediante centrifugación y la proteína se concentró a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Antes de la formación de la capa de la proteína, la superficie del electrodo de oro se pulió con alúmina hasta obtener un acabado espejo, después un alícuota de  $10 \mu\text{L}$  de la proteína G tiolada se aplicó sobre la superficie del electrodo durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, el electrodo se lavó con 1 mL de disolución amortiguadora de fosfatos durante 5 min con agitación ocasional [66].

La formación de esta capa autoensamblada de proteína se estudió bajo experimentos de voltamperometría cíclica en disolución amortiguadora de fosfatos comparando al electrodo de oro antes y después de la inmovilización directa de la proteína. Se obtuvieron voltamperogramas con una meseta de corriente y para el electrodo funcionalizado se observa una disminución en la intensidad de corriente como resultado de la reducción del área electroactiva de la superficie del electrodo (Figura 49 a). Para evidenciar el efecto de la presencia del biopolímero se realizaron los mismos experimentos con el electrodo de Au sin modificar y en presencia de la proteína G no tiolada (Figura 49 b) durante 1 h sin embargo no hubo cambios significativos en la corriente lo que sugiere la ausencia de la capa de proteína apreciable sobre la superficie del electrodo.



**Figura 49.** Voltamperogramas cíclicos sobre un electrodo de oro en disolución amortiguadora de fosfatos  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  con un valor de pH 7.6, a una velocidad de barrido de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . Para antes (línea sólida) y después (línea punteada) de la aplicación de (a) proteína G tiolada o (b) proteína G no tiolada. Imagen tomada de [66].

Se concluyó en este trabajo que la proteína G tiolada tiene una alta afinidad por la superficie de un electrodo de Au, lo que facilita la formación directa de una capa de proteína autoensamblada en sólo 1 h. Dicha capa provee un prometedor y atractivo medio para inmovilizar anticuerpos en inmunosensores electroquímicos y otros sistemas similares.

La siguiente proteína es la avidina, glicoproteína presente en los huevos de diversas especies de aves, capaz de unirse a la biotina formando un complejo altamente estable [68], estas interacciones avidina-biotina fueron estudiadas en el 2008 por el grupo de investigación de Tlili sobre un electrodo de oro [69]. Se fabricó un EQM mediante la formación de una monocapa autoensamblada de alcanotioles que poseían en su grupo cola el grupo funcional éster, el cual reaccionó bajo un ataque nucleofílico por parte del grupo amino de la biotina para formar un enlace covalente entre ellos, posteriormente se adsorbió la avidina sobre esta superficie previamente modificada.

El electrodo de oro fue pulido con alúmina, limpiado con etanol y se secó bajo flujo de  $\text{N}_2$ . Para formar las monocapas autoensambladas de alcanotiol, el electrodo se sumergió en una disolución de dioxano con  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de éster de 16-mercaptohexadecanoico-ftalimidato ( $\text{SH-C}_{15}\text{NHP}$ ) por 2 h a temperatura ambiente. Luego, se enjuagó a fondo con dioxano y se secó bajo corriente de  $\text{N}_2$ . Para la unión covalente con la biotina el EQM con alcanotiol fue tratado con una disolución de

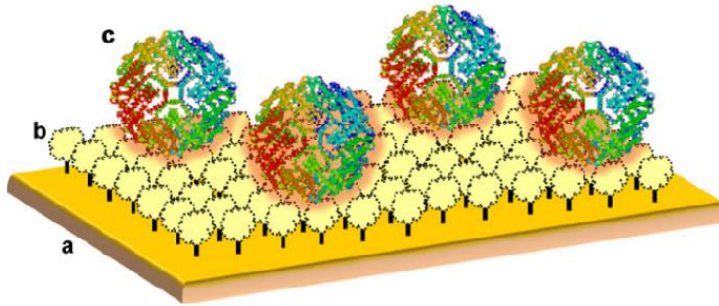


biotina  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  en DMSO por 30 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo el electrodo fue limpiado con DMSO para remover la biotina que no reaccionó y fue incubado en una disolución de avidina  $600 \text{ ng mL}^{-1}$ , aunque no se especifica el tiempo, para la adsorción del biopolímero sobre la monocapas previamente inmovilizada [69].

Bajo esta metodología, Tlili y autores reportan que fue la primera vez que el estudio entre la biotina y la avidina fue llevado a cabo, por lo que representa una manera útil de inmovilizar biomoléculas que darán lugar a una amplia gama de nuevos biosensores.

La ferritina es una proteína redox de almacenamiento de hierro que se encuentra en la mayoría de los organismos y consta de 24 subunidades, las cuales forman una capa hueca capaz de atrapar iones  $\text{Fe}^{2+}$  en su interior. Los iones de hierro ferroso adsorbidos pueden oxidarse y almacenarse dentro de esta metaloproteína en forma de  $\text{Fe}^{3+}$ .

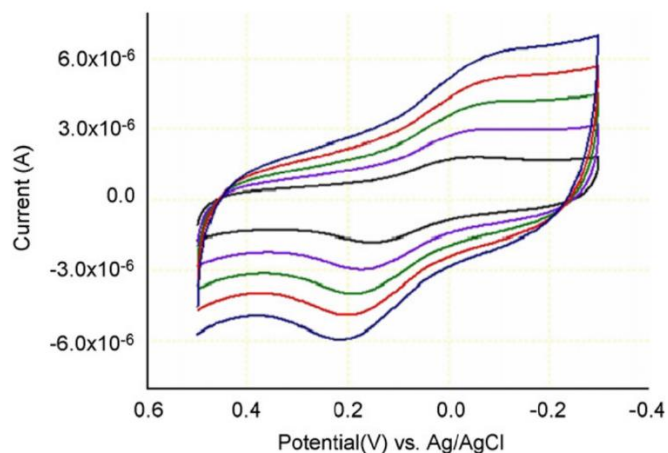
En el año 2008 de la mano de Choi y sus colaboradores presentaron una capa inmovilizada de esta proteína sobre una superficie de oro modificada con alcanotiol [70]. El ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) contiene un grupo tiol, que se une a la superficie de oro y un grupo carboxilo que interacciona electrostáticamente con los grupos amina de la proteína para poder ser inmovilizada mediante adsorción (Figura 50), por lo que su uso es muy común como conector entre conductor y biopolímero.



**Figura 50.** Representación de la ferritina inmovilizada sobre la superficie del conductor eléctrico. En donde (a) es el electrodo de oro, (b) 11-MUA y (c) la ferritina inmovilizada en la superficie. Imagen tomada de [\[70\]](#).

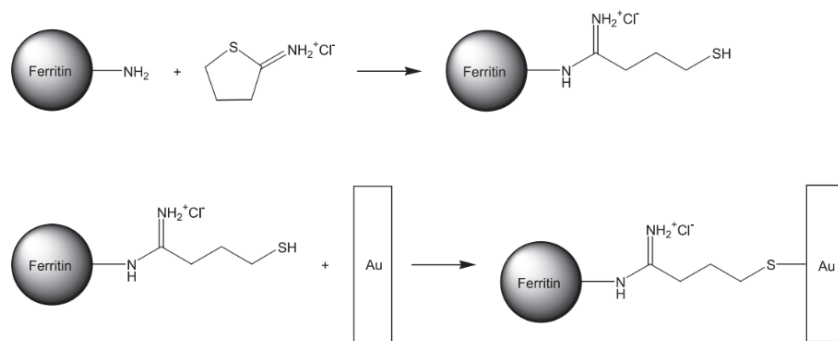
Para la elaboración del EQM el electrodo de oro primeramente se trató con una mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  70% v/v y  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v/v a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, se limpió con agua y se sumergió en etanol puro durante varias horas. Una vez limpio el electrodo, se sumergió en una disolución en etanol con 11-MUA  $20\text{ mmol L}^{-1}$  por 6 h, después se enjuagó con agua y etanol para eliminar el exceso del alcanotiol. Finalmente, para llevar a cabo la adsorción electrostática de la proteína, una muestra de disolución de ferritina  $0.5\text{ mg mL}^{-1}$  en disolución amortiguadora de fosfatos (con valor de pH 7.4) se depositó en el electrodo previamente modificado durante 6 h, transcurrido el tiempo el sustrato de oro se enjuagó con disolución amortiguadora de fosfatos [\[70\]](#).

Mediante voltamperometría cíclica se analizó la electroquímica de la proteína, en la figura 51 se observa un pico de reducción a  $-50\text{ mV}$  y un pico de oxidación a  $150\text{ mV}$ , estos resultados demuestran que la ferritina inmovilizada en el electrodo de oro conserva su comportamiento redox incluso a diferentes velocidades de barrido. Por lo tanto, los sistemas de adsorción electrostática modificados con alcanotioles fueron eficientes para mantener la actividad electroquímica del biomaterial sobre el conductor eléctrico, y la monocapa autoensamblada de ferritina podría ser aplicada en bioelectrónicos o en biosensores en un futuro.



**Figura 51.** Voltamperogramas cíclicos sobre electrodo de oro en disolución HEPES 10 mmol L<sup>-1</sup>, con un valor de pH 7.0, a velocidades de barrido 10, 50, 100 y 500 mV s<sup>-1</sup>. Imagen tomada de [70].

En ese mismo año, el equipo de trabajo de Won estudió también la ferritina, la proteína fue inmovilizada mediante dos métodos diferentes. Uno de ellos consistió en introducir grupos tiol (-SH) a la ferritina través de la reacción entre las aminas primarias presentes en los residuos de lisina con 2-iminotiolano·HCl para posteriormente unir la proteína tiolada a un electrodo de oro (Figura 52). En el segundo método, el electrodo de oro fue modificado primero con diferentes tipos de succinimidilo para formar una monocapa autoensamblada de estos compuestos, y luego se unió covalentemente la ferritina al EQM [71].

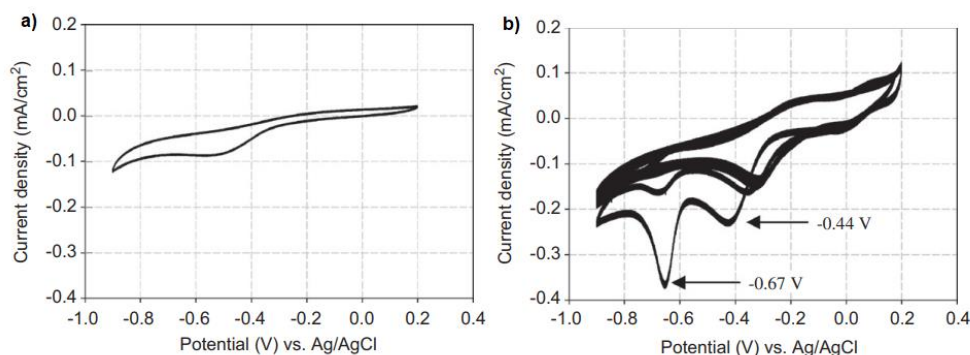


**Figura 52.** Diagrama esquemático de la inmovilización de ferritina sobre electrodo de oro usando 2-iminotiolano·HCl. Imagen tomada de [71].

En la primera metodología, a una disolución acuosa de 2-iminotiolano·HCl de concentraciones 0.3, 0.6 y 1.2 mmol L<sup>-1</sup> para experimentos independientes, fue agregada una disolución de ferritina 10 mg mL<sup>-1</sup>, la mezcla fue incubada por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente el electrodo de oro, previamente limpiado y pulido, fue sumergido en la disolución de ferritina tiolada por 18 h a temperatura ambiente y después fue limpiado con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 mol L<sup>-1</sup> [71].

Para la inmovilización de la ferritina sobre una monocapa autoensamblada de succinimidilo, el electrodo de oro previamente limpiado y pulido con alúmina fue sumergido en una disolución de 1,4-dioxano con 10 mmol L<sup>-1</sup> de mercaptopropanol y 1 mmol L<sup>-1</sup> de diferentes compuestos disulfuro de succinimidilo (para experimentos independientes) por 1 h a temperatura ambiente. Luego, fue limpiado con acetona y disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 mol L<sup>-1</sup> con valor de pH de 8.0. Finalmente, el EQM fue nuevamente sumergido ahora en una disolución de ferritina 0.2 mg L<sup>-1</sup> en disolución amortiguadora de fosfatos por 18 h a 4 °C, para la adsorción de la proteína sobre la monocapa, terminado el tiempo el conductor fue enjuagado con disolución de fosfatos [71].

A pesar de que ambas metodologías presentadas anteriormente cumplen con nuestra búsqueda, se mostrarán a continuación los voltamogramas cíclicos reportados para la primera metodología. En contraste con el electrodo sin modificar (Figura 53 a), el electrodo inmovilizado con ferritina tiolada mostró picos de reducción en -0.67 V y -0.44 V (Figura 53 b), indicando la transferencia electrónica exitosa entre la proteína redox inmovilizada y el conductor eléctrico de oro. Dichos picos están asociados a la reducción del óxido férrico (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y el fosfato férrico (FePO<sub>4</sub>) respectivamente, presentes en la estructura de la ferritina [72]. Reportan los autores que, al aumentar el número de ciclos el pico a -0.67 V disminuyó y desapareció para el tercer ciclo, pues el Fe<sup>3+</sup> se redujo y el Fe<sup>2+</sup> resultante se liberó de la proteína a la disolución. Con este trabajo se logró inmovilizar la proteína almacenadora de Fe sobre una superficie de oro satisfactoriamente.



**Figura 53.** Voltamperogramas cíclicos sobre un electrodo de oro en disolución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  con valor de pH de 7.0, a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Para a) electrodo sin modificar, y b) electrodo modificado con ferritina tiolada inmovilizada usando 2-iminotionlano-HCl  $0.6 \text{ mmol L}^{-1}$ . Imagen tomada de [71].

El 2011 la formación de una monocapa autoensamblada de 11-MUA y cisteamina sobre una superficie de oro para la posterior adsorción de la estreptavidina (proteína con gran afinidad por la biotina) sobre el EQM fue estudiada por Marques y su equipo de investigación [73].

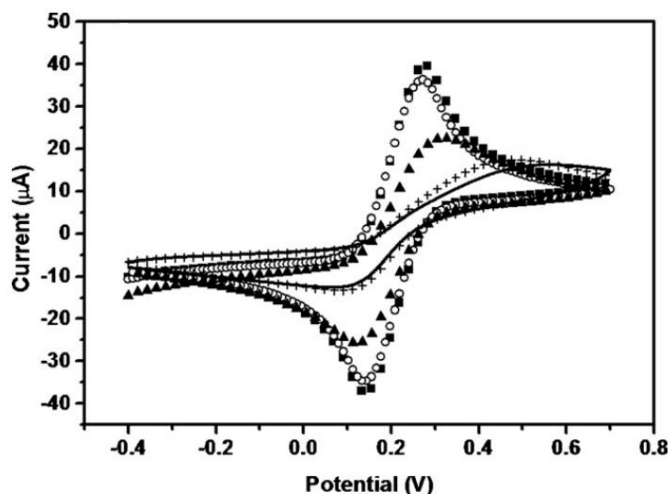
La superficie de oro limpia y pulida se sumergió en una disolución en etanol de  $6.0 \text{ mmol L}^{-1}$  de 11-MUA o de cisteamina  $6.0 \text{ mmol L}^{-1}$  por 1, 24, 48 y 72 h en experimentos independientes. Posteriormente se adsorbió una capa de estreptavidina sumergiendo el electrodo en una disolución de proteína  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$  en disolución amortiguadora de fosfatos durante 15 minutos [73]. Con su investigación controlaron el recubrimiento de superficies metálicas con el objetivo de aplicar estos dispositivos a posibles biosensores.

Por último, para determinar la capacidad de la proteína porcina S100A12 en el reconocimiento de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el 2011 Oliveira e investigadores partícipes desarrollaron un biosensor a través de la adsorción de la proteína sobre un electrodo de oro modificado con butiral de polivinilo (BPV) [74].

El electrodo de oro fue mecánicamente pulido con alúmina y ultrasonificado en agua destilada. Una disolución  $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de la proteína S100A12 fue mezclada con  $300 \text{ } \mu\text{L}$  de una disolución en etanol de BPV al 2% v/v a  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  bajo agitación durante 10 min. Después el electrodo se sumergió en dicha disolución durante 10 min y

secado al aire. Para comprobar si el proceso de fijación era reversible, se sumergió el sistema en una disolución de EDTA durante 20 minutos [74].

En la figura 54 se observan los voltamperogramas cíclicos correspondientes a los casos de diferentes electrodos (sin modificar, modificado con BPV, modificado con BPV y la proteína S100A12, modificado con BPV, proteína y iones calcio, y modificado con BPV, proteína, iones calcio y EDTA) en una disolución  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$   $10\text{ mmol L}^{-1}$  en disolución amortiguadora de fosfatos  $10\text{ mmol L}^{-1}$  a un valor de pH 7.4. Los autores mencionan que comparando la respuesta electroquímica del electrodo sin modificar y el electrodo con la proteína adsorbida en la monocapa de BPV existe una disminución en la corriente, sin embargo, la actividad redox del par  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  sigue presente, por lo que la adsorción de la proteína frente a la monocapa autoensamblada de BPV fue exitosa. Aunque mencionan que la respuesta electroquímica desaparece en presencia de iones  $Ca^{2+}$  pues sugiere fungir como una capa inerte que bloquea la transferencia electrónica del ferricianuro.



**Figura 54.** Voltamperogramas cíclicos sobre un electrodo de oro en disolución  $10\text{ mmol L}^{-1}$  de  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  en disolución amortiguadora de fosfatos  $10\text{ mmol L}^{-1}$ , a una velocidad de barrido de  $50\text{ mV s}^{-1}$ . Para el electrodo de Au sin modificar (■), Au-BPV (○), Au-BPV-S100A12 (▲), Au-BPV-S100-A12- $Ca^{2+}$  (—) y Au-BPV-S100A12- $Ca^{2+}$ -EDTA (x). Imagen tomada de [74].

Sus resultados confirman la capacidad de la proteína porcina S100A12 para adsorberse a la superficie metálica y sus estudios podrían servir como plataforma para el diseño de nuevos dispositivos como biosensores sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la simplicidad de su fabricación.

**Tabla 5. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de oro químicamente modificados con diversas proteínas.**

Año	Proteína	Reactivo previamente inmovilizado	Sistema electroquímico <sup>a</sup>	Referencia
2000	Metalotioneína	Directa	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: - Tiempo: 48 h <a href="#">[63]</a>
2002	Azurina	1-decanotiol	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: ECS	Temperatura: 22°C Tiempo: 40 h <a href="#">[64]</a>
2005	Concanavalina y tiroglobulina	Directa	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: - Tiempo: 1 h <a href="#">[65]</a>
2007	Proteína G	Directa	ET: Au EA: Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 1.5 h <a href="#">[66]</a>
2008	Avadina	SH-C <sub>15</sub> NHP	ET: Au EA: Plato de Pt ER: ECS	Temperatura: 20 °C Tiempo: ~2.5 h <a href="#">[69]</a>
2008	Ferritina	11-MUA	ET: Au EA: Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: - Tiempo: 12 h <a href="#">[70]</a>
2008	Ferritina	Directa	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 20 °C Tiempo: 19 h <a href="#">[71]</a>
2008	Ferritina	Succinimidilo	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4 °C Tiempo: 19 h <a href="#">[71]</a>
2011	Estreptavidina	11-MUA o cisteamina	ET: Au EA: Pt ER: ECS	Temperatura: 4 °C Tiempo: 1 h; 24 h; 48 h; 72 h. <a href="#">[73]</a>
2011	Proteína porcina S100A12	BPV	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 10 min <a href="#">[74]</a>

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica. Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos.



#### 4.2.2. Electrodo químicamente modificado con hemoglobina y mioglobina

En el 2010 la transferencia electrónica directa entre proteínas hemo (hemoglobina y mioglobina) y un electrodo fue estudiada en diferentes trabajos. Tres diferentes grupos de investigación inmovilizaron hemo proteínas sobre un electrodo de oro modificado con monocapas autoensambladas de distintos compuestos.

El grupo de Mai estudió el comportamiento electroquímico de la hemoglobina (Hb) adsorbiendo moléculas de Hb sobre un electrodo de oro modificado con monocapas autoensambladas de ácido 3-mercaptopropánico (AMP) [75]. Para ello el electrodo de oro se trató primero con una mezcla 3:1 v:v de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% v/v por 30 min. Después fue enjuagado con agua doblemente destilada y pulido con alúmina hasta obtener acabado espejo.

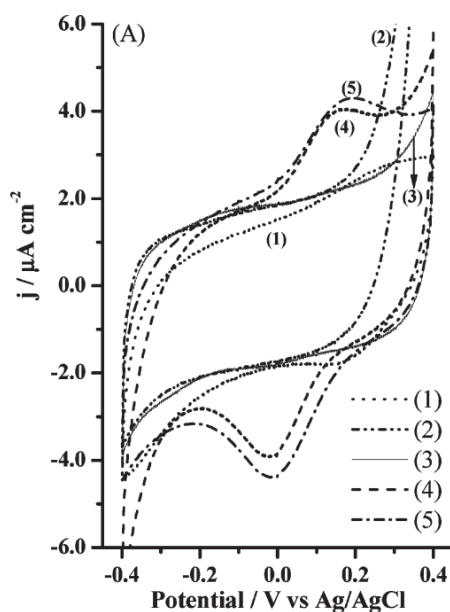
A continuación, el electrodo de oro pulido fue pretratado electroquímicamente en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  mediante barridos cíclicos de 0.2 V a 1.6 V durante 20 ciclos. Posteriormente el electrodo limpio se sumergió en una disolución de AMP 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  durante 30 minutos. El resultado fue enjuagado con etanol y agua doblemente destilada por 1 min para remover las trazas de moléculas de tiol que no se adsorbieron. Finalmente, el electrodo modificado fue incubado en una disolución de Hb 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  durante 20 h a 4 °C [75].

La adsorción de la proteína sobre la superficie de Au fue un proceso promovido por interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, además de que la transferencia electrónica directa fue inducida por las fuerzas electrostáticas entre los residuos amino de Hb y el AMP. Por lo tanto, a medida que el tiempo de interacción aumentó, mayor cantidad de Hb fue adsorbida y en consecuencia se obtuvo una mejor respuesta electroquímica. Razones por las cuales los autores reportan el tiempo prolongado de incubación para inmovilizar a la Hb (20 h), con ello se logró propiciar condiciones adecuadas para mantener a la Hb en un estado de adsorción favorable para la transferencia de electrones.

La mioglobina (Mb) fue inmovilizada sobre una monocapa autoensamblada de L-cisteína (Cys) sobre un electrodo de oro por Paulo y su equipo de trabajo en [76]. El electrodo de oro fue mecánicamente pulido con alúmina hasta un acabado espejo y sonificado en una disolución de (3 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por dos minutos, se enjuagó y se sonicó nuevamente. Se realizó un pretratamiento con el electrodo mediante ciclos continuos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 mol L<sup>-1</sup>. El electrodo limpio se sumergió en una disolución acuosa de L-cisteína 2.0 mmol L<sup>-1</sup> durante 12 h a 20 °C, se enjuagó con agua y se secó bajo flujo de Ar. Finalmente la inmovilización de la Mb se realizó mediante la inmersión del EQM en una disolución de Mb con una concentración de 0.1 μmol L<sup>-1</sup>, para experimentos independientes, en disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 mol L<sup>-1</sup> a 20 °C por 50 min, se enjuagó con agua y se almacenó en disolución de fosfatos 0.1 mol L<sup>-1</sup> con valor de pH 6.5 a 20 °C [76].

Los voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro sin modificar que contiene disoluciones de Mb y Cys se muestran en la figura 55 (curva 1 y 2 respectivamente), en la curva 3 se muestra la respuesta obtenida en disolución de fosfatos 0.1 mol L<sup>-1</sup> para el electrodo únicamente modificado con Cys (Au/Cys). Como puede observarse no se obtuvieron picos voltamperométricos para Cys inmovilizada o en disolución, además se demostró que sobre un electrodo de Au sin modificar en una disolución de Mb no es posible detectar la transferencia electrónica entre el biopolímero y el conductor.

Por otro lado, a un potencial de 0.086 V se observan picos de oxidación bien definidos correspondientes al carácter redox del grupo hemo de la Mb Fe(III)/Fe(II), para la curva 4, en donde el electrodo Au/Cys se puso en contacto con una disolución de Mb 10 μmol L<sup>-1</sup>, y para la curva 5 haciendo uso del EQM con la Mb inmovilizado en su superficie. Los autores concluyeron que gracias a la presencia de las monocapas autoensambladas de Cys sobre la superficie de oro es posible la adsorción de la Mb para su inmovilización y así lograr llevar a cabo la transferencia electrónica directa entre el biopolímero y el electrodo de Au.

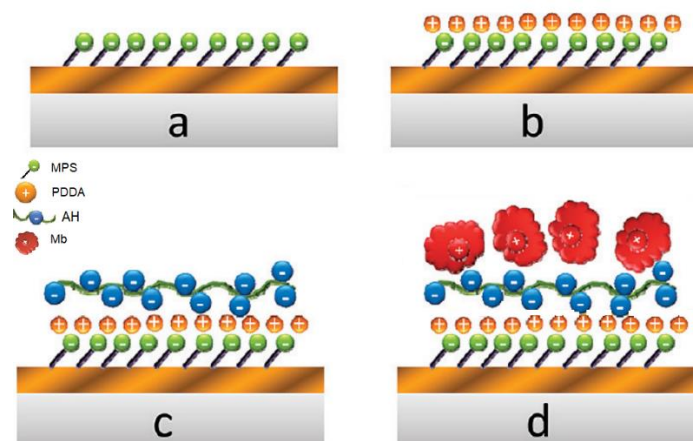


**Figura 55.** Voltamperogramas cíclicos sobre un electrodo de Au a una velocidad de barrido de  $0.10 \text{ V s}^{-1}$ . (1) Electrodo de Au sin modificar conteniendo  $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$  Mb, (2) Electrodo de Au sin modificar conteniendo  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$  Cys, (3) Electrodo Au/Cys conteniendo  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  disolución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , con valor de pH 6.5, (4) Electrodo Au/Cys conteniendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  Mb, y (5) electrodo Au/Cys con Mb previamente inmovilizada en disolución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  con valor de pH 6.5. Imagen tomada de [76].

Por último, Pinto y colaboradores inmovilizaron a la Mb en películas de ácido hialurónico (AH) sobre una superficie de Au [77], con la finalidad de estudiar la interacción entre las proteínas y otros compuestos, puesto que el AH ha sido ampliamente utilizado como receptor de proteínas [78], debido a sus interacciones con los biomateriales a través de sus películas cargadas.

El electrodo de oro fue primeramente limpiado con una mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  97% v/v y  $\text{H}_2\text{O}_2$   $7 \text{ mol L}^{-1}$  en proporción 3:1, después fue enjuagado y secado bajo  $\text{N}_2$  por 2 minutos. El electrodo limpio fue sumergido durante 24 h en una disolución  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  de 3-mercapto-1-propanosulfonato de sodio (MPS) disuelto en proporción 1:1 etanol y  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  para unir el grupo cabeza (tiol) a la superficie de Au y con el grupo cola (sulfonato) cargar negativamente la superficie de la monocapa (Figura 56 a). Posteriormente este electrodo fue sumergido en una disolución  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  de policloruro de dialildimetilamonio (PDDA) en disolución amortiguadora de acetato  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ , con valor de pH 5.0, durante 20 min y

cuidadosamente fue enjuagado y secado bajo  $N_2$ , con el propósito de cargar positivamente al EQM (Figura 56b). Finalmente, el electrodo fue sumergido alternadamente entre una disolución de AH  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de Mb (Figura 56 c y d), ambas preparadas en disolución amortiguadora de acetatos  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ , durante 20 minutos [77].



**Figura 56.** Representación esquemática de la construcción del EQM con Mb. (a) Electrodo de Au modificado con MPS cargado negativamente, (b) Electrodo Au-MPS modificado con PDDA cargado positivamente, (c) Electrodo Au-MPS-PDDA modificado con AH cargado negativamente y (d) Electrodo Au-MPS-PDDA-AH con Mb inmovilizada. Imagen tomada y modificada de [77].

Los investigadores de este trabajo concuerdan que el proceso de ensamblaje de la Mb sobre ácido hialurónico fue llevado con éxito y que dicha inmovilización se basó en las interacciones electrostáticas entre los residuos de aminoácidos situados en la superficie de la Mb y el anión derivado del AH.

**Tabla 6. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de oro químicamente modificados con mioglobina y hemoglobina.**

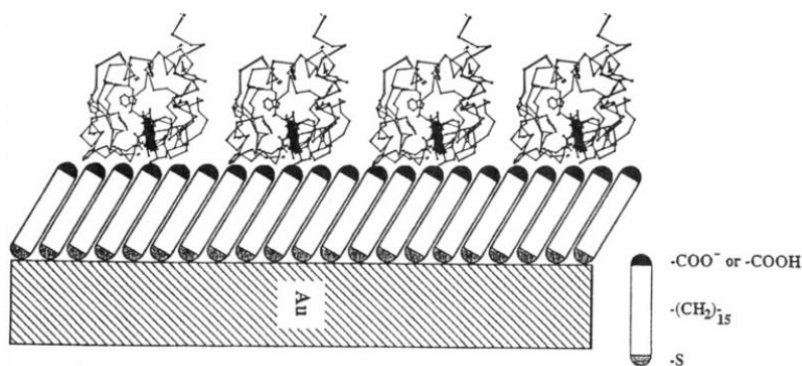
<b>Año</b>	<b>Proteína</b>	<b>Reactivo previamente inmovilizado</b>	<b>Sistema electroquímico<sup>a</sup></b>	<b>Referencia</b>
2010	Hemoglobina	AMP	ET: Au EA: Alambre Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 20.5 h <a href="#">[75]</a>
2010	Mioglobina	L-cisteína	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 20°C Tiempo: ~21 h <a href="#">[76]</a>
2010	Mioglobina	MPS, PDDA y AH	ET: Carbón vitreo EA: Lámina de Pt ER: ECS	Temperatura: - Tiempo: ~24.5 h <a href="#">[77]</a>

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica. Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos.

### 4.2.3. Electrodo químicamente modificado con citocromo c

En el año de 1993 se reportaron las interacciones entre el citocromo c (Cyt c) adsorbido en monocapas autoensambladas de alcanotiol sobre una superficie metálica por Song y colaboradores [79]. Su interés se centró en el estudio de los procesos biológicos de transferencia de electrones dentro de sistemas con monocapas autoensambladas. Por esta razón reportaron la electroquímica del Cyt c adsorbido a un electrodo de oro previamente modificado con ácido 16-mercaptohexadecanoico, en cuyo grupo cola se encuentra un ácido carboxílico.

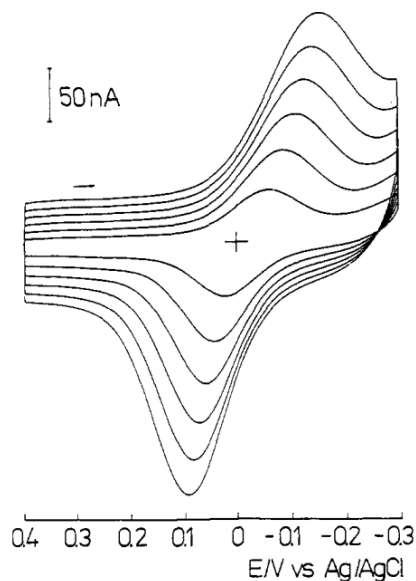
En la figura 57 se muestra una representación de la estructura del EQM realizado en este trabajo. Para ello el electrodo de oro previamente pulido y limpiado se sumergió en una disolución en etanol de ácido 16-mercaptohexadecanoico (16-MHDA)  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  durante 2 - 5 días. Posteriormente se almacenaron en viales limpios para el siguiente paso. Después, el Cyt c fue adsorbido a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  mediante la exposición del conductor a una disolución  $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de la proteína, la cual contenía  $4.4 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (pH con valor de 7.0), el electrodo resultante se nombró Cyt c/16-MHDA/Au [79].



**Figura 57.** Representación esquemática del citocromo c inmovilizado sobre una superficie de oro modificada con ácido 16-mercaptohexadecanoico (Cyt c/16-MHDA/Au). Imagen tomada de [79].

En la figura 58 se muestran los voltamperogramas cíclicos para el EQM donde se observan señales definidas para el grupo hemo del Cyt c. Los autores mencionan que persistió la forma de los picos de oxidación y reducción de forma imperturbable durante varias horas de experimentación, aunque no implicaban ciclos continuos.

La exitosa modificación del electrodo con la proteína apunta a las excelentes propiedades de las monocapas autoensambladas con terminaciones de ácido carboxílico para la inmovilización de proteínas catiónicas, pues sugieren que la interacción entre los residuos de lisina del Cyt c y los carboxilatos en el grupo cola del alcanotiol induce su adsorción efectiva, esto basado en la unión fisiológica del Cyt c a las superficies ricas en carboxilatos en reacciones proteicas [80].



**Figura 58.** Voltamperogramas cíclicos de citocromo c inmovilizado sobre un electrodo de oro modificado con ácido 16-mercaptohexadecanoico en disolución amortiguadora de  $K_3PO_4$   $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , con valor de pH 7.0, a velocidades de barrido de 10, 20, 30, 40, 50 y  $60 \text{ mV s}^{-1}$ . Imagen tomada de [79].

Cinco años después, el Cyt c fue adsorbido en un electrodo de oro modificado con N-acetilcisteína (NAC) para estudiar la transferencia de electrones entre el biopolímero y el conductor eléctrico en [81]. Para ello, un electrodo de Au fue pulido con alúmina hasta acabado espejo, fue ultrasonificado en agua por 5 min y se limpió electroquímicamente mediante ciclos de potencial en  $H_2SO_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Después se enjuagó con agua y se modificó con el tiol de la N-acetilcisteína mediante su inmersión durante 30 min en una disolución de NAC  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  en disolución amortiguadora de fosfatos  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ , con valor de pH 7. Terminado esto, se volvió a enjuagar el electrodo y una alícuota de 30 mL de una disolución de Cyt c  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$  en disolución de fosfatos  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  se colocó sobre la

superficie de Au por 15 min a 4°C. A continuación, se realizó otro lavado del electrodo con agua para su uso inmediato [81].

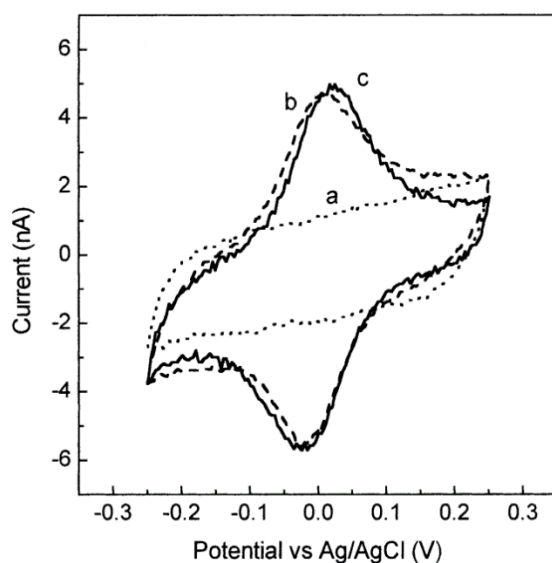
Las interacciones entre el Cyt c y los electrodos modificados con monocapas autoensambladas de cadena larga condujeron a la adsorción exitosa de la proteína, aunque mencionan los autores que el mecanismo de inmovilización es principalmente electrostático con una contribución menor de tipo interacción hidrofóbica, sin embargo, su trabajo logró estudiar la transferencia electrónica entre el centro hemo y el electrodo de Au.

En 2002 el Cyt c se inmovilizó por Ge y Lisdat en un electrodo de oro modificado con una mezcla de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) y mercaptoundecanol (MU) con la finalidad de construir un sensor sensible a radicales superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ) [82]. La inmovilización de la proteína se hizo a través de dos maneras diferentes. La primera mediante la adsorción del Cyt c sobre la monocapa autoensamblada de alcanotioles unida al conductor eléctrico, y la segunda mediante la unión covalente haciendo reaccionar el carboxilo del grupo cola presente en 11-MUA y la proteína, utilizando 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) como agente activante del grupo carboxilo para acoplarse a los residuos de lisina del Cyt c [82].

El electrodo de oro pulido y enjuagado se sometió a ciclos en  $H_2SO_4$  0.5 mol  $L^{-1}$  durante 20 - 50 ciclos a 200 mV  $s^{-1}$ . Para la adsorción de Cyt c, el electrodo de oro limpio se incubó en una mezcla de 11-MUA y MU ambos a 5 mmol  $L^{-1}$  en proporción 1:7 en etanol absoluto durante 1 día a temperatura ambiente, y a continuación en una disolución 30  $\mu$ mol  $L^{-1}$  de Cyt c en disolución de fosfatos 5 mmol  $L^{-1}$  con un valor de pH de 7.0 durante 2 h. La inmovilización covalente se realizó activando el electrodo modificado con MUA:MU sumergiéndolo en una disolución acuosa de 200 mmol  $L^{-1}$  EDC y 50 mmol  $L^{-1}$  N-hidroxisuccinimida (NHS, para incrementar la eficacia del acoplamiento) durante 5 minutos, posteriormente se transfirió a una disolución 30  $\mu$ mol  $L^{-1}$  Cyt c por 30 min. Después de cada procedimiento el EQM fue enjuagado con disolución amortiguadora de fosfatos [82].



La figura 59 muestra los voltamperogramas obtenidos para el EQM con 11-MUA:MU antes y después de la inmovilización del Cyt c por absorción y covalentemente, donde se observa una transformación redox cuasi-reversible de la proteína atribuida al grupo hemo presente en su estructura para ambos procedimientos. Mencionan Ge y Lisdat que el grupo carboxilo del 11-MUA es necesario para una correcta orientación del citocromo c y un favorable entorno del grupo hemo, pues la presencia de estos grupos propicia una superficie cargada negativamente que puede atraer electrostáticamente a los residuos de lisina cargados positivamente. Además, la presencia de MU sirvió para actuar como un espaciador de los grupos COOH y así, reducir la densidad de carga y proporcionar una monocapa estable de la proteína. Por último, la inmovilización del Cyt c se caracterizó satisfactoriamente en ambos tipos de electrodos, brindando un panorama amplio para la utilización del EQM en la fabricación de sensores.



**Figura 59.** Voltamperogramas cíclicos sobre un electrodo de oro modificado con ácido 11-mercaptoundecanoico y mercaptounodecanol (11-MUA:MU) en disolución de fosfatos 10 mmol L<sup>-1</sup>, con un valor de pH de 7.0, a una velocidad de barrido 50 mV s<sup>-1</sup>. Donde (a) antes de la inmovilización del Cyt c, (b) después de adsorción de Cyt c y (c) después de la inmovilización covalente de Cyt c. Imagen tomada de [82].

Un año después en conjunto con Kurusu se sintetizó al poli(óxido de etileno) heterobifuncional (PEO) con un grupo aldehído como sitio de unión con un grupo amina del Cyt c y un grupo tiol para unirse a la superficie del electrodo de oro [83].

El electrodo de oro se lavó sumergiéndolo en ácido nítrico concentrado durante 1 h. Después se sonicó en agua y se llevó a cabo la modificación de la superficie sumergiendo el electrodo limpio en una disolución 10 mmol L<sup>-1</sup> PEO en etanol durante 20 h. Posteriormente se enjuagó con etanol y agua, y el grupo terminal acetal de la superficie modificada se convirtió en un grupo aldehído por hidrólisis ácida sumergiéndolo en una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.01% v/v durante 15 min. Se permitió que los grupos amino del Cyt c reaccionaran con los grupos aldehídos del EQM en una disolución de fosfato 0.1 mol L<sup>-1</sup>, con valor de pH 7.5, por 4 h a temperatura ambiente [83].

Sus resultados mostraron que PEO contiene grupos tiol y aldehídos que fueron usados para unir la proteína en una superficie de oro, además funcionó como un buen promotor para la transferencia electrónica del Cyt c, convirtiendo a estos compuestos en materiales atractivos para diseñar superficies de sustratos biomédicos o biotecnológicos.

El iso-1-citocromo c (YCC) se considera un candidato ideal para aplicaciones bioelectrónicas, pues contiene un único residuo de cisteína que puede resultar útil para la fijación específica de la proteína asegurando una orientación única [84].

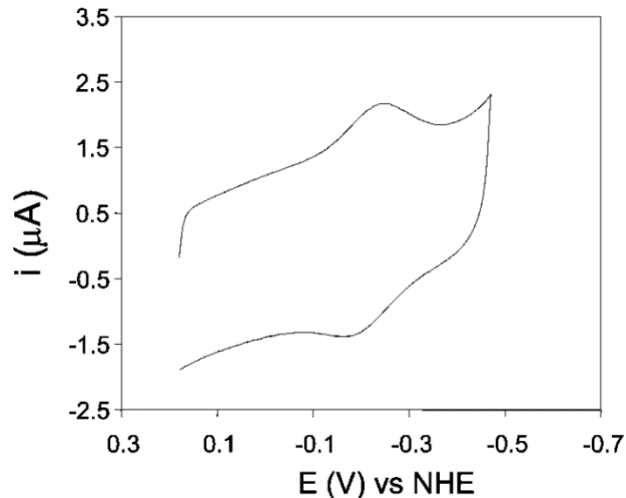
Por ello en el 2006, Bortolotti y colaboradores en conjunto estudiaron el comportamiento redox del YCC inmovilizado en un electrodo de oro a través del enlace Au-S formado por la cisteína presente en la estructura del biopolímero. Las monocapas de YCC fueron obtenidas mediante la incubación del electrodo de oro, previamente limpiado y pulido, en una disolución 0.1 mmol L<sup>-1</sup> de YCC en disolución amortiguadora de fosfatos 0.01 mol L<sup>-1</sup>, con valor de pH 8.2, por 24 h [85].

Bajo este procedimiento caracterizaron satisfactoriamente al YCC confirmando que la inmovilización de la proteína no se debía a interacciones electrostáticas, sino al enlace entre el Au y el S de la cisteína, mejorando entonces la transferencia electrónica entre el conductor y una monocapa de proteína orientada uniformemente.

La proteína Met80Ala (M80A), variante del iso-1-citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae*, fue inmovilizada en el 2008 por Casalini y su equipo de investigación, sobre un electrodo de oro gracias a la cisteína (Cys) presente dentro de su estructura a través del enlace Au–S(Cys), con el objetivo de reportar el comportamiento de esta variante en los procesos reductores de O<sub>2</sub> y el ion nitrito [86].

El electrodo de oro fue limpiado con agua y se sometió a 20 ciclos voltamperométricos entre 1.5 y -0.25 a 0.1 V en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Finalmente, el electrodo se enjuagó con agua y etanol anhidro. La inmovilización de la proteína al electrodo sigue la secuencia: (I) Se preparó una disolución de proteína 50 μmol L<sup>-1</sup> en disolución amortiguadora de fosfatos 10 mmol L<sup>-1</sup> a pH 7, (II) la proteína se redujo con un exceso en 5 veces de tris[2-carboxietil] fosfina (TCEP), (III) el electrodo limpio se sumergió en la disolución anterior de M80A 50 μmol L<sup>-1</sup> durante 48 h a 5 °C y (IV) el EQM se enjuagó con agua bidestilada [86].

En la figura 60 la respuesta electroquímica de la M80A unida a la superficie de Au muestra la reacción redox típica de un electrón de Fe<sup>2+</sup> en el grupo hemo del citocromo c, con un pico de oxidación en -0.205 V, por lo que los autores sugieren que la estrategia de inmovilización llevada a cabo en su investigación no afectó el comportamiento redox de la proteína. Lo cual indicó que la estructura de la M80A directamente unida a la superficie de oro se conserva en gran medida, esto reforzado a la idea de que la Cys de la M80A unida al Au induce una orientación perpendicular del grupo hemo hacia el electrodo, favoreciendo la transferencia electrónica sin llegar a la desnaturalización [85].



**Figura 60.** Voltamperograma cíclico para Met80Ala inmovilizada sobre un electrodo de oro en disolución amortiguadora de fosfatos  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , con un valor de pH de 7, a una velocidad de barrido de  $0.05 \text{ V s}^{-1}$ . Imagen tomada de [86].

En el trabajo realizado se concluyó que el EQM con M80A fue capaz de reducir electrocatalíticamente al  $\text{O}_2$  gracias a la inmovilización de la mutante sobre el conductor eléctrico, dicho dispositivo puede entonces ser usado en la fabricación de biosensores usados en el área de bioelectrocatalisis.

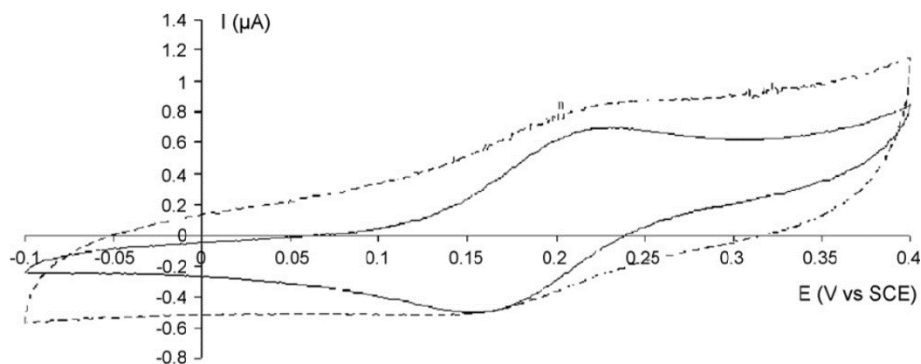
En el mismo año, el grupo de De Wael reportó la formación de una monocapa de Cyt c sobre un electrodo de oro previamente modificado con cisteamina [87], usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) como agente acoplante. Este compuesto, usado también en el trabajo de Ge al inicio de esta sección, reacciona con los ácidos carboxílicos presentes en la estructura de la proteína para formar un intermediario éster, el cual en presencia de aminas primarias, provenientes de la monocapa autoensamblada de cisteamina adsorbida sobre el electrodo, logra formar un nuevo enlace amida. De esta manera, los autores lograron unir covalentemente a la proteína Cyt c al electrodo modificado.

Después de ser limpiado con agua y secado con  $\text{N}_2$ , el electrodo de oro fue incubado en una disolución acuosa conteniendo  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de cisteamina (CYS) por 24 h a temperatura ambiente, lo cual permitió la adsorción de CYS sobre la superficie. El electrodo modificado fue enjuagado con agua, y posteriormente  $15 \text{ }\mu\text{L}$  de una

disolución de Cyt c ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$  y  $3.75 \text{ mmol L}^{-1}$  para experimentos independientes explicados a continuación) en disolución amortiguadora de ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES)  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , a pH 7, junto con  $5 \mu\text{L}$  de una disolución de EDC  $2.5 \text{ mol L}^{-1}$  fueron colocados sobre la superficie del electrodo durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, el conductor se enjuagó con HEPES para su uso [87].

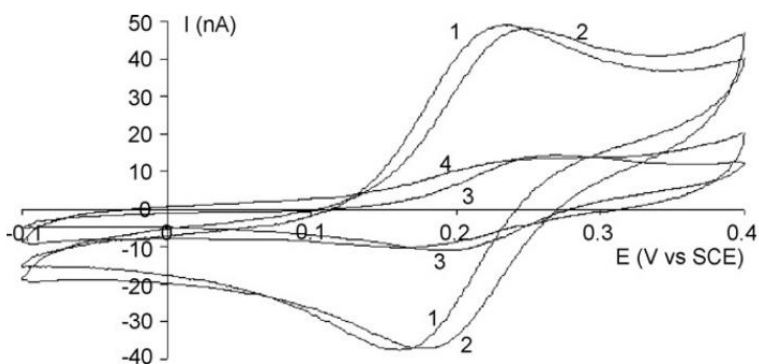
En un primer experimento, se investigó la influencia de CYS sobre la VPP, para ello dos electrodos fueron preparados: en el primero, se depositó Cyt c  $3.75 \text{ mmol L}^{-1}$  y EDC sobre el electrodo de oro en las cantidades y la duración descrita arriba. El segundo fue tratado con una disolución  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  CYS, de acuerdo con el procedimiento del párrafo anterior, y después el Cyt c y el EDC fueron depositados sobre el electrodo bajo el mismo procedimiento que el primer electrodo.

La figura 61 muestra los voltamperogramas cíclicos de la electroquímica del Cyt c inmovilizado sobre los electrodos de Au en ausencia y presencia de CYS. En los dos EQM fabricados se observa el comportamiento redox característico del grupo hemo del Cyt c. Es claro que la presencia de CYS, fungiendo como conector entre la película de proteína y el electrodo, causa una mayor definición en la curva del voltamperograma, caso contrario de su ausencia, donde no hay unión covalente entre el Cyt c y el electrodo, y la película del biopolímero está regida sólo por adsorción, aunque en ambos casos se distingue el par redox. Por ello, en el trabajo se afirma que la CYS facilita la transferencia electrónica entre el electrodo y la película de proteína, con ayuda de EDC para la formación de enlaces amida que unieron covalentemente al biomaterial con el conductor eléctrico.



**Figura 61.** Voltamperogramas cíclicos de la electroquímica del Cyt c inmovilizado sobre un electrodo de Au en ausencia y presencia de cisteamina en una disolución de HEPES 1 mmol L<sup>-1</sup> con un valor de pH de 7. Para el EQM sólo con Cyt c y EDC (línea punteada) y el EQM con Cyt c y EDC en presencia de cisteamina (línea continua). Imagen tomada de [87].

Por otro lado, la estabilidad de las películas de proteína se probó almacenando al aire durante varios días a electrodos modificados con Cyt c sobre monocapas autoensambladas de CYS (fabricados a una concentración de proteína 3 mmol L<sup>-1</sup>, bajo el procedimiento descrito). Fueron reservados a 20 °C o 4 °C, y pasados 2 y 7 días, tras devolver los electrodos a una disolución amortiguadora de HEPES, se registraron sus respectivos voltamogramas cíclicos (Figura 62)



**Figura 62.** Voltamperogramas cíclicos realizados en disolución de HEPES 1 mmol L<sup>-1</sup> con un valor de pH de 7, para conocer la estabilidad de la película de Cyt c inmovilizada sobre un electrodo de oro modificado con una monocapa autoensamblada de cisteamina en presencia de EDC. La curva 1 representa el voltamperograma cíclico obtenido inicialmente. Después de 7 días a 4 °C (curva 2), o de 2 y 7 días a 20 °C (curva 3 y 4 respectivamente). Imagen tomada de [87].

Después de 7 días de mantener al EQM a una temperatura de 4 °C el voltamperograma registrado (curva 2), muestra gran similitud a la curva realizada con el comportamiento inicial del EQM recién fabricado (curva 1), a excepción de un desplazamiento positivo en su corriente de pico, atribuido a una reorganización de la película de proteína o un cambio en la conformación del biopolímero.

En contraste, cuando los EQM se resguardaron a 20 °C por 2 y 7 días, se observa una enorme disminución en la corriente de pico (curva 3 y 4 respectivamente). En base a estos resultados, los EQM debieron mantenerse a 4 °C para retener la película de Cyt c inmovilizada. El trabajo de estos científicos presentó entonces una metodología de inmovilización de proteínas que conduce al estudio exitoso del Cyt c a través de VPP.

**Tabla 7. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de oro químicamente modificados con citocromo c**

Año	Proteína	Reactivo previamente inmovilizado	Sistema electroquímico <sup>a</sup>	Referencia
1993	Citocromo c	16-MHDA	ET: Au EA: Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: ~2 - 5 días <a href="#">[79]</a>
1998	Citocromo c	NAC	ET: Au EA: Hoja de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 45 min <a href="#">[81]</a>
2002	Citocromo c	11-MUA y MU	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 20°C Tiempo: 26 h; 24.5 h <a href="#">[82]</a>
2003	Citocromo c	PEO	ET: Au EA: Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 20°C Tiempo: ~24.5 h <a href="#">[83]</a>
2006	Iso-1-citocromo c	Directa	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: ECS	Temperatura: 20°C Tiempo: 24 h <a href="#">[85]</a>
2008	MET80Ala	Directa	ET: Au EA: Hoja de Pt ER: ECS	Temperatura: 5°C Tiempo: 48 h <a href="#">[86]</a>
2008	Citocromo c	Cisteamina	ET: Au EA: Pt ER: ECS	Temperatura: 20 °C Tiempo: 26 h <a href="#">[87]</a>

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica. Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos.

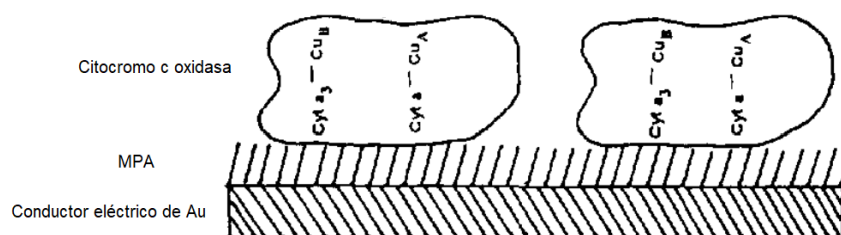


#### 4.2.4. Electrodoos químicamente modificados con enzimas

La transferencia electrónica directa de una monocapa de citocromo c oxidada sobre un electrodo de oro modificado con monocapas autoensambladas de ácido 3-mercaptopropiónico (AMP) fue estudiada por Li y su grupo de trabajo en 1996 [88].

El electrodo de oro fue pulido con alúmina hasta conseguir un acabado espejo, a continuación, se enjuagó con agua destilada y se sonicó en agua y etanol absoluto durante 5 minutos en cada disolvente. Se sumergió el electrodo de oro limpio en una disolución acuosa de AMP  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  por 2 h a temperatura ambiente. El electrodo modificado con AMP se enjuagó a fondo con agua para eliminar el exceso de compuestos adsorbidos y se incubó en una disolución de citocromo c oxidasa (en concentraciones desde  $5$  a  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  en experimentos independientes) en presencia de EDC a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  [88].

Como se ha visto a lo largo de esta sección el grupo tiol (-SH) es lo suficientemente activo para unirse en una superficie de oro y formar una monocapa organizada sobre ella. Por ello, la enzima citocromo c oxidasa, cuyos residuos de amina fueron activados por el EDC, se unió covalentemente a esta monocapa autoensamblada de AMP en el electrodo. La figura 63 representa una estructura hipotética presentada por el autor para el sistema ordenado del EQM.



**Figura 63.** Representación idealizada de citocromo c oxidasa inmovilizada sobre un electrodo de oro modificado con monocapas autoensambladas de ácido 3-mercaptopropiónico. Imagen tomada y modificada de [88].

Los investigadores concluyeron que esta inmovilización, basada en monocapas autoensambladas de AMP, ayudó a la enzima a obtener una orientación favorecida que permitió mantener su actividad biológica y facilitó el intercambio de electrones con la superficie de electrodo. Por lo tanto, su modelo proporcionó un modelo mimético para estudiar y elucidar las funciones fisiológicas de estos sustratos.

En el año 2006 Cecchet y varios coautores utilizaron VC para estudiar el mecanismo de transferencia de electrones de la glucosa oxidasa (GOx) adsorbida en monocapas autoensambladas densamente empaquetadas y ordenadas de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) sobre oro [89].

Las monocapas autoensambladas de MUA se prepararon mediante la inmersión del electrodo de oro limpio en una disolución en cloroformo de 11-MUA  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  durante 21 h. Posteriormente, se enjuagó con cloroformo y se secó bajo Ar. Para la adsorción de la enzima, la GOx se diluyó en una disolución amortiguadora de fosfatos con valor de pH 7, hasta una concentración  $0.082 \text{ mg mL}^{-1}$ . El EQM con 11-MUA se sumergió en la disolución anterior durante 24 h y luego fue enjuagado y sonificado en disolución amortiguadora de fosfatos antes de su uso [89]. Los autores reportan que bajo el procedimiento usado para la inmovilización de GOx, se pudo llevar a cabo su caracterización mediante VC, aunque mencionan que en su investigación no fue clara la razón por la que la proteína fue adsorbida fuertemente a la superficie de 11-MUA en ausencia de agentes activantes de los grupos cola del alcanotioles.

Un año después Liu junto con otros investigadores fabricaron una capa autoensamblada de concanavalina A (Con A) sobre una superficie de oro para estudiar las interacciones entre las glicoproteínas y la Con A, utilizando peroxidasa de rábano picante como glicoproteína modelo [90].

Para ello, la Con A se unió covalentemente al 11-MUA previamente depositado a la superficie del electrodo de oro, utilizando 2-(5-Norborene-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TNTU) como agente activante del ácido

carboxílico en la cola del alcanotiol, y luego, gracias a la afinidad de la peroxidasa con Con A, esta se adsorbió sobre el EQM.

Se prepararon 2 disoluciones. Para la disolución número 1, 2.9 mg de TNTU fueron disueltos en una mezcla de 1  $\mu\text{L}$  de *N*-metilmorfolina (NMM) y 100  $\mu\text{L}$  de *N,N*-dimetilformamida (DMF). Para la disolución número 2, se disolvieron 2 mg de Con A en 1 mL de disolución amortiguadora de fosfatos  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , con valor de pH de 6.8. Antes de usar la disolución 2, fue diluida 10 veces con la disolución amortiguadora de fosfatos.

Para la limpieza del electrodo, este fue sumergido en una mezcla 3:1 de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% v/v durante 30 min. Después de enjuagar el electrodo con suficiente agua, se sumergió en una disolución de 11-MUA  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  durante 12 h a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  para obtener el electrodo modificado con alcanotiol. Luego se enjuagó con etanol y DMF, y se incubó en la disolución 1 durante 30 min para activar los grupos carboxílicos de la monocapa de 11-MUA. Tras enjuagar a fondo con DMF, el electrodo activado con TNTU se sumergió en la disolución 2 durante 2 h, este procedimiento permitió unir covalentemente a las moléculas de Con A con la superficie de Au. Por último, el electrodo modificado con Con A se enjuagó en una disolución amortiguadora de fosfatos y se incubó en una disolución de peroxidasa  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  por 3 h. El EQM se almacenó en disolución amortiguadora de fosfatos [90]. La unión de la enzima resultó deseable para la fabricación de biosensores, el reconocimiento, separación y purificación de glicoproteínas, así como en sistemas de liberación de fármacos.

Posteriormente, el equipo de Yang en el 2009 inmovilizó la enzima CYP2C9 sobre una superficie de oro modificada con dos diferentes alcanotioles [91]. El electrodo limpio y pulido se sumergió en una mezcla etanólica de 8-octanotiol  $75 \text{ mmol L}^{-1}$  y 11-MUA  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  durante 18 h para permitir que la monocapa autoensamblada se adsorbiera a la superficie de oro. Se enjuagó con etanol absoluto y a continuación, el conductor fue incubado en una disolución amortiguadora de fosfatos que contenía  $2.0 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDC y  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de

*N*-hidroxisuccinimida (NHS) durante 2 h. Finalmente, se sumergió en una disolución de CYP2C9 50 nmol L<sup>-1</sup> durante 24 h. Todos los procesos se realizaron a temperatura ambiente. Los autores observaron la electroquímica del sustrato exitosamente, proporcionando una plataforma para el diseño de sensores [91].

Por último, la transferencia electrónica directa de ascorbato oxidasa (ASOM) confinada en un electrodo de oro modificado con L-cisteína fue estudiada en el 2014 mediante voltamperometría cíclica por Patil y demás colaboradores [92]. El electrodo limpio y pulido de Au se sumergió en una disolución acuosa de L-cisteína 1 mmol L<sup>-1</sup> durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, el electrodo modificado se enjuagó con agua y se depositaron en su superficie 4 µL de una disolución de ASOM 50 µmol L<sup>-1</sup> y se mantuvo en un frasco sellado a 4 °C durante 16 h. A continuación, se retiró del frasco, se secó a temperatura ambiente y se enjuagó con disolución amortiguadora de fosfatos 5 mmol L<sup>-1</sup> con valor de pH de 7.0. Reportaron los autores del artículo que el EQM ofreció resultados reproducibles durante 2 semanas [92].

Junto con equipo de trabajo Patil concluyó que la ASOM se adsorbió exitosamente a la monocapa autoensamblada de L-cisteína sobre el electrodo de Au, a través de interacciones electrostáticas [92]. De esta manera lograron estudiar la electroquímica de esta proteína, campo de investigación de gran importancia para la fabricación de dispositivos bioelectroquímicos basados en enzimas.

**Tabla 8. Resumen de las metodologías recolectadas para electrodos de oro químicamente modificados con enzimas.**

<b>Año</b>	<b>Proteína</b>	<b>Reactivo previamente inmovilizado</b>	<b>Sistema electroquímico<sup>a</sup></b>	<b>Referencia</b>
1996	Citocromo c oxidasa	AMP	ET: Au EA: Lámina de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: - <a href="#">[88]</a>
2006	Glucosa oxidasa	11-MUA	ET: Au EA: Espiral de Pt ER: ECS	Temperatura: - Tiempo: 45 h <a href="#">[89]</a>
2007	Peroxidasa	Con A	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 4°C Tiempo: 17.5 h <a href="#">[90]</a>
2009	CYP2C9	8-octanotiol o 11-MUA	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 20°C Tiempo: 44 h <a href="#">[91]</a>
2014	Ascorbato oxidasa	L-cisteína	ET: Au EA: Alambre de Pt ER: Ag <sup>+</sup>  AgCl	Temperatura: 20 °C Tiempo: 17 h <a href="#">[92]</a>

<sup>a</sup>: Sistema electroquímico usado para el estudio del EQM en voltamperometría cíclica. Nota: El tiempo reportado corresponde al tiempo completo de elaboración para cada EQM. Los datos de temperatura corresponden a la condición de almacenamiento del electrodo para inmovilizar la proteína a su superficie. Aquellos datos no especificados fueron datos no reportados en los artículos.

## 5. CONCLUSIONES

### Conclusiones generales

Después de llevar a cabo la revisión bibliográfica a partir del año 1900 a la actualidad se recabaron un total de 97 de artículos, de los cuales únicamente 15 trabajos fueron seleccionados para conductores de carbón vítreo y 24 trabajos para conductores de oro. Estos resultados reflejan que el uso de electrodos químicamente modificados con proteínas es un campo abierto, pues las proteínas que se encontraron para su elaboración: hidrofobina, seroalbúmina y proteína de choque térmico HSP70 para el caso de carbón vítreo; metalotioneína, azurina, concanavalina A, proteína G, avadina, ferritina, estreptavidina, proteína porcina S100A12 y citocromo C para conductores de oro; mioglobina y hemoglobina para ambos materiales; y enzimas como lacasa, glucosa oxidasa, citocromo c oxidasa, CYP2C9, ascorbato oxidasa y peroxidasa, es un número reducido en comparación con el número de proteínas existentes. Entonces, se vuelve evidente que la voltamperometría de película de proteína es un campo fértil de investigación para próximos análisis.

La simplicidad en la metodología utilizada bajo este fenómeno de superficie para funcionalizar electrodos mostró resultados satisfactorios en una gran diversidad de proteínas para ambos materiales. Además, con el uso de voltamperometría cíclica, los EQM brindaron una visión de los procesos de óxido-reducción que las proteínas llevan a cabo naturalmente, y proporcionaron la base para la fabricación de múltiples dispositivos como biosensores, reactores enzimáticos, o dispositivos biomédicos que tratan de homologar los mecanismos de transferencia electrónica de estos biopolímeros.

Finalmente, se presentó este estado del arte como una fuente de consulta para investigadores interesados en esta área, además de pretender ser una referencia útil para estudiantes del laboratorio 308 del Departamento de Fisicoquímica de esta institución que deseen realizar proyectos de investigación en donde sea necesario modificar conductores eléctricos con proteínas.

## **Conclusiones particulares**

La versatilidad de la VPP quedó al descubierto con los resultados obtenidos para cada material. Proteínas como seroalbúmina, hidrofobina, incluso lacasa fueron inmovilizadas directamente a las superficies de carbón vítreo, como resultado de la suma de interacciones electrostáticas, iónicas, hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals presentes entre la superficie del conductor eléctrico y el biopolímero. Gracias a ello, las proteínas quedaron adsorbidas eficazmente sobre el electrodo.

También se esclareció el papel de diferentes tipos de monocapas autoensambladas dentro de este material. Monocapas autoensambladas de tensoactivos, tanto iónicos como neutros, fueron utilizadas con éxito para inmovilizar proteínas como la hemoglobina, la mioglobina o de choque térmico. Este tipo de sustratos son utilizados gracias a su estructura, cuyas propiedades hidrófobas e hidrofílicas pueden ser usadas para adsorber a los biopolímeros sobre su monocapa. Se demostró que la transferencia directa de electrones de las proteínas mejoraba en presencia de tensoactivos, es decir, las monocapas autoensambladas de estos compuestos proporcionaron una vía de canalización de los electrones entre proteínas y electrodos.

Para el caso del electrodo de oro, se obtuvo una mayor cantidad de trabajos al compararlo con el electrodo de carbón vítreo, esto debido a que la unión covalente de la proteína a este metal a través del enlace Au-S fue usada recurrentemente en una gran diversidad de formas. Proteínas como metalotioneínas, concanavalina A, tiroglobulina, proteína G, iso-1-citocromo c y su variación Met80Ala fueron inmovilizadas directamente sobre la superficie metálica, pues su estructura rica en residuos de cisteína permitió su unión directa al conductor eléctrico.

Por otro lado, monocapas autoensambladas de alcanotioles fueron también usadas debido a su simplicidad y flexibilidad, pues la versatilidad en sus grupos terminales ofreció una amplia gama de opciones para la inmovilización de proteínas. Además, su estructura ordenada y ensamblada por efecto hidrofóbico y fuerzas de van der Waals generan un entorno atractivo para el anclaje de las proteínas. Los resultados

del comportamiento electroquímico de proteínas como citocromo c, azurina, ferritina, estreptavidina mostraron que la presencia de alcanotioles en el EQM mejoró el intercambio electrónico con el conductor eléctrico. Finalmente, con o sin el uso de alcanotiones, la diversificación de la unión Au-S ofrece la posibilidad de obtener una inmovilización orientada de la biomolécula en comparación con el carbón vítreo.



## 6. REFERENCIAS

1. Galeano, M., Velez, L. (2002). *Estado del arte sobre fuentes documentales en investigación cualitativa*. Medellín: Centro de Investigaciones Sociales y Humanas.
2. Gómez, V. M., Galeano, H. C., Jaramillo M. A. (2015). El estado del arte: una metodología de investigación. *Revista Colombiana de Ciencias Sociales*, 6(2), 423-442.
3. Molina, N. P. (2005). ¿Qué es el estado del arte? *Ciencia y Tecnología para la salud Visual y Ocular*, 3(5), 73-75.
4. Garcés, M. Á., Patiño G. D., Torres R. J. (2008). *Juventud, investigación y saberes. Estado del arte de las investigaciones sobre la realidad juvenil en Medellín 2004- 2006*. Medellín: Universidad de Medellín.
5. Bojacá A. E. (2004). *XYZ investigación pedagógica. Estado del Arte*. Bogotá: Universidad Santo Tomás de Aquino.
6. Bard, A. J., Faulkner, L. R., Swain, E., Robey, C. (2001). *Electrochemical methods: fundamentals and applications* (2nd ed.). Hoboken: John Willey & Sons.
7. Compton, R. G., Banks, C. E. (2007). *Understanding Voltammetry* (3rd ed.). London: Word Scientific.
8. Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206.
9. Soto, F. (2018). *Estudio electroquímico para la determinación de la concentración micelar crítica del bromuro de cetilmetilamonio, dodecilsulfato sódico, tween 80, pluronic F127 y tritón X-100*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
10. Zoski, C. G. (2007). *Handbook of Electrochemistry*. Amsterdam: Elsevier.
11. Tomiyasu, H., Shikata, H., Takao, K., Asanuma, N., Taruta, S., Park, Y. Y. (2017). An aqueous electrolyte of the widest potential window and its superior capability for capacitors. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.

12. Wang, Y., Meng, X., Sun, J., Liu, Y., Hou, L. (2020). Recent progress in “water-in-salt” electrolytes toward non-lithium based rechargeable batteries. *Frontiers in Chemistry*, 8, 595.
13. ALS Co., Ltd. (2022). *Working electrodes line up*. ALS Co. Ltd Electrochemistry & Spectroelectrochemistry.  
Recuperado de: <https://www.als-japan.com/1359.html>
14. Sawyer, D., Sobkowiak, A., Roberts Jr., J. (1995). *Electrochemistry for chemist* (2nd ed.). Canadá: John Willey & Sons.
15. Skoog, D. A. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6ta ed.). Ciudad de México: Cengage Learning.
16. ALS Co., Ltd. (2022). *Counter electrode line up*. ALS Co. Ltd Electrochemistry & Spectroelectrochemistry.  
Recuperado: <https://www.als-japan.com/1340.html>
17. Baes, C., Ortuño, D., Armendariz, J. (2009). *Biología Molecular: fundamentos y aplicaciones* (3a ed.). Ciudad de México: McGraw Hill.
18. McMurry, J. (2008). *Química Orgánica* (7ma ed.). Ciudad de México: Cengage Learning.
19. Whitford, D. (2005). *Proteins: Structure and function*. Hoboken: John Willey & Sons.
20. Lehninger, D., Cox, M. (2018). *Principios de Bioquímica* (7ma ed). Ciudad de México: Ediciones Omega.
21. Wade, L. G. J. (2012). *Química Orgánica* (7ma ed). Ciudad de México: Pearson.
22. Murray, R. W. (1980). Chemically modified electrodes. *Accounts of Chemical Research*, 13(5), 135–141.
23. Zen, J. M., Kumar, A. S., Tsai, D. M. (2003). Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 15(13), 1073–1087.
24. Dong, S., Peng, Z. (2005). SENSORS | Chemically Modified Electrodes. En Worsfold, P., Townshens, A., Poole, C. (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science* (2ed., pp 245-254). Amsterdam: Elsevier.

25. Murray, R. W., Ewing, A. G., Durst, R. A. (1987). Chemically modified electrodes. Molecular design for electroanalysis. *Analytical Chemistry*, 59(5), 379A–390A.
26. Wang, S., Du, D., Zou, Q.-C. (2019). Electrochemical behavior of epinephrine at L-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode. *Talanta* 57(4), 687-692.
27. Salinas, G. (2018). *Electrodos modificados con polímeros conductores de la familia de los 3, 4-alcoxitiófenos para su aplicación como sensores de iones metálicos por medio de voltamperometría de redisolución anódica*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México.
28. Arrigan, D. W. (1994). Voltammetric determination of trace metals and organics after accumulation at modified electrodes. *Analyst*, 119(9), 1953-1966.
29. Shaidarova, L. G., Budnikov, G. K. (2008). Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 63(10), 922–942.
30. Armstrong, F. A., Heering, H. A., Hirst, J. (1997). Reaction of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry. *Chemical Society Reviews*, 26(3), 169-179.
31. Armstrong, F. A. (1997). Applications of voltammetric methods for probing the chemistry of redox proteins. En Lenaz, G. y Milazzo, G. (Eds.), *Bioelectrochemistry of Biomacromolecules. Bioelectrochemistry: Principles and Practice* (vol. 5, pp. 205-255). Bolonia, Italia: Birkhäuser Basel.
32. Armstrong, F. A. (2002). Insights from protein film voltammetry into mechanisms of complex biological electron-transfer reactions. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (5), 661-671.
33. Fritz, P. A., Bera, B., Van Den Berg, J., Visser, I., Kleijn, J. M., Boom, R. M., Schroën, C. G. P. H. (2021). Electrode surface potential-driven protein adsorption and desorption through modulation of electrostatic, van der Waals, and hydration interactions. *Langmuir*, 37(21), 6549–6555.

34. Moulton, S. E., Barisci, J. N., Bath, A., Stella, R., Wallace, G. G. (2003). Investigation of protein adsorption and electrochemical behavior at a gold electrode. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261(2), 312–319.
35. Armstrong, F. A. (2002). Voltammetry of proteins. En Bard, A. J, Stratmann, M., y Wilson, G. S. (Eds.), *Encyclopedia of electrochemistry* (Vol. 9, pp. 11-13). Weinheim: Wiley, VCH.
36. Kocak, I., Ghanem, M. A., Al-Mayouf, A., Alhoshan, M., Bartlett, P. N. (2013). A study of the modification of glassy carbon and edge and basal plane highly oriented pyrolytic graphite electrodes modified with anthraquinone using diazonium coupling and solid phase synthesis and their use for oxygen reduction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 706, 25–32.
37. Jeuken, L. J. C. (2017). *Biophotoelectrochemistry: from bioelectrochemistry to biophotovoltaics* (Vol. 158). Manhattan: Springer Nature.
38. Zhang, H. N., Guo, Z. Y., Gai, P. P. (2009). Research progress in protein film voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 37(3), 461–465.
39. Guo, B., Anzai, J. I., Osa, T. (1996). Adsorption behavior of serum albumin on electrode surfaces and the effects of electrode potential. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44(4), 800-803.
40. Bilewicz, R., Witomski, J., van der Heyden, A., Tagu, D., Palin, B., Rogalska, E. (2001). Modification of electrodes with self-assembled hydrophobin layers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(40), 9772–9777.
41. Bi, Y. H., Huang, Z. L., Zhao, Y. D. (2005). Interactions of Cytochrome c with DNA at glassy carbon surface. *Biophysical Chemistry*, 116(3), 193-198.
42. Zhao, Y. Di, Pang, D. W., Wang, Z. L., Cheng, J. K., Qi, Y. P. (1997). DNA-modified electrodes. Part 2. Electrochemical characterization of gold electrodes modified with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 431(2), 203–209.
43. Heli, H., Sattarahmady, N., Jabbari, A., Moosavi-Movahedi, A. A., Hakimelahi, G. H., Tsai, F. Y. (2007). Adsorption of human serum albumin onto glassy carbon surface - Applied to albumin-modified electrode: Mode of protein-ligand interactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 610(1), 67–74.

44. Demirbakan, B., Sezgintürk, M. K. (2016). A novel immunosensor based on fullerene C60 for electrochemical analysis of heat shock protein 70. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 783, 201–207.
45. Hoeger, U., Harris, J. R. (2020). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins*. Zug: Springer Nature.
46. He, X., Zhu, L. (2006). Direct electrochemistry of hemoglobin in cetylpyridinium bromide film: Redox thermodynamics and electrocatalysis to nitric oxide. *Electrochemistry Communications*, 8(4), 615–620.
47. Wang, F., Chen, X., Xu, Y., Hu, S., Gao, Z. (2007). Enhanced electron transfer for hemoglobin entrapped in a cationic gemini surfactant films on electrode and the fabrication of nitric oxide biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(2), 176–182.
48. Mai, Z., Zhao, X., Dai, Z., Zou, X. (2010). Contributions of components in guanidine hydrochloride to hemoglobin unfolding investigated by protein film electrochemistry. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(20), 7090–7097.
49. Lv, X., Gao, G., Liu, F. (2012). Electrochemical behavior of hemoglobin in neutral surfactants with different poly(ethylene oxide) unit lengths adsorbed on an electrode. *Science China Chemistry*, 55(1), 151–157.
50. Wu, H., Fan, S., Zhu, W., Dai, Z., Zou, X. (2013). Investigation of electrocatalytic pathway for hemoglobin toward nitric oxide by electrochemical approach based on protein controllable unfolding and in-situ reaction. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 589–594.
51. Lu, Q., Hu, C., Cui, R., Hu, S. (2007). Direct electron transfer of hemoglobin founded on electron tunneling of CTAB monolayer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(33), 9808–9813.
52. Ordway, G. A., Garry, D. J. (2004). Commentary Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *Journal of Experimental Biology*, 207(20), 3441–3446.
53. Chattopadhyay, K., Mazumdar, S. (2001). Direct electrochemistry of heme proteins: effect of electrode surface modification by neutral surfactants. *Bioelectrochemistry*, 53(1), 17–24.

54. Xu, Q., Shen, Y., Tang, J., Xue, M. H., Jiang, L., Hu, X. (2015). Electrochemical method assisted immobilization and orientation of myoglobin into biomimetic brij film and its direct electrochemistry study. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(21), 11286–11293.
55. Naraian, R., Gautam, R. L. (2018). *Penicillium* enzymes for the saccharification of lignocellulosic feedstocks. En Gupta, V. (Ed.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 121-136). Amsterdam: Elsevier.
56. Oliva-Taravilla, A., Tomás-Pejó, E., Demuez, M., González-Fernández, C. (2016). Optimization of the laccase detoxification step in hybrid hydrolysis and fermentation processes from wheat straw by *K. marxianus* CECT 10875. *Bioethanol* (2)126–133.
57. Ferreyra, N., Coche-Guérente, L., Labbé, P. (2004). Construction of layer-by-layer self-assemblies of glucose oxidase and cationic polyelectrolyte onto glassy carbon electrodes and electrochemical study of the redox-mediated enzymatic activity. *Electrochimica Acta*, 49(3), 477–484.
58. Corvis, Y., Walcarius, A., Rink, R., Mrabet, N. T., Rogalska, E. (2005). Preparing catalytic surfaces for sensing applications by immobilizing enzymes via hydrophobin layers. *Analytical Chemistry*, 77(6), 1622-1630.
59. Liu, X., Gillespie, M., Ozel, A. D., Dikici, E., Daunert, S., Bachas, L. G. (2011). Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), 361–366.
60. Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21–45.
61. Fowle, D. A., Stillman, M. J. (1997). Comparison of the structures of the metal-thiolate binding site in Zn (II)-, Cd (II)-, and Hg (II)-metallothioneins using molecular modeling techniques. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 14(4), 393-406.

62. Stillman, M. J. (1995). Metallothioneins. *Coordination Chemistry Reviews*, 144, 461-511.
63. Ju, H., Leech, D. (2000). Electrochemical study of a metallothionein modified gold disk electrode and its action on Hg<sup>2+</sup> cations. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 484(2), 150-156.
64. Jeuken, L. J., Wisson, L. J., Armstrong, F. A. (2002). The kinetics of a weakly electron-coupled proton transfer in azurin. *Inorganica Chimica Acta*, 331(1), 216-223.
65. Schön, P., Degefa, T. H., Asaftei, S., Meyer, W., Walder, L. (2005). Charge propagation in "ion channel sensors" based on protein-modified electrodes and redox marker ions. *Journal of the American Chemical Society*, 127(32), 11486-11496.
66. Fowler, J. M., Stuart, M. C., Wong, D. K. (2007). Self-assembled layer of thiolated protein G as an immunosensor scaffold. *Analytical Chemistry*, 79(1), 350-354.
67. Akerström, B., Brodin, T. H., Reis, K., Björck, L. (1985). Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of Immunology*, 135(4), 2589-2592.
68. Green, N. M. (1975). Avidin. *Advances in Protein Chemistry*, 29, 85-133.
69. Tlili, C., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Mahy, J. P., Lecomte, S., Chehimi, M. M., Korri-Youssoufi, H. (2008). A new method of immobilization of proteins on activated ester terminated alkanethiol monolayers towards the label free impedancemetric detection. *Materials Science and Engineering: C*, 28(5-6), 861-868.
70. Choi, J. W., Kim, Y. J., Kim, S. U., Min, J., Oh, B. K. (2008). The fabrication of functional biosurface composed of iron storage protein, ferritin. *Ultramicroscopy*, 108(10), 1356-1359.
71. Won, K., Park, M. J., Yoon, H. H., Kim, J. H. (2008). Immobilization of iron storage protein on a gold electrode based on self-assembled monolayers. *Ultramicroscopy*, 108(10), 1342-1347.

72. Marken, F., Patel, D., Madden, C. E., Millward, R. C., Fletcher, S. (2002). The direct electrochemistry of ferritin compared with the direct electrochemistry of nanoparticulate hydrous ferric oxide. *New Journal of Chemistry*, 26(2), 259-263.
73. Marques de Oliveira, R., Ferreira, J., Santos, M. J., Faria, R. M., Oliveira Jr, O. N. (2011). Probing the Functionalization of Gold Surfaces and Protein Adsorption by PM-IRRAS. *ChemPhysChem*, 12(9), 1736-1740.
74. Oliveira, M. D., de Melo, C. P., Oliva, G., Andrade, C. A. (2011). Development of impedimetric and optical calcium biosensor by using modified gold electrode with porcine S100A12 protein. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 365-370.
75. Mai, Z., Zhao, X., Dai, Z., Zou, X. (2010). Direct electrochemistry of hemoglobin adsorbed on self-assembled monolayers with different head groups or chain length. *Talanta*, 81(1-2), 167-175.
76. Paulo, T. D. F., Diogenes, I. C., Abruna, H. D. (2011). Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized on l-cysteine self-assembled gold electrode. *Langmuir*, 27(5), 2052-2057.
77. Pinto, E. M., Barsan, M. M., Brett, C. M. A. (2010). Mechanism of formation and construction of self-assembled myoglobin/hyaluronic acid multilayer films: an electrochemical QCM, impedance, and AFM study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(46), 15354-15361.
78. Lin, W., Shuster, S., Maibach, H. I., Stern, R. (1997). Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(8), 1157-1163.
79. Song, S., Clark, R. A., Bowden, E. F., Tarlov, M. J. (1993). Characterization of cytochrome c/alkanethiolate structures prepared by self-assembly on gold. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(24), 6564-6572.
80. Salemme, F. R. (1976). An hypothetical structure for an intermolecular electron transfer complex of cytochromes c and b5. *Journal of Molecular Biology*, 102(3), 563-568.



81. Ruzgas, T., Wong, L., Gaigalas, A. K., Vilker, V. L. (1998). Electron transfer between surface-confined cytochrome c and an N-acetylcysteine-modified gold electrode. *Langmuir*, 14(25), 7298-7305.
82. Ge, B., Lisdat, F. (2002). Superoxide sensor based on cytochrome c immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method. *Analytica Chimica Acta*, 454(1), 53-64.
83. Kurusu, F., Ohno, H., Kaneko, M., Nagasaki, Y., Kataoka, K. (2003). Functionalization of gold electrode surface with heterobifunctional poly (ethylene oxide) s having both mercapto and aldehyde groups. *Polymers for Advanced Technologies*, 14(1), 27-34.
84. Koppenol, S., Stayton, P. S. (1997). Engineering two-dimensional protein order at surfaces. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(11), 1204-1209.
85. Bortolotti, C. A., Battistuzzi, G., Borsari, M., Facci, P., Ranieri, A., Sola, M. (2006). The redox chemistry of the covalently immobilized native and low-pH forms of yeast iso-1-cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society*, 128(16), 5444-5451.
86. Casalini, S., Battistuzzi, G., Borsari, M., Ranieri, A., Sola, M. (2008). Catalytic reduction of dioxygen and nitrite ion at a Met80Ala cytochrome c-functionalized electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 130(45), 15099-15104.
87. De Wael, K., Buschop, H., De Smet, L., Adriaens, A. (2008). Immobilization of cytochrome c on cysteamine-modified gold electrodes with EDC as coupling agent. *Talanta*, 76(2), 309-313.
88. Li, J., Cheng, G., Dong, S. (1996). Direct electron transfer to cytochrome c oxidase in self-assembled monolayers on gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 416(1-2), 97-104.
89. Cecchet, F., Marcaccio, M., Margotti, M., Paolucci, F., Rapino, S., Rudolf, P. (2006). Redox mediation at 11-mercaptoundecanoic acid self-assembled monolayers on gold. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(5), 2241-2248.
90. Liu, S., Wang, K., Du, D., Sun, Y., He, L. (2007). Recognition of glycoprotein peroxidase via Con A-carrying self-assembly layer on gold. *Biomacromolecules*, 8(7), 2142-2148.

91. Yang, M., Kabulski, J. L., Wollenberg, L., Chen, X., Subramanian, M., Tracy, T. S., Wu, N. (2009). Electrocatalytic drug metabolism by CYP2C9 bonded to a self-assembled monolayer-modified electrode. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(4), 892-899.
92. Patil, B., Kobayashi, Y., Fujikawa, S., Okajima, T., Mao, L., Ohsaka, T. (2014). Direct electrochemistry and intramolecular electron transfer of ascorbate oxidase confined on L-cysteine self-assembled gold electrode. *Bioelectrochemistry*, 95, 15-22.