



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS ENTRE
ALBUMINAS SÉRICAS Y MOLECULAS DE INTERÉS
BIOLOGICO MEDIANTE TÉCNICAS DE
VOLTAMPEROMETRÍA”.**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUÉ PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA

ADRIANA LÓPEZ ORTEGA

ASESOR

DR. ERNESTO CARRILLO NAVA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: DRA. AURORA DE LOS ANGELES RAMOS MEJIA

VOCAL: DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ

SECRETARIO: DR. ERNESTO CARRILLO NAVA

1ER SUPLENTE: M. en C. GREGORIA FLORES RODRIGUEZ

2DO SUPLENTE: DR. LUIS ALEJANDRO DÍAZ FLORES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 308 del Edificio F, Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR: DR. ERNESTO CARRILLO NAVA

SUSTENTANTE: ADRIANA LÓPEZ ORTEGA

Contenido

1. Objetivos.....	4
2. Introducción.	5
2.1 Proteínas.....	5
2.1.1 Iones metálicos en sistemas biológicos.....	10
2.1.2 Metaloproteínas.	12
2.1.3 Proteína de albúmina de suero.....	16
2.2 Voltamperometría.....	21
2.2.1 Voltamperometría cíclica.....	24
2.3.3 Voltamperometría diferencial de pulsos.	29
3. Metodología de la búsqueda de la información sobre el tema.	33
4. Formación de complejos proteína-ligantes estudiados mediante técnicas electroquímicas.....	34
5. Resultados.....	72
6. Conclusiones.....	79
7. Referencias.....	80

1. Objetivos.

General:

Realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre los últimos avances en el estudio de sistemas del tipo proteína-iones metálicos, conocidos como metaloproteínas, con la finalidad de obtener un documento actualizado que sea de utilidad para todas aquellas personas interesadas en el área de las proteínas.

Específicos:

- Recabar información sobre el uso de la albumina de suero humana y/o albumina de suero bovina en la formación de complejos con iones metálicos.
- Recopilar información termodinámica (constantes de unión, energía libre de Gibbs, etc.) asociados a la formación de complejos del tipo proteína-ion metálico. En particular buscar aquellos trabajos en donde la técnica experimental empleada para obtener la información termodinámica sea la voltamperometría cíclica y/o la de pulso diferencial.
- Organizar la información recabada de manera clara para que este documento se convierta en una referencia introductoria para aquellos que deseen llevar a cabo experimentos en esta área.
- Que este documento se convierta en lectura introductoria para los alumnos que inicien proyectos en el área, en el laboratorio 308 del Departamento de Físicoquímica de esta Facultad.

1. Introducción.

2.1 Proteínas.

Cada proteína de cada organismo se sintetiza utilizando la información genética almacenada en el genoma. La información genética se transmite en dos etapas. Primero, la información del ADN se transcribe en ARNm. A continuación, se lee la información transportada por el ARNm para dar la secuencia de aminoácidos que forman una cadena polipeptídica. Este flujo general de información en las células biológicas desde el ADN al ARN y a la proteína se conoce como el dogma central de la biología y fue formulado por primera vez por Francis Crick (Clark, 2019).

Desde el punto de vista químico, las proteínas son las moléculas con mayor complejidad estructural y refinamiento funcional que se conocen (Alberts, 2021). Las proteínas son polímeros lineales que están formados por cadenas lineales de monómeros, conocidos como aminoácidos, y se pliegan en una variedad de formas complejas en tres dimensiones. Para funcionar correctamente, muchas proteínas necesitan componentes adicionales, llamados cofactores o grupos prostéticos, que no están hechos de aminoácidos. Muchas proteínas utilizan átomos de un solo metal como cofactores; otros necesitan moléculas orgánicas más complejas (Clark, 2019).

Las proteínas tienen múltiples funciones, algunas de ellas son:

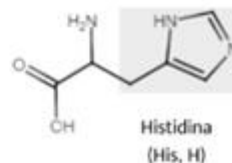
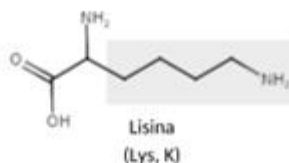
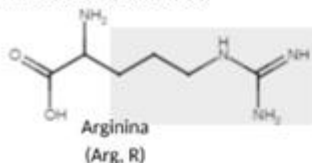
- Catalizar la ruptura o la formación de enlaces covalentes.
- Proporcionar soporte mecánico a células y tejidos.
- Transportar pequeñas moléculas o iones.
- Generar movimiento en las células y tejidos.
- Almacenar aminoácidos o iones.
- Transportar señales extracelulares de célula a célula.
- Detectar señales y transmitir las a la maquinaria de respuesta de la célula.

Las proteínas se ensamblan principalmente a partir de un grupo de 20 aminoácidos diferentes (**Figura 1**). Los aminoácidos tienen un grupo amino ($-\text{NH}_2$), un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$), un átomo de hidrogeno y una cadena lateral (grupo R), y estos están unidos al mismo átomo de carbono asimétrico (carbono alfa). La forma en la que generalmente están presentes los aminoácidos en la célula es como iones dipolares, ya que al pH fisiológico el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) dona un protón y se ioniza ($-\text{COO}^-$), mientras que cada grupo amino ($-\text{NH}_2$) acepta un protón y se convierte en $-\text{NH}_3^+$. Debido a la capacidad que tienen los grupos amino y carboxilo de aceptar y liberar protones, los aminoácidos en disolución soportan los cambios de acidez y alcalinidad y por lo tanto son importantes amortiguadores biológicos (Solomon, 2021).

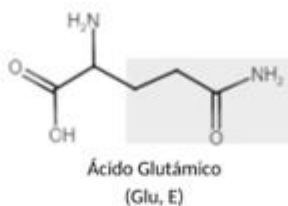
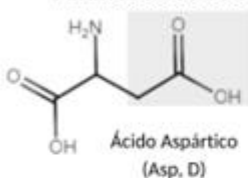
Las cadenas laterales de cada aminoácido le otorgan sus propiedades únicas: unas son polares e hidrófobas, otras tienen carga negativa o positiva, otras pueden ser químicamente reactivas, etc. (Alberts, 2021). Los aminoácidos pueden clasificarse en grupos según sus características físicas y químicas, como se muestra en la **Figura 1**. La división principal es entre aquellos con grupos R hidrofílicos y aquellos con grupos R hidrofóbicos. Los aminoácidos hidrofílicos a su vez se pueden dividir en básicos, ácidos y neutros. Por otro lado, los aminoácidos hidrofóbicos se pueden dividir en los que son alifáticos y los que contienen anillos aromáticos (Clark, 2019).

Aminoácidos hidrofílicos

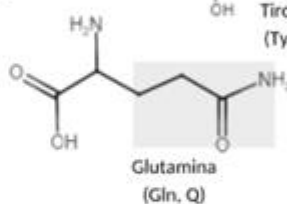
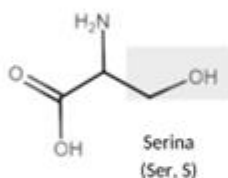
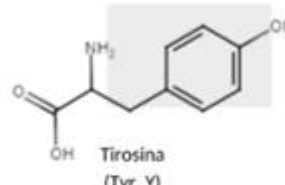
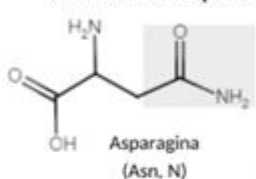
Aminoácidos básicos



Aminoácidos ácidos

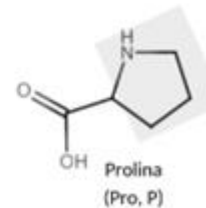
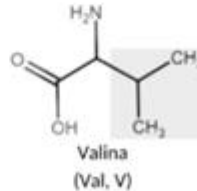
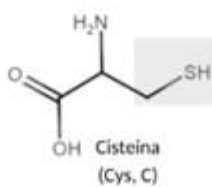
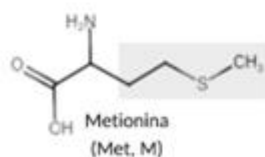
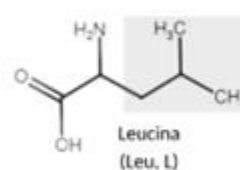
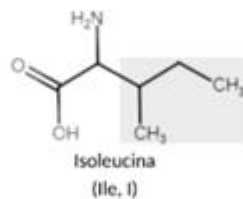
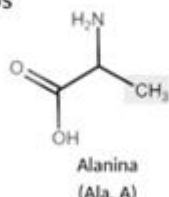
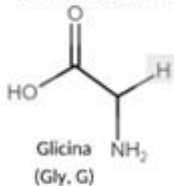


Aminoácidos polares neutros



Aminoácidos hidrofóbicos

Aminoácidos alifáticos



Aminoácidos aromáticos

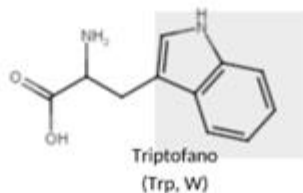
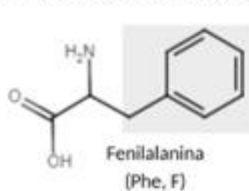


Figura 1. Los 20 aminoácidos más comunes encontrados en las proteínas. El grupo R de cada aminoácido se encuentra resaltado con un recuadro. Se muestra la notación de tres y una letra de bajo de cada estructura.

Los 20 aminoácidos más comunes se pueden representar mediante abreviaturas de tres y una letra. En su mayoría, corresponden a la(s) primera(s) letra(s) del nombre, pero como varios aminoácidos comienzan con la misma letra, los demás necesitaron otras consideraciones. Este tipo de notación se utiliza al escribir secuencias de aminoácidos de las proteínas.

En cada tipo de proteína los aminoácidos adoptan un orden único, denominado secuencia de aminoácidos, esta secuencia es exactamente igual entre las moléculas de cada proteína (Alberts, 2021). Los aminoácidos se unen entre si mediante una reacción de condensación que une el carbono del carboxilo de una molécula con el nitrógeno del amino de otra. Este enlace covalente carbono-nitrógeno se conoce como enlace peptídico. Al unirse dos aminoácidos, se forma un dipéptido y una cadena de muchos aminoácidos se denomina polipéptido. Una sola proteína puede tener una o más cadenas polipeptídicas.

Cada cadena polipeptídica consta de un esqueleto adornado con diversas cadenas laterales químicas. Este esqueleto polipeptídico está formado a partir de una secuencia repetida de átomos centrales ($-N-C^{\alpha}-C-$) hallados en cada aminoácido. Como los extremos de cada aminoácido son químicamente diferentes, cada cadena tiene una direccionalidad; en un extremo se encuentra un grupo amino (N-terminal) y el otro extremo tiene un carboxilo (C-terminal), y cada cadena se lee de izquierda a derecha (Alberts, 2021).

Las cadenas polipeptídicas largas son muy flexibles. Si bien el enlace peptídico es un enlace rígido (por el carácter parcial de doble enlace que presenta) y no puede girar, los ángulos diédricos alrededor de los enlaces $N-C^{\alpha}$ (ϕ) y $C^{\alpha}-C$ (ψ) de cada residuo si permiten la rotación libre (Voet, 2009). La flexibilidad está limitada por los impedimentos estéricos que se generan cuando los ángulos diédricos adoptan posiciones en las que los átomos cercanos chocan unos con otros (Battaner, 2012). En principio, las proteínas pueden plegarse de distintas formas, pero la forma de cada una de estas cadenas plegadas está limitada por interacciones intramoleculares no covalentes donde no solo participan los átomos del esqueleto polipeptídico sino también los átomos de las cadenas laterales de los

aminoácidos. Los tipos de interacciones no covalentes que ayudan a mantener la forma de las proteínas son los puentes de hidrógeno, las atracciones electrostáticas y las fuerzas de van der Waals (Alberts, 2021).

La estructura tridimensional de una proteína también está influenciada por la interacción hidrofóbica de las moléculas. Por lo tanto, un factor importante que rige el plegamiento de cualquier proteína es la distribución de sus aminoácidos polares y no polares. Las cadenas laterales no polares tienden a agruparse en el interior de una proteína plegada. Mientras que las cadenas polares tienden a ubicarse cerca del exterior de la proteína plegada, donde pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua y con otras moléculas polares (Alberts, 2021).

La conformación que adopta cualquier cadena polipeptídica depende de consideraciones energéticas: por lo general, una proteína se pliega en la forma en la cual minimiza su energía libre (G). Por lo tanto, el proceso de plegamiento es energéticamente favorable ($\Delta_{\text{plegamiento}}G < 0$) (Alberts, 2021). El tamaño de las proteínas varía de alrededor de 30 aminoácidos a más de 10 000, pero la mayoría tiene entre 50 y 2 000 aminoácidos de longitud. Las proteínas pueden ser globulares o fibrosas y pueden formar filamentos, laminas, anillos o esferas (Alberts, 2021).

Las estructuras de las proteínas a menudo se dividen en cuatro niveles de organización. La estructura primaria, que es la secuencia de los aminoácidos de una proteína. La estructura secundaria es una organización local, dentro de la secuencia primaria de aminoácidos, cuya estabilización depende únicamente de los enlaces de hidrógeno que se producen entre los grupos peptídicos que forman el esqueleto polipeptídico. Existen dos patrones de plegamiento que son particularmente frecuentes, la hélice α y lamina plegada β . Estos patrones permiten la formación del máximo número posible de enlaces de hidrógeno y, por ello, son muy estables (Alberts, 2021; Clark, 2019).

El plegamiento adicional de la cadena de polímero constituye la estructura terciaria. En esta estructura, la cadena polipeptídica, con sus regiones hélice α y lamina plegada β ya formadas, se pliegan para generar una estructura tridimensional final. Este plegamiento está determinado por cuatro factores principales, que implican interacciones entre los grupos R de la misma cadena polipeptídica (Solomon, 2021):

1. Los puentes de hidrógeno que se forman entre los grupos R de ciertas subunidades de aminoácidos.
2. Los enlaces iónicos que pueden ocurrir entre el grupo R de un aminoácido con carga positiva y el grupo R de otro aminoácido con carga negativa.
3. Las interacciones hidrófobas que resultan por la tendencia de los grupos R no polares, al ser excluidos por el agua circundante, causando su asociación y orientación hacia el interior de la estructura globular.
4. Los enlaces covalentes disulfuro que unen los átomos de azufre de cada dos subunidades de cisteína presentes en la misma cadena.

Muchas proteínas funcionales están compuestas de dos o más cadenas polipeptídicas. Estas interactúan de forma específica para formar una molécula biológicamente activa. La estructura cuaternaria es la estructura tridimensional resultante. Son los mismos tipos de interacciones que producen las estructuras secundarias y terciarias las que contribuyen a la formación de la estructura cuaternaria.

2.1.1 Iones metálicos en sistemas biológicos.

Los metales tienen un papel muy importante en la biología, el medio ambiente y la medicina. Proteínas que contienen iones metálicos, por ejemplo, hierro y cobre son participes en procesos de gran importancia como la respiración y la fotosíntesis, por mencionar algunos. Metales como el cadmio, el manganeso y el plomo en el medio ambiente representan un peligro tóxico grave. Pese a que muchos metales resultan tóxicos, algunos son utilizados en medicina en tratamientos contra el cáncer, como el cisplatino, y

en tratamientos contra otras enfermedades. Pero no sólo eso, sino que también han sido utilizados como agentes de contraste no invasivos para la formación de imágenes por resonancia magnética y como radiofármacos. También se requiere cierta cantidad de iones metálicos para garantizar la salud humana, como se menciona a continuación.

Los elementos químicos esenciales para las formas de vida se pueden dividir en cuatro categorías principales: 1. Elementos esenciales (H, C, N, O, P, S), son los elementos de los cuales el cuerpo humano está formado; 2. Macrominerales y iones (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cl^- , PO_4^- , SO_4^-), estos se encuentran en concentraciones bastante grandes. De hecho, el sodio, potasio, calcio y magnesio constituyen casi el 99% de los iones metálicos contenidos por el cuerpo humano; 3. Oligoelementos (Fe, Zn, Cu), el cuerpo los requiere para distintos procesos fisiológicos en pequeñas cantidades; y 4. Elementos ultra traza, compuestos de no metales (F, I, Se, As, B) y metales (Mn, Mo, Co, Cr, V, Ni, Cd, Sn, Pb, Li) (Roat-Malone, 2002).

El cuerpo humano está compuesto en un 99.9% de solo 11 elementos, 4 de los cuales representan el 99% del total (hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno). La mayoría de los sistemas biológicos llegan a requerir alrededor de 25 elementos de la tabla periódica (Crichton, 2008).

Los metales en los sistemas biológicos funcionan de diferentes formas. Los metales del grupo 1 y 2 operan como elementos estructurales o en el mantenimiento de carga y equilibrio osmótico. Los iones de metales de transición que existen en estados de oxidación únicos funcionan como elementos estructurales o como desencadenantes de la actividad de las proteínas. Los metales de transición que existen en múltiples estados de oxidación sirven como portadores de electrones, facilitadores del transporte de oxígeno y como sitios en los que ocurre la catálisis de enzimas. Además, son las especies donde se pueden ubicar las reacciones de transferencia de carga que se pueden estudiar las técnicas electroquímicas. Los iones metálicos, dependiendo de su ubicación dentro del sistema biológico, pueden tener funciones muy diversas (Roat-Malone, 2002).

La presencia de los metales en la biología resulta impresionante. Se ha estimado que aproximadamente un tercio de todas las proteínas y enzimas requieren de iones metálicos como cofactores para la función biológica (Holm, 1996).

2.1.2 Metaloproteínas.

Las proteínas en las que los iones metálicos se unen directamente a algunos ligandos biológicos se denominan metaloproteínas. Los ligandos biológicos que participan en la unión de metales en metaloproteínas se pueden dividir en tres categorías: residuos de aminoácidos, aniones inorgánicos y cofactores orgánicos (Crichton, 2012).

No todos los aminoácidos son ligandos metálicos potenciales, solo un pequeño número de estos lo son. En la categoría de residuos de aminoácidos tenemos al tiolato de cisteína, el imidazol de histidina, los carboxilatos del ácido glutámico y ácido aspártico, y el fenolato de tirosina. Con menos frecuencia el grupo tioéter de metionina, el grupo amino de lisina, el grupo guanidino de arginina, y los grupos de amida de asparagina y glutamina (Crichton, 2012). Pero los iones metálicos no sólo pueden unirse a esos residuos de aminoácidos, sino también pueden unirse a los enlaces peptídicos, a través del nitrógeno amídico o del carbonilo desprotonado, y a los grupos amino y carboxilo terminales de la proteína. En la **Figura 2** se muestran los aminoácidos involucrados en la unión a iones metálicos y los modos en los que se unen.

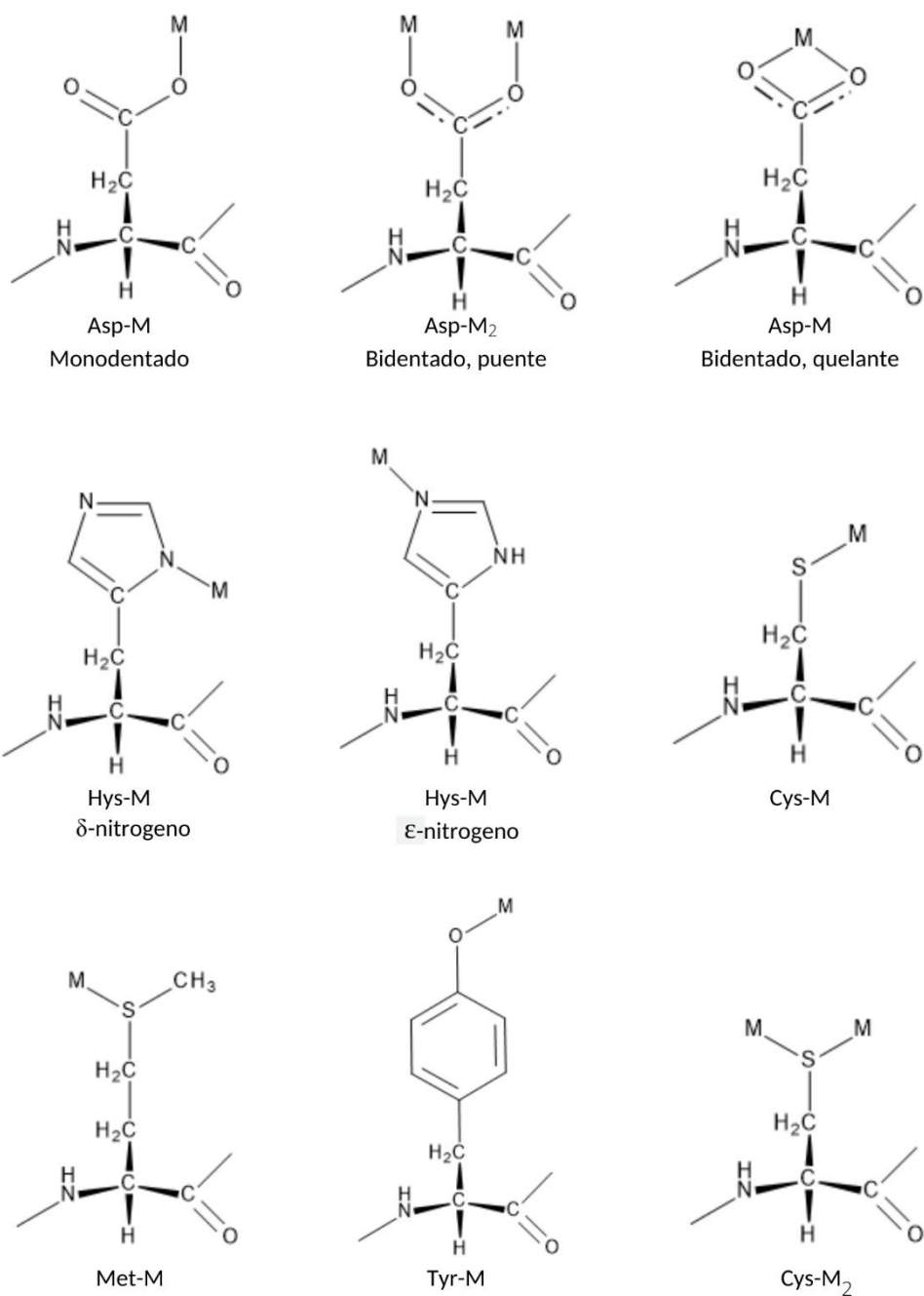


Figura 2. Residuos de aminoácidos capaces de quelar iones metálicos y sus modos de unión a metales. El ion metálico se representa con la letra M.

En la categoría de aniones inorgánicos, algunos de los ligandos que están implicados en la unión de metales en metaloproteínas son HCO_3^- , PO_4^{3-} . En bacterias encontramos a CN^- y CO . Muchas metaloproteínas tienen sus centros metálicos ubicados en cofactores orgánicos, como en el núcleo de tetrapirrol de porfirinas y las corrinas, en grupos de metales (grupos Fe-S) o en cofactores más complejos. En la **Figura 3** se muestra la estructura de algunos cofactores orgánicos.

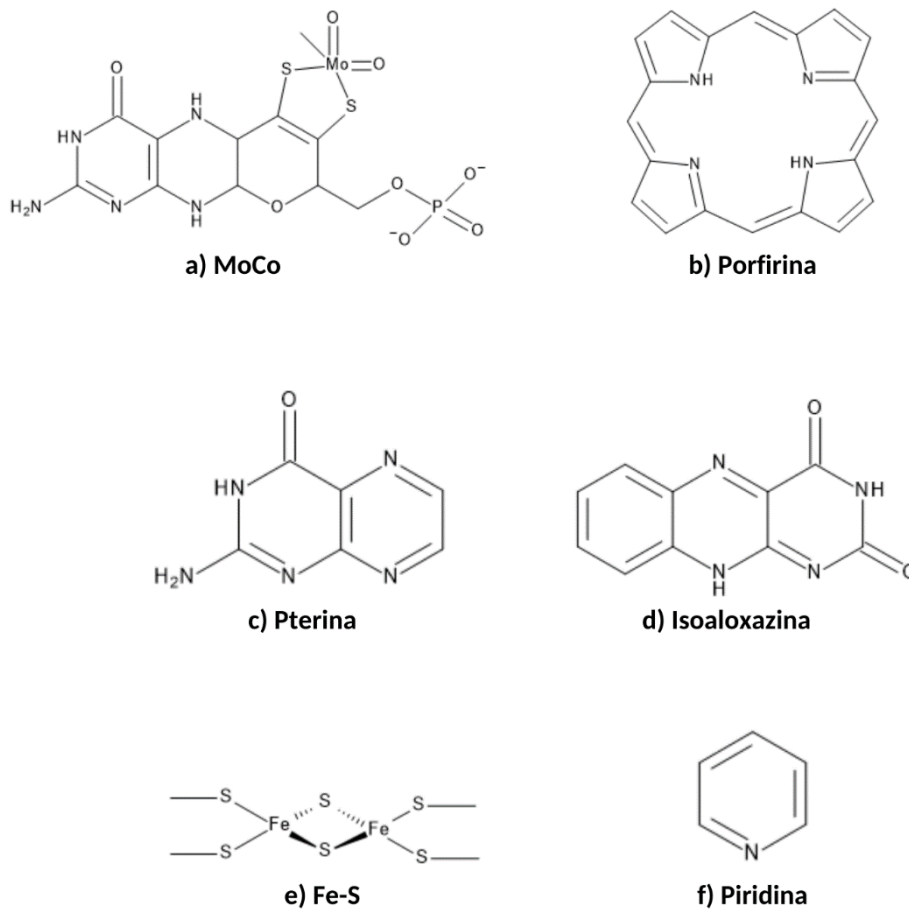


Figura 3. Estructuras de algunos cofactores orgánicos: a) Cofactor MoCo para enzimas dependientes de Mo, b) esqueleto de porfirina presente en cofactores como el grupo hemo y clorofila, c) anillo de pterina d) anillo de isoaloxazina presente en el cofactor riboflavina, e) grupo hierro-azufre, f) anillo de piridina que se encuentra en la estructura del cofactor NAD.

Las interacciones entre proteínas e iones metálicos son comparables a las observadas en otros complejos orgánicos e inorgánicos, y pueden ser descritos por su número de coordinación y geometría. Estas pueden tener uno o más átomos de metal unidos a sitios específicos en la cadena polipeptídica. La inserción de iones metálicos en metaloproteínas, en algunos casos, se realiza en sitios que están preformados y, en otros, la unión de metales da como resultado un cambio en la conformación de la proteína (Crichton, 2012).

Las metaloproteínas se pueden dividir en dos grupos: metaloproteínas biológicamente activas y metaloproteínas sin actividad biológica aparente. En el primer grupo, la unión de iones metálicos y proteínas pareciera satisfacer 5 principales razones funcionales (Banaszak, 2000), las cuales son:

- **Estructural:** El ion metálico es necesario para la correcta conformación de una región de una proteína. Incluso puede cumplir una función reguladora.
- **Transporte y almacenamiento:** Varias proteínas se unen a iones metálicos para transportarlos a través de medios fisiológicos o para almacenar el ion metálico para su uso posterior por parte del organismo.
- **Transferencia de electrones:** El ion metálico sirve como centro redox para la transferencia, almacenamiento o absorción de electrones. El potencial redox del ion metálico está parcialmente definido por la proteína.
- **Unión de oxígeno:** El ion metálico se une transitoriamente a oxígeno molecular (O_2). La hemoglobina es un ejemplo, pero otras proteínas que contienen hierro en esta categoría pueden no incluir un grupo hemo.
- **Catalítico:** A menudo los iones metálicos tienen un papel vital en los sitios activos de una variedad de enzimas. El ion metálico es necesario para la unión del sustrato o del agua, la activación del sustrato o el desarrollo de estados de transición apropiados. Las metaloenzimas son importantes en numerosas reacciones redox, incluidos fenómenos tan complejos como la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno.

2.1.3 Proteína de albúmina de suero.

La albúmina es la proteína circulante más abundante en el plasma sanguíneo. Representa la mitad del contenido total de proteínas del plasma en las personas sanas (Moman, 2021) y por esta razón es una de las proteínas más estudiadas. Es por esto que se le ha empleado en múltiples investigaciones debido a que puede ser empleada en varias aplicaciones en el área de la medicina clínica, sobre todo.

La albúmina sérica se encuentra presente en todas las especies de mamíferos. Se puede extraer de bovinos, ratas, conejos, cerdos, perros, humanos, etc. Muchas de estas albúminas han sido utilizadas para estudiar la interacción con fármacos y estudios de farmacocinética en lugar de la albúmina sérica humana. Esto debido a la gran similitud encontrada en las secuencias de aminoácidos de otras especies respecto a la humana y al hecho de que la obtención de la proteína humana es mucho más difícil y por lo tanto el costo de la misma es mucho mayor. Sin embargo, se han encontrado diferencias en cuanto a la unión de varios fármacos y metabolitos a albuminas de diferentes especies (Bueno, 2009). Aun con todo lo anterior, la albumina de suero bovino se utiliza como proteína modelo para la albumina sérica humana, por ser más barata y de fácil obtención.

La albúmina sérica humana (ASH), **Figura 4**, es una pequeña proteína globular que constituye alrededor del 60 % del total de proteína en la sangre. Tiene un peso molecular de 66.5 kDa y está formada por 585 residuos de aminoácidos que se organizan en tres dominios homólogos (denominados I, II y III), los cuales pueden interactuar con sustratos de distinta naturaleza. A su vez cada dominio está formado por dos subdominios helicoidales separados (llamados A y B), conectados por una bobina aleatoria. Las regiones terminales de los dominios secuenciales contribuyen a la formación de hélices entre dominios que unen el dominio IB a IIA y IIB a IIIA, respectivamente. La organización estructural modular de esta proteína proporciona una variedad de sitios de unión de ligandos (Fasano, 2005).

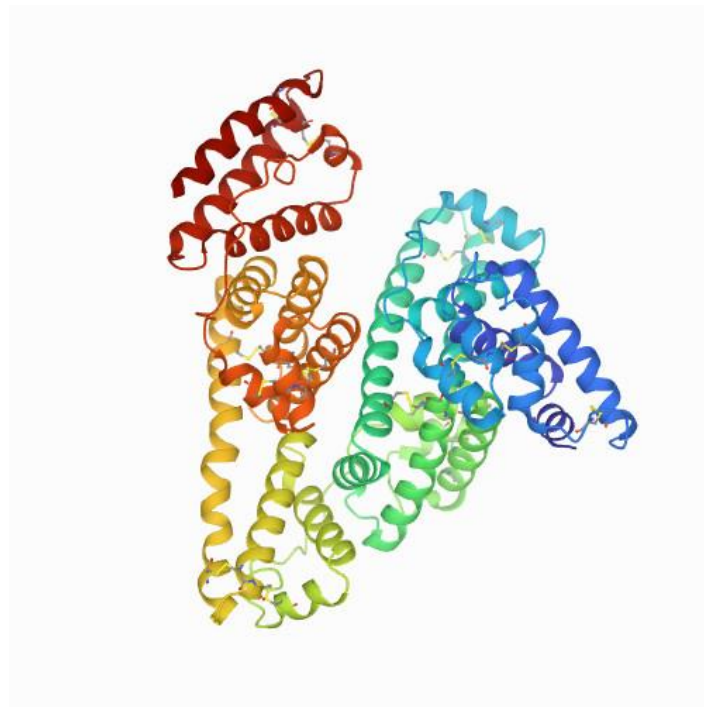


Figura 4. Estructura de la proteína albúmina sérica humana (PDB: 1AO6) (Sugio, 1999). En esta representación de listones se observa que la proteína posee una gran cantidad de estructura secundaria del tipo alfa hélice.

Esta proteína se sintetiza en el hígado y se exporta como una sola cadena no glicosilada, alcanzando una concentración en sangre de 7.0×10^{-4} M (Fasano, 2005). Está presente en prácticamente todos los tejidos, pero sobre todo en la piel y los músculos, encontrándose en estos dos tejidos el 80% de albúmina extravascular. También puede encontrarse en cualquier fluido corporal, como en el fluido vítreo y acuoso ocular, en el sudor, en las lágrimas, saliva y sangre, en donde es la proteína transportadora más abundante (Bueno, 2009).

La principal función de la albumina sérica es actuar como vehículo de transporte y distribución de sustancias endógenas y exógenas en la sangre. Esto debido a su gran capacidad de unión a ligandos, proporcionando un depósito para una amplia gama de compuestos (fármacos, ácidos grasos aniónicos de cadena larga, ácidos biliares, hormonas, vitaminas, etc.) que pueden estar en el organismo en cantidades más altas que su solubilidad en plasma, como es el caso de los ácidos grasos, así como una disminución de

su toxicidad o una protección frente a la oxidación. También, funciona como el modulador más significativo de la presión oncótica plasmática y ayuda a mantener el pH de la sangre.

Debido a su gran abundancia en el cuerpo humano y a su capacidad de unirse a fármacos, la ASH influye en el comportamiento farmacocinético de muchos fármacos, afectando su eficacia y velocidad de entrega. En ocasiones, la albumina actúa como almacén de ciertas toxinas y también, en ocasiones, presenta actividad enzimática (Fasano, 2005).

SITIOS DE UNIÓN DE METALES

A saber, la ASH cuenta con cuatro sitios de unión a metales específicos (Bal, 2013). Estos sitios se encuentran en la mayoría de las albuminas de mamíferos, los sitios conocidos hasta el momento son:

1. Sitio N-terminal

También se le conoce como sitio ATCUN y se compone de los tres primeros residuos de la secuencia de la albúmina, Asp-Ala-His. Se caracteriza por tener cuatro átomos donantes al momento de coordinar con iones metálicos. Estos átomos provienen de un amino terminal libre, una histidina en la tercera posición y dos nitrógenos del enlace peptídico (**Figura 5**). Esta disposición espacial de los átomos donantes prefiere iones metálicos capaces de formar complejos con geometría plana cuadrada como lo son el Cu(II) y Ni(II).

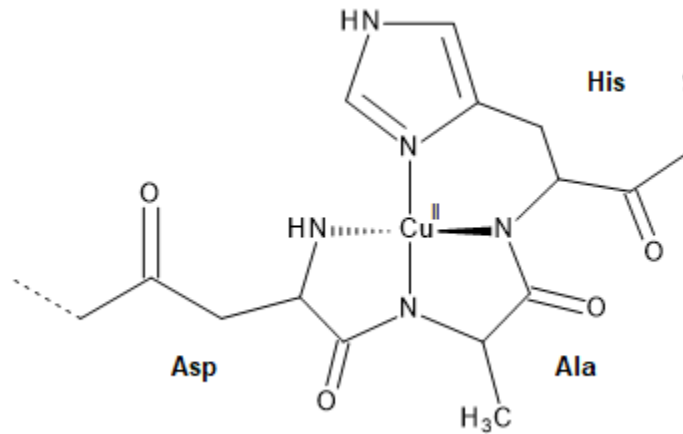


Figura 5. Estructura del complejo de Cu(II) con el sitio ATCUN.

2. Residuo Cys34

De los 35 residuos de Cys que contiene la albúmina, 34 forman 17 puentes disulfuro que interconectan las alfa hélices, que dan forma a los dominios y subdominios de la proteína. La cisteína restante, Cys34, es el primer residuo de Cys en la secuencia de la albúmina y no se involucra con la formación de puentes disulfuro. Tiene un tiol libre en la forma reducida de la ASH lo que le da la capacidad de enlazarse con iones metálicos, tales como el Au(I) y Pt(II), a través de un solo enlace metal-azufre.

3. Sitio MBS

En este sitio, al momento de coordinar metales, participan el carbonilo de la cadena lateral de Asn99 del dominio I, el imidazol y el oxígeno de amida de His247 y el carboxilato de Asp249 ambos del dominio II, y una molécula de H₂O (**Figura 6**). Este sitio tiene preferencia por el Zn(II) y es uno de los dos sitios energéticamente equivalente para Cd(II), lo que quiere decir que el Cd(II) se une de forma indistinta. También es un sitio de unión secundario para Cu(II) y Ni(II). Es por lo anterior que es denominado sitio de unión multimetal, aunque también se le conoce como sitio A.

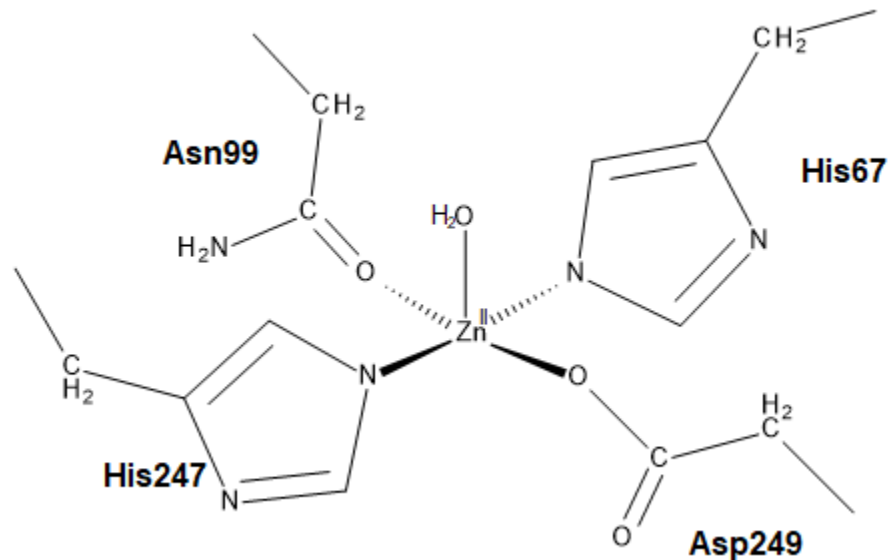


Figura 6. Estructura del complejo formado entre el Zinc y el sitio MBS.

4. Sitio B

Es el segundo sitio de Cd(II), el cual se une aproximadamente con la misma afinidad que el sitio A. Tiene menor afinidad por el Zn(II) y parece ser el sitio principal para iones Mn(II). No ha sido localizado hasta el momento.

	N-terminal	Cys34	MBS/A	B
Cu(II)	unión	-	unión	-
Zn(II)	-	-	unión	unión
Co(II)	unión	-	unión	unión
Ni(II)	unión	-	unión	-
Cd(II)	-	-	unión	unión
V(IV)O	unión	-	unión	-
Au(I)	-	unión	-	-
Pt(II)	-	unión	-	-

Tabla 1. Algunos metales y los sitios preferentes de unión en HSA (Bal, 2013).

Pero no solo los metales mencionados anteriormente se unen a la albumina sérica humana. En la **Tabla 1**, se encuentran enlistados algunos de los metales de los que se tiene evidencia de su unión en los sitios antes presentados.

Como ya se ha mencionado antes, son variadas las moléculas que se unen a la albumina. Si bien los iones metálicos tienen sitios específicos donde unirse, las demás moléculas no tienen como tal un sitio definido. Mucho tiene que ver la estructura de estas otras especies, resultan ser más complejas que las de un ion metálico, lo que complica que se unan de forma tan específica. Muchas de estas especies se unen a la albumina por medio de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas.

2.2 Voltamperometría.

La electroquímica es una gran herramienta para monitorear reacciones donde existe transferencia de electrones, donde se relaciona el flujo de estos con cambios químicos (Elgrishi, 2017). Dentro de las técnicas electroquímicas se encuentra la voltamperometría, que es una de las técnicas analíticas más sensibles para la identificación y cuantificación de metales, y que es capaz de detectarlos a bajos niveles de concentración, tan bajos como unas cuantas partes por billón.

La voltamperometría es muy utilizada para realizar estudios fundamentales sobre los procesos de oxidación-reducción en distintos medios, también procesos de adsorción en superficies y mecanismos de transferencia de electrones. En la voltamperometría hay un mínimo consumo de analito y la corriente que se desarrolla en la celda electroquímica se mide bajo condiciones de polarización por concentración completa. Lo que quiere decir que la polarización del electrodo se establece cuando los efectos de la difusión, la migración o la convección son insuficientes para transportar al analito hacia la superficie del electrodo, lo que implica aplicar un potencial eléctrico mayor al calculado teóricamente (Skoog, 2015). En esta técnica se aplica una señal de excitación de potencial variable a un electrodo de trabajo de una celda electroquímica. Esta señal de excitación produce una respuesta de

corriente característica, la cual es la propiedad que se mide. La corriente en la celda se registra en función del potencial aplicado.

INSTRUMENTACIÓN.

En la **Figura 7** se muestran los componentes de la celda electroquímica. Para esta técnica se emplean tres electrodos sumergidos en una disolución que contiene al analito electroactivo y también un exceso de electrolito soporte, el cual es un electrolito no reactivo.

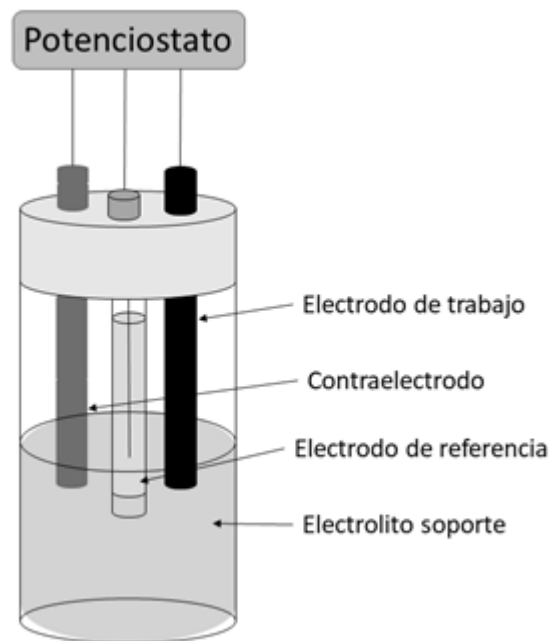


Figura 7. Esquema de una celda electroquímica en donde se observa el arreglo de los electrodos de trabajo, referencia y el contraelectrodo.

Electrodos

- Electrodo de trabajo (ET).

Está compuesto de material redox inerte dentro del rango de potencial de interés. Su potencial frente al electrodo de referencia varía linealmente con el tiempo. Es de

dimensiones pequeñas para así incrementar su tendencia a polarizarse. En este electrodo es donde se lleva a cabo la reacción electroquímica de interés.

- Electrodo de referencia (ER).

Tiene un potencial que permanece constante a lo largo del experimento. Se utiliza para medir con precisión el potencial aplicado en relación con una reacción de referencia estable.

- Contraelectrodo (CE).

Se utiliza para cerrar el circuito eléctrico. La corriente se registra como un flujo de electrones entre ET y CE. Para asegurar que la cinética de la reacción que sucede en este electrodo no inhiba las que ocurren en el ET, el área de la superficie del CE es mayor que el área de la superficie del ET.

Electrolito soporte.

Es el encargado de aumentar la conductividad de la solución. Lo hace migrando para equilibrar la carga y completar el circuito eléctrico. Se necesitan grandes cantidades de electrolito soporte para limitar la migración del analito electroactivo. Mientras que las especies electroactivas se encuentran en concentraciones de $10 \mu\text{M}$ a 1 mM , el electrolito soporte suele estar en una concentración de 0.1 M . Un buen electrolito soporte tiene las siguientes características:

- Tiene alta solubilidad en el disolvente elegido
- Química y electroquímicamente inerte a las condiciones del experimento
- Alto grado de pureza

2.2.1 Voltamperometría cíclica.

Es una técnica ampliamente utilizada para obtener información cualitativa sobre reacciones y mecanismos donde se lleven a cabo procesos de reducción y oxidación de especies moleculares. También permite una determinación rápida de potenciales formales, identificar reacciones químicas que preceden o siguen a la transferencia de electrones y determinar la cinética de transferencia de electrones. Permite un barrido rápido del potencial del electrodo y de esta forma identificar pares redox y facilita la explicación sobre la cinética de reacciones electroquímicas que suceden en la superficie del electrodo (Elgrishi, 2017; Ozkan, 2015).

La señal de excitación para esta técnica es de tipo triangular, **Figura 8**, lo que quiere decir es que se varía el potencial de forma lineal desde un potencial inicial ($E_{inicial}$) hasta un potencial de inversión (E_{λ}), aquí la dirección del barrido se invierte hasta alcanzar el potencial final (E_{final}) que puede ser igual o distinto al inicial. Estos valores se pueden aplicar n ciclos deseados.

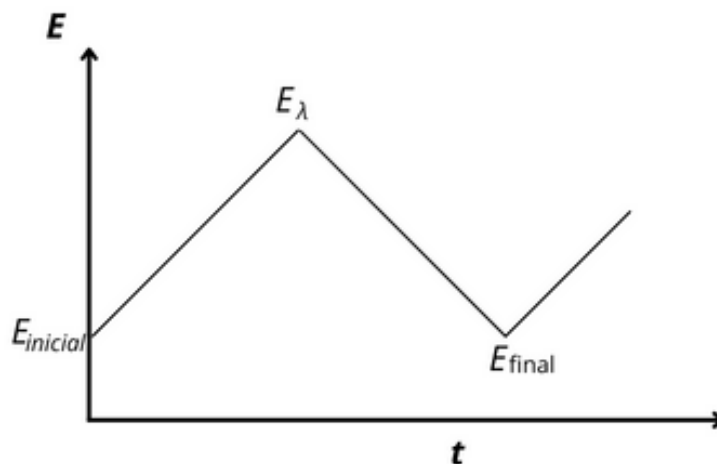


Figura 8. Forma de onda triangular típica para la excitación de un sistema electroquímico, para obtener un voltamperograma cíclico.

En esta técnica se aplica un potencial, que aumenta o disminuye linealmente en función del tiempo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E = E_i + vt \quad (1)$$

Donde E_i es el potencial inicial y v es la velocidad de exploración [mV/s ó V/s] y t es el tiempo [s]. La dirección del barrido inicial puede ser negativa (barrido directo) o positiva (barrido inverso) y generalmente la duración de los ciclos varía entre 1 ms a 100 s. El valor de potencial al que se inicia el barrido se selecciona de forma que el analito no sufra reacciones redox inicialmente. El potencial de inversión se selecciona de forma que tanto la oxidación como la reducción del analito estén incluidas en el intervalo de potencial a barrer. La señal colectada se grafica en función del potencial aplicado y al resultante se le conoce como voltamperograma, **Figura 9**. (Skoog, 2015; Ozkan, 2015)

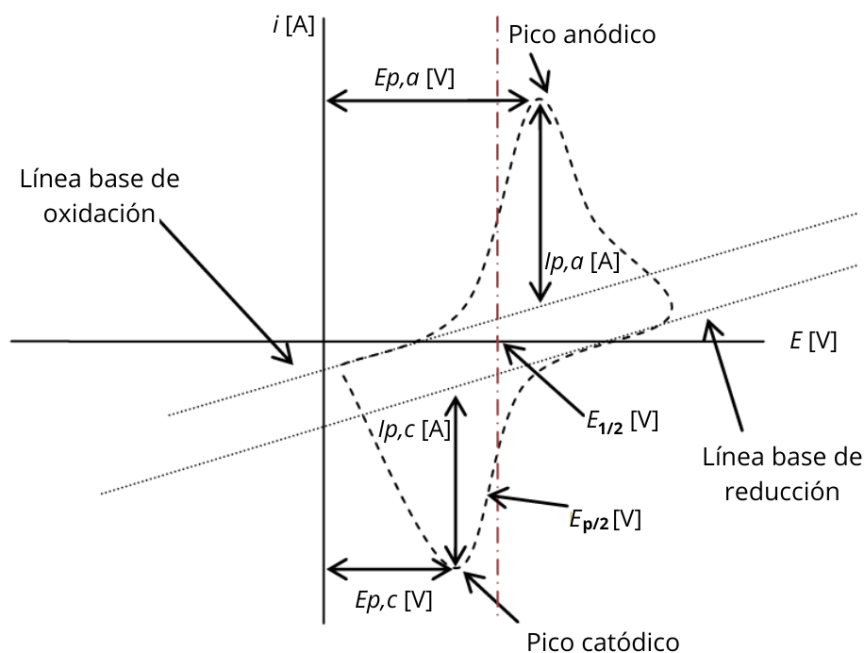


Figura 9. Ejemplo de un voltamperograma cíclico para un sistema electroquímicamente reversible. Tomado y modificado de (Baeza, 2011).

La **Figura 9** contiene los parámetros importantes de un voltamperograma cíclico y sus magnitudes de acuerdo con el convenio planteado por la IUPAC en 1999, las cuales son: las corrientes de pico, anódico ($i_{p,a}$) y catódico ($i_{p,c}$), los potenciales en los que se producen los picos, anódico ($E_{p,a}$) y catódico ($E_{p,c}$), el potencial de pico medio catódico ($E_{p/2}$) y el potencial de media onda ($E_{1/2}$). Una forma de medir la i_p implica la extrapolación de la línea base de corriente como se muestra en la **Figura 9**. Establecer de forma correcta las líneas base para realizar una medición precisa para cada pico no es fácil, especialmente para sistemas más complejos.

Existen dos convenciones para trazar los datos que se obtienen de voltamperometría cíclica. Una de ellas es la convención de la IUPAC y otra es la convención de Estados Unidos, en la **figura 10** están ejemplificadas cada una.

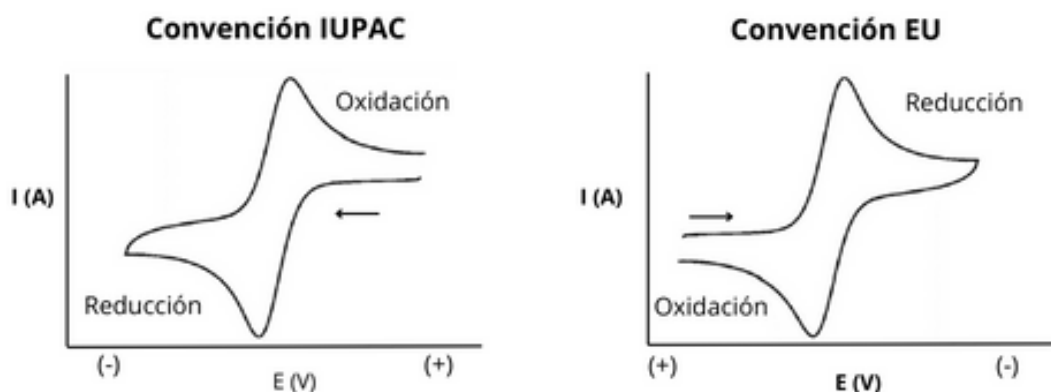


Figura 10. Convenciones empleadas para el trazo de voltamperogramas cíclicos. La flecha en cada imagen indica el comienzo y la dirección con la que se realizó el barrido de potencial.

En la convención IUPAC se muestran potenciales negativos en el lado izquierdo de la gráfica y potenciales positivos hacia la derecha; la oxidación se presenta en el cuadrante positivo, mientras que la reducción en el cuadrante negativo. La convención de EU es todo lo contrario, como un giro de 180°.

Un par redox en el que ambas especies intercambian rápidamente electrones con el electrodo, es decir, el perfil de corriente potencial se rige únicamente por la difusión y por

la ecuación de Nernst, se denomina electroquímicamente reversible (Kissinger, 1983). Para estos sistemas la ecuación de Nernst relaciona el potencial de una celda electroquímica (E) con el potencial en condiciones estándar de una especie (E^0), que es el potencial de semicelda con respecto al electrodo estándar de hidrógeno medido bajo condiciones de actividad de las especies igual a 1, condiciones tales que la relación de concentraciones de reactivos y productos es exactamente 1, y las concentraciones del analito oxidado (Ox) y reducido (Red) en el sistema en equilibrio.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (2)$$

En la **Ecuación 2**, F es la constante de Faraday, R es la constante universal de los gases, n es el número de electrones y T es la temperatura (Elgrishi, 2017). El potencial formal es específico de las condiciones experimentales empleadas y en ocasiones se estima con el potencial de media onda ($E_{1/2}$) determinado experimentalmente, **Ecuación 3**. La ecuación de Nernst es una forma de predecir como responderá un sistema al cambio de concentración de especies en solución o de potencial de electrodo.

$$E^{0'} \cong E_{1/2} = \frac{(E_{pc} - E_{pa})}{2} \quad (3)$$

Otra característica de los sistemas reversibles es que la corriente de pico (i_p) aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de exploración y es directamente proporcional a la concentración. Esto queda descrito por la ecuación de Randles-Sevcik, **Ecuación 4**, donde i_p es la intensidad de corriente de pico [A], n es el número de electrones intercambiados, A es el área de superficie del electrodo [cm²], D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva [cm² s⁻¹], C la concentración de la especie electroactiva [mol cm⁻³] y v la velocidad de barrido [V s⁻¹].

$$i_p = 0.446nFAC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{1/2} \quad (4)$$

La ecuación de Randles-Sevcik puede dar indicaciones sobre si la especie electroactiva se difunde libremente en la solución o si está siendo adsorbida en las inmediaciones del electrodo. Esto se ve en las gráficas i vs $v^{1/2}$, en el primer caso debe ser lineal mientras que en el segundo se va a mostrar desviaciones de la linealidad, ocurriendo que la intensidad de corriente va a ser directamente proporcional a la velocidad de barrido en lugar de su raíz cuadrada. Además de verificar que el analito se difunde libremente, se puede utilizar la ecuación de Randles-Sevcik para determinar los coeficientes de difusión cuando se conocen la concentración, el área del electrodo y la velocidad de barrido.

Un primer criterio para identificar la reversibilidad de un sistema es realizar el cociente de las señales de corriente anódica y catódica para distintas concentraciones o velocidades de barrido. Debe cumplirse que $i_{pa}/i_{pc} = 1$ para una electroreducción y $i_{pc}/i_{pa} = 1$ para una electrooxidación (Baeza, 2011).

La separación entre picos anódicos y catódicos viene dada por la **Ecuación 5**, con esto se puede determinar el número de electrones transferidos en la reacción del electrodo (n) para un par reversible.

$$\Delta E_p = E_a^p - E_c^p = \frac{57}{n} \text{ mV} \quad (a \ 25^\circ C) \quad (5)$$

Para calcular el potencial de medio pico ($E_{p/2}$) se utilizan los argumentos anteriores para un sistema reversible, esto indica una mejor estimación del punto medio entre los picos de un voltamperograma. En la **Ecuación 6** el signo positivo se toma para un proceso de oxidación, mientras que el signo negativo para una reducción (Baeza, 2011). El término voltamperométrico E_p para un sistema reversible es independiente de la velocidad de barrido.

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm 1.09 \frac{RT}{nF} = E_{1/2} \pm \frac{28.0 \text{ mV}}{n} \quad (a \ 25^\circ C) \quad (6)$$

Un indicativo de un sistema cuasi-reversible es un ΔE_p mayor a $\frac{57.0}{n}$ mV o picos de oxidación y reducción no simétricos. Para un sistema cuasi-reversible, la reacción de transferencia de electrones no responde instantáneamente a un cambio de potencial. La corriente está controlada tanto por la transferencia de carga como por el transporte masivo. Los picos, en comparación con un voltamperograma de un sistema reversible, se encuentran desplazados. El pico anódico se desplaza a potenciales más positivos y el pico catódico a potenciales más negativos. En un sistema cuasi-reversible la transferencia lenta de electrones en la superficie del electrodo causa que la separación entre picos aumente haciendo a estos sistemas dependientes de la velocidad de barrido.

2.3.3 Voltamperometría diferencial de pulsos.

La voltamperometría diferencial de pulsos es una técnica donde se utiliza una forma de onda que consta de pulsos de amplitud constante superpuestos en una forma de onda de escalera. En condiciones típicas (**Figura 11**), la amplitud de los pulsos esta entre 10 y 100 mV, el potencial va variando del valor inicial en pequeños pasos (entre 2 y 5 mV), y el pulso de voltaje de corta duración (50 ms) se superpone al final de un paso largo (entre 0.5 y 5 s) (Ozkan, 2015).

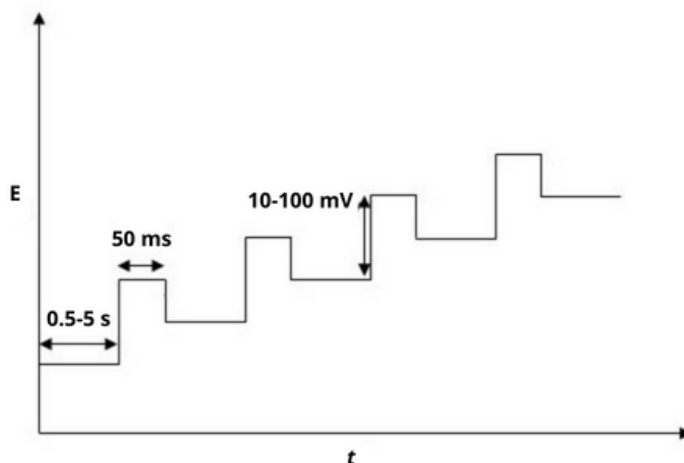


Figura 11. Programa de excitación aplicado en voltamperometría de pulso diferencial.

Esta técnica, generalmente, tiene límites de detección de entre dos o tres órdenes de magnitud menores que la voltamperometría clásica, encontrándose en el intervalo de 10^{-7} a 10^{-8} M.

Es una técnica más sensible en comparación con voltamperometría de pulso normal, ya que la corriente capacitiva se discrimina fuertemente con respecto a la corriente faradaica, esto porque la primera tiene que ver con la capacitancia de la doble capa eléctrica establecida entre el electrodo y el electrolito, mientras que la segunda es la corriente de intercambio de carga, relacionada a la reacción redox del sistema. Esto se logra muestreando la corriente dos veces, antes de la aplicación del pulso de corriente directa y al final del pulso. La diferencia de corriente por pulso (Δi) se registra en función del voltaje de excitación que aumenta de manera lineal. Esto da como resultado un voltamperograma, **Figura 12**, que es una curva diferencial que consiste en un pico cuya altura es directamente proporcional a la concentración (Skoog, 2015).

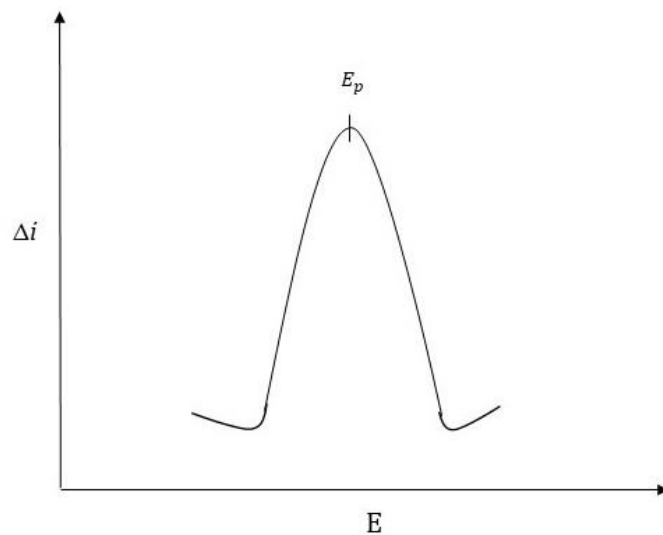


Figura 12. Voltamperograma típico para un experimento de voltamperometría de pulso diferencial.

En este tipo de voltamperograma, el potencial de pico (E_p) puede relacionarse con $E_{1/2}$. Además, E_p puede ser usado para identificar y para indicar sobre la reversibilidad o irreversibilidad de un sistema. Cuando E_p se aleja del valor de $E_{1/2}$ y al mismo tiempo

aumenta el ancho y disminuye la altura del pico, se trata de una irreversibilidad creciente. La relación entre el potencial de pico y $E_{1/2}$ para una oxidación está dado por la **Ecuación 7**.

$$E_p = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (7)$$

Donde ΔE es la amplitud del pulso y el signo negativo se reemplaza por un signo positivo cuando se trata de una reducción. Cuando se trata de un proceso de oxidación, el pico en el voltamperograma se desplaza en dirección negativa a medida que aumenta la amplitud del pulso y para un proceso de reducción, el pico se desplaza en dirección positiva (Ozkan, 2015).

La expresión teórica de la diferencia de corrientes se muestra en la **Ecuación 8**, en ella se está considerando que el potencial base impuesto a diferentes tiempos es $E + \Delta E$, donde ΔE es la altura del pulso.

$$|\Delta i| = \frac{nFAD_{ox}^{1/2}C_{ox}}{\pi^{1/2}(\tau - \tau')^{1/2}} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right) \quad (8)$$

Donde:

n = número de electrones intercambiados

A = área superficial del electrodo [cm^2]

D_{ox} = coeficiente de difusión de la especie electroactiva [$cm^2 s^{-1}$]

C_{ox} = concentración de la especie electroactiva [$mol cm^{-3}$]

τ = tiempo de la segunda corriente muestreada por pulsos [s]

τ' = tiempo de la primera corriente muestreada por pulsos [s]

F = constante de Faraday

$\sigma = e^{(nF\Delta E_p/2RT)}$

En la **Ecuación 8**, a medida que aumenta $|\Delta E|$, el cociente $\left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma}\right)$ aumenta y es cero cuando $\Delta E = 0$. Cuando ΔE es negativo, Δi es positiva (o anódica) y viceversa.

La forma del pico y la magnitud de la corriente están fuertemente influenciadas por los pasos químicos y electroquímicos que suceden en el electrodo. Los sistemas irreversibles tienen picos de corriente más bajos y amplios con menos sensibilidad y resolución más baja que los sistemas reversibles. El ancho del pico a la mitad de la altura ($W_{1/2}$) puede ser un indicativo de la reversibilidad del sistema.

$$W_{1/2} = \frac{3.52 RT}{nF} \quad (9)$$

El ancho de pico mínimo para una reacción reversible de un electrón es de 90.4 mV y para una reacción reversible de dos electrones es de 45.2 mV y sólo un valor de $W_{1/2}$ menos de 90 mV muestra que se transfieren al menos dos electrones (Ozkan, 2015).

3. Metodología de la búsqueda de la información sobre el tema.

Para recabar la información presentada en este trabajo se realizaron varias búsquedas en las bases de datos bibliográficos de literatura científica Scopus (de la editorial Elsevier) y CAS SciFinderⁿ (de la editorial Chemical Abstracts Service), en donde se emplearon como palabras clave y sus variantes los siguientes términos: cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, human serum albumin, albumin, metal-albumin complexes y binding. Evidentemente, debido a que la gran cantidad de información científica se encuentra publicada en inglés fue que se emplearon estos términos en el idioma mencionado. Además, debido a que nos interesa recopilar la información más reciente sobre el tema fue que se aplicó un filtro en el año de publicación de la información referente al tema abarcando desde el año 1990 hasta el 2022.

De los artículos resultantes de la búsqueda se eligieron los que presentaban información donde se empleó la técnica de voltamperometría, ya sea cíclica o diferencial de pulsos, para caracterizar los complejos formados entre biomoléculas y la albumina de cualquier especie, dándole prioridad a los trabajos de ASH y ASB. También se incluyeron aquellos artículos en donde se informa que desarrollaron algún sensor electroquímico para detectar a la proteína.

4. Formación de complejos proteína-ligantes estudiados mediante técnicas electroquímicas

Múltiples técnicas han sido utilizadas para estudiar la interacción entre la ASH/ASB y moléculas pequeñas, donde las principales son técnicas de tipo espectroscópico. Son varias las razones por las cuales las técnicas electroquímicas no son la elección predilecta para la investigación de estos sistemas. Una de ellas es el inconveniente de que tanto la albumina sérica humana, como muchas otras moléculas biológicas, en el dominio de actividad de soluciones acuosas no son especies electroactivas y no pueden ser medidas directamente. En su lugar, para poder registrar o seguir su comportamiento, se debe emplear una sonda redox como lo es $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ o algún otro compuesto electroactivo como ligantes, fármacos, colorantes, etc. También se puede hacer uso de un biosensor diseñado específicamente para detectar y/o cuantificar dicha proteína. Además, durante mucho tiempo las técnicas electroquímicas fueron empleadas para otro tipo de sistemas. Sin duda son un área de oportunidad muy grande ya que, en comparación con otras técnicas, son rápidas, de bajo costo y en donde además se emplea una pequeña cantidad de material. Esto último es de una gran importancia en el caso de materiales y/o sustancias de origen biológico, cuya síntesis y purificación es además de compleja, muy cara.

Es muy común que las técnicas electroquímicas sean usadas para confirmar información obtenida mediante otras técnicas de análisis, como lo es la espectroscopía UV-Vis o la espectroscopia de fluorescencia. Lo útil de esta técnica es que se puede estudiar el sistema a condiciones de pH cercanas a las fisiológicas.

En este trabajo se ha decidido presentar la información recopilada siguiendo un orden cronológico. Esta forma de presentar la información nos da la oportunidad de conocer cómo es que se ha venido desarrollando el empleo de esta técnica en el estudio de la formación de complejos del tipo proteína-ligante.

En esta revisión bibliográfica, el trabajo más antiguo es de 1990, presentado por Shearan y colaboradores. Realizaron un estudio de la interacción entre un fármaco empleado en el

tratamiento del cáncer, cisplatino, y la albumina sérica humana mediante voltamperometría de adsorción (Shearan, 1990). Mencionan que el uso de técnicas electroquímicas para estudiar las interacciones fármaco-albumina no era algo nuevo, pero usar voltamperometría y específicamente, voltamperometría de adsorción, era un nuevo enfoque para la época. También, presentan que la albumina sérica humana se adsorbe en la superficie del electrodo de gota de mercurio en un intervalo de potencial de -0.9 a 0 V a un valor de pH de 7.4. Desafortunadamente no determinaron la constante de unión ni la estequiometría para el complejo, sólo reportan un coeficiente fraccional que mencionan es una medida de la formación del complejo.

Se sabe que un gran número de moléculas se puede unir a la albumina sérica humana y distintos trabajos han aprovechado esta característica para desarrollar electrodos modificados para determinar esta proteína. Los electrodos no sólo son metálicos, también se han empleado electrodos de polímeros electroactivos conductores que presentan la ventaja de que se pueden modificar con distintos contraiones, lo que le confiere la capacidad a un mismo polímero de poder detectar distintos analitos. En el trabajo presentado por Sargent en el año de 1999, presentan un electrodo de polipirrol modificado con un anticuerpo de albumina sérica humana para detectar un antígeno (ASH) (Sargent, 1999). Emplearon voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia para dilucidar la unión entre el anticuerpo y el antígeno. La modificación en los voltamperogramas en función de la concentración de ASH en disolución, indicaron a los autores que se estaba dando la unión entre el anticuerpo y el antígeno, como se puede observar en la **figura 13**.

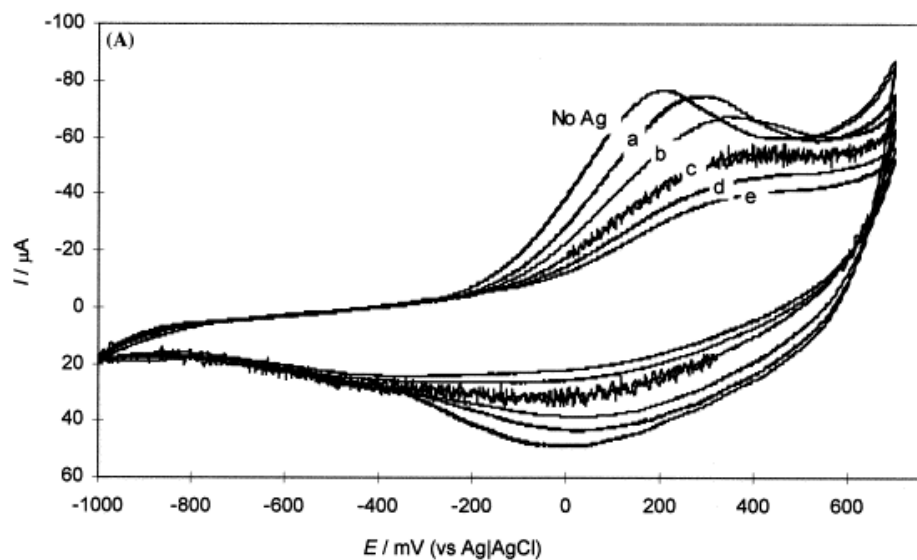


Figura 13. Voltamperogramas cíclicos a diferentes concentraciones de antígeno; a) $0.025 \mu\text{g mL}^{-1}$, b) $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$, c) $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$, d) $0.24 \mu\text{g mL}^{-1}$, e) $0.48 \mu\text{g mL}^{-1}$. Al incrementar la concentración del antígeno, la curva del voltamperograma se modifica. Tomado de (Sargent, 1999).

Con los datos obtenidos por los autores no les fue posible evaluar la constante de unión o la estequiometría del complejo anticuerpo-antígeno, sólo obtienen información cualitativa de la unión.

Se han desarrollado compuestos con una afinidad reducida por la albumina sérica humana debido a que pueden ser fármacos potentes con niveles de dosificación relativamente más bajos y con tolerancia *in vivo* mejorada, como se realizó en el trabajo de Mohani y colaboradores en el año 2004, donde se diseñaron nuevos complejos metálicos derivados de oxamidadiiminodiacético y trietilentetramina. Se puede estudiar la unión de la ASH con un complejo metálico por voltamperometría cíclica analizando el comportamiento redox del complejo y comparándolo con el comportamiento oxidación-reducción del complejo en presencia de la ASH. A partir de los resultados experimentales, mostrados en la **figura 14**, los autores infieren que, si bajo las mismas condiciones de trabajo se observa una variación en los valores de E_p , este se debe a que se forma un complejo ASH-complejo metálico.

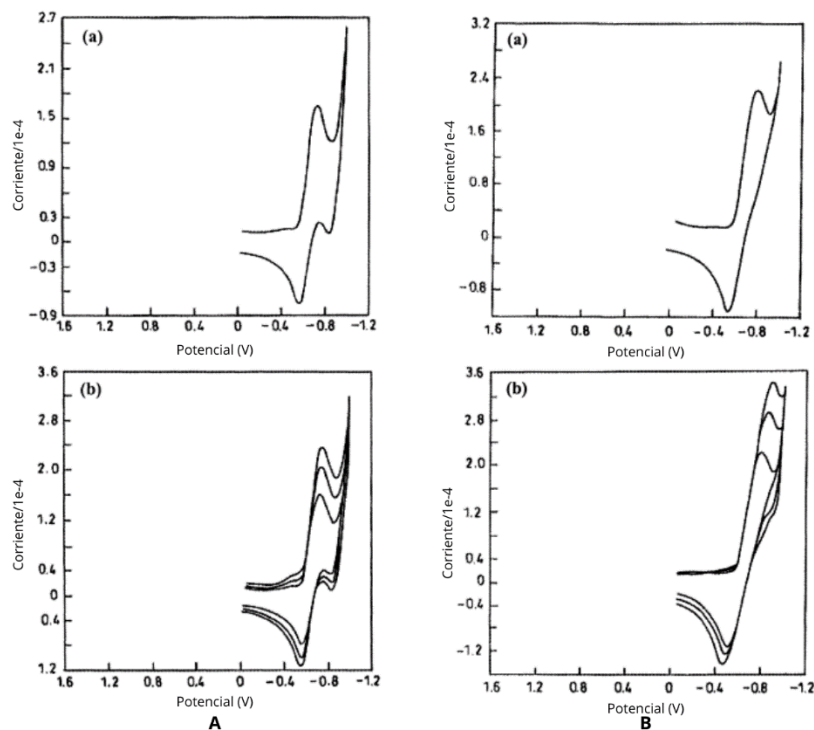


Figura 14. Voltamperogramas cíclicos A) a) del complejo metálico, b) a distintas velocidades de barrido: 0.1, 0.2 y 0.3 Vs⁻¹; B) a) del complejo metálico unido a ASH, b) el complejo metálico unido a ASH a diferentes velocidades de barrido: 0.1, 0.2 y 0.3 Vs⁻¹. Modificado y tomado de (Mohani, 2004). Utilizan la convención estadounidense para presentar los datos.

En su trabajo también exploraron el efecto del pH sobre la formación del complejo. Observaron que a valores bajos de pH se favorece de alguna manera la formación del complejo, ya que disminuye el valor del potencial de pico. Pero si al mismo tiempo los cambios en el potencial formal de uno y otro no son significativos, se infiere que el complejo exhibe una unión reducida a ASH (Mohani, 2004). La información obtenida a partir de los experimentos de voltamperometría cíclica fue contrastada con la obtenida mediante los experimentos de espectroscopía UV-Visible, confirmando su hipótesis de la formación del complejo ASH-complejo metálico. Desafortunadamente los autores no llevaron a cabo un análisis más profundo de sus datos experimentales para poder determinar una constante de unión o la estequiometría para el sistema.

Para el año 2004 eran pocos los trabajos donde se reporta el uso de electrodos modificados para el estudio de la unión de moléculas pequeñas y la albumina sérica. Wu y colaboradores

publicaron un trabajo en el año de 2004 donde describen un método de preparación para un electrodo de carbono vitreo modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple, con el cual estudiaron la interacción entre la azitromicina y la albumina sérica bovina (Wu, 2004), ya que el electrodo de carbono vitreo no es lo suficientemente sensible para detectar la interacción entre estas dos especies. La unión de la azitromicina con ASB la demostraron mediante espectrometría y los parámetros de unión (el número de unión y la constante de unión) fueron determinados por voltamperometría. De los resultados obtenidos por voltamperometría, estos parámetros se determinaron de la siguiente manera:

La azitromicina [L] y la ASB forman un solo complejo



La constante de equilibrio β del sistema anterior queda de la siguiente manera:

$$\beta = \frac{ASB[L]_m}{[ASB][L]^m} \quad (11)$$

La concentración total de ASB está dada por:

$$[ASB] + [ASB[L]_m] = C_{ASB} \quad (12)$$

De acuerdo con la ecuación de Ilkovic para la concentración total de ASB, donde k es una constante de contiene los parámetros asociados a la ecuación de Ilkovic:

$$\Delta i_{m\acute{a}x} = k C_{ASB} \quad (13)$$

La ecuación de Ilkovic para la especie complejada queda de la siguiente forma:

$$\Delta i = k(ASB[L]_m) \quad (14)$$

Al realizar la diferencia entre la **ecuación 13 y 14** se obtiene la siguiente ecuación:

$$\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i = k(C_{ASB} - ASB[L]_m) = k[ASB] \quad (15)$$

Introduciendo las **ecuaciones (11), (13) y (15)**, y sacando su logaritmo, la siguiente ecuación se puede obtener:

$$\log[\Delta i / (\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i)] = \log \beta_s + m \log[L] \quad (16)$$

Donde Δi es el cambio de corriente pico de la misma concentración de azitromicina en ausencia y presencia de ASB, $\Delta i_{m\acute{a}x}$ es el cambio de corriente pico máximo. C_{ASB} , $ASB[L]_m$, $[ASB]$ se refieren a la concentración total, ligada al fármaco y libre de proteína en disolución respectivamente.

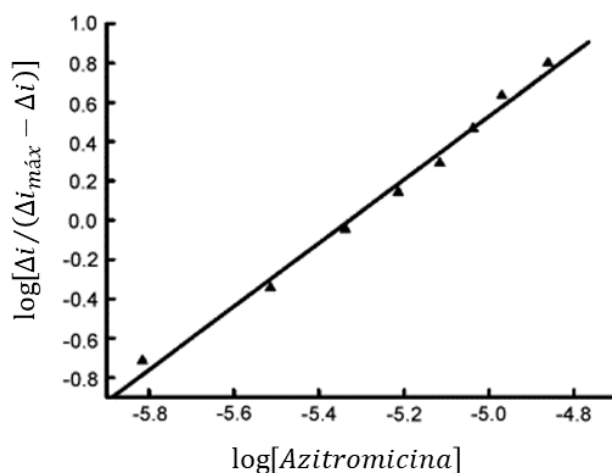


Figura 15. Gráfico $\log(\Delta i/(\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i))$ vs $\log[L]$. Tomado y modificado de (Wu, 2004).

La pendiente y la ordenada al origen de la gráfica $\log(\Delta i/(\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i))$ vs $\log[L]$ (**Figura 15**), a concentración constante de ASB, pH constante y concentración variable de azitromicina, dio como resultado $m \sim 2$ y $\beta = 4.36 \times 10^8$. Lo que indica la unión de azitromicina a ASB forma un complejo 2:1 respectivamente. Concluyen diciendo que esta información es de relevancia para ellos porque es útil para comprender la farmacocinética de la azitromicina.

En el año 2005, Sun y colaboradores publicaron un trabajo donde estudiaron la unión del amaranto (colorante azoico) con la ASH. Trabajaron a un valor de pH de 3.0 en un amortiguador Britton-Robinson, que es una mezcla de ácido bórico, ácido fosfórico y ácido acético; frente a un electrodo de mercurio. Empleando voltamperometría cíclica encontraron que el amaranto tiene un pico de reducción y que se adsorbía sobre la superficie del electrodo. Como solo se observó el pico de reducción sin la presencia del pico asociado a la oxidación, el tipo de reacción es irreversible. En presencia de ASH, la corriente

máxima disminuyó considerablemente, mientras que el potencial máximo no cambio ni aparecieron nuevos picos, **Figura 16**.

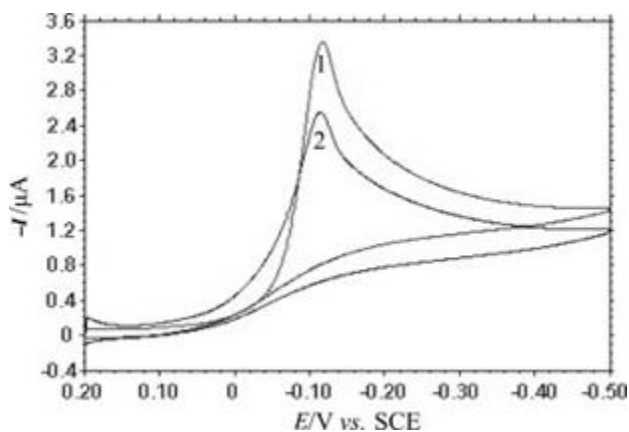


Figura 16. Voltamperogramas cíclicos de amaranto en 1) ausencia y 2) presencia de ASH. Tomado de (Sun, 2005). Utilizan la convención estadounidense para presentar los datos.

Debido al fuerte comportamiento de adsorción y al proceso irreversible de la reacción de reducción del amaranto, emplearon la ecuación de Laviron (**Ec. 17**) para estudiar los parámetros electroquímicos.

$$E_p = E^0 + RT/(\alpha nF) [\ln[(RTk_s)/(\alpha nF)] - \ln v] \quad (17)$$

Ellos calcularon los parámetros electroquímicos siguientes: coeficiente de transferencia de electrones (αn), la constante de velocidad (k_s) y el potencial formal (E^0) (**Tabla 2**) para el amaranto en ausencia y presencia de ASH, encontrando que dichos parámetros no muestran cambios significativos.

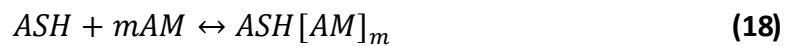
Parámetro	Amaranto	Amaranto + ASH
E^0 (V)	-0.093	-0.096
αn	1.89	1.96
k_s (s^{-1})	0.83	0.85

Tabla 2. Parámetros electroquímicos del amaranto en ausencia y presencia de ASH.

Previo a realizar las pruebas electroquímicas, los autores hicieron un análisis espectroscópico UV-Vis donde se confirmó la unión entre el amaranto y la ASH. Así que, para explicar que los parámetros electroquímicos no cambiaron, pero el complejo si se formó, presentaron tres explicaciones. Primera, la adsorción competitiva entre el amaranto y la ASH en el electrodo de mercurio. Segunda, la formación de un compuesto electroquímicamente activo y cambios de los parámetros electroquímicos. Tercera, la formación de un complejo electroinactivo sin cambios en los parámetros electroquímicos. Descartaron las dos primeras opciones porque, en otros trabajos con moléculas similares se reportó que la adsorción competitiva apenas y se presenta, y porque los parámetros electroquímicos no cambiaron.

Ellos explican que el amaranto interactúa con ASH por atracción electrostática y otras fuerzas de tipo débil, formando un complejo electroinactivo que no pudo reducirse en el electrodo de Hg. Esto debido a que en el valor de pH que trabajaron, la lisina, la arginina y otros residuos de aminoácidos en la ASH tienen carga positiva, mientras que las especies de amaranto (grupos sulfonilo e hidroxilo) tienen carga negativa. En presencia de ASH, la concentración de equilibrio de amaranto libre en solución disminuyó, lo que resultó en la disminución del pico de corriente.

Sun y colaboradores mencionan que la estequiometría y la constante de unión para el complejo amaranto-ASH se puede calcular en función de los cambios de la corriente pico y asumen que estas especies forman un solo complejo.



Donde la constante de equilibrio queda de la siguiente manera

$$\beta = \frac{ASH[AM]_m}{[ASH][AM]^m} \quad (19)$$

Y de acuerdo con la ecuación de Ilkovic del proceso irreversible:

$$\Delta i_{m\acute{a}x} = kC_{ASH} \quad (20)$$

$$\Delta i = k[ASH[AM]_m] \quad (21)$$

$$\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i = k[ASH] \quad (22)$$

Introduciendo las ecuaciones **19**, **20** y **22** da:

$$\frac{1}{\Delta i} = \frac{1}{\Delta i_{m\acute{a}x}} + \left(\frac{1}{\beta \Delta i_{m\acute{a}x}} \right) \left(\frac{1}{[AM]^m} \right) \quad (23)$$

Donde Δi es la diferencia de la corriente pico con y sin ASH y $\Delta i_{m\acute{a}x}$ corresponde al valor obtenido cuando la concentración de amaranto es muy superior a la de la ASH. C_{ASH} , $[ASH]$, $ASH[AM]_m$ corresponden a la concentración total, libre y unida de la proteína en solución, respetivamente, y la k es la constante de la ecuación de Ilkovic.

Le sacan el logaritmo a la **ecuación 23** y de la relación lineal $\log(\Delta i / (\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i))$ vs $\log[amaranto]$ de los resultados de polarografía de barrido lineal obtuvieron que $m = 2.3$ y $\beta = 8.34 \times 10^{11}$, lo que indicó que se formó un complejo estable 1:2 de $ASH[amaranto]_2$.

Para el año 2006 Sun y colaboradores publicaron un nuevo trabajo. Ellos realizaron una investigación electroquímica sobre la interacción entre otro colorante azoico (ácido azul de cromo K) y ASH, utilizando un electrodo de mercurio (Sun, W.; Han, J., 2006). El voltamperograma cíclico que registraron del ácido azul de cromo K (AACK) presentó un pico de reducción en las condiciones de trabajo, amortiguador Britton-Robinson con un valor de pH de 3.0 frente al electrodo de mercurio, lo que determinaron como un comportamiento electroquímico irreversible, además de adsorberse sobre el electrodo. Cuando el AACK se encuentra en presencia de ASH la corriente máxima reductora de AACK disminuyó considerablemente sin un cambio en el potencial máximo y no aparecieron picos nuevos (**Figura 17**).

Sun y colaboradores, investigaron el mecanismo de reacción de AACK-ASH calculando y comparando la variación de los parámetros electroquímicos de AACK en ausencia y presencia de ASH. Para esto, al igual que en el trabajo previo de Sun publicado en el 2005, hicieron uso de la **ecuación 17**.

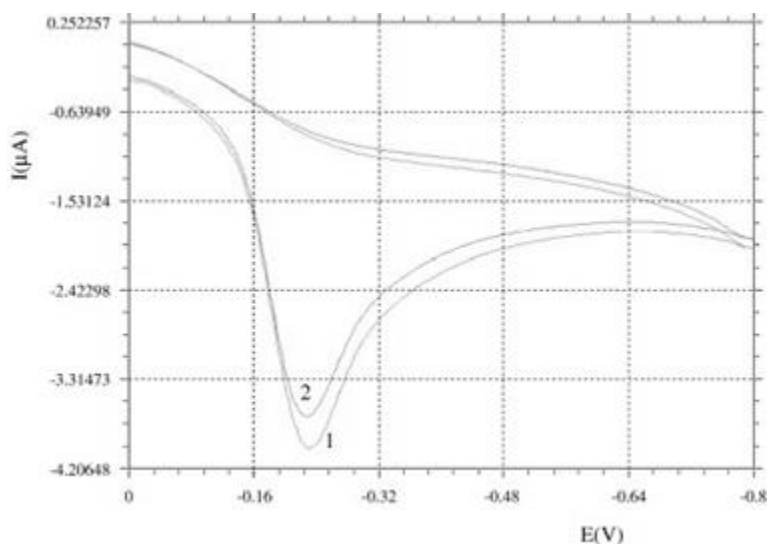


Figura 17. Voltamperogramas cíclicos de AACK en 1) ausencia y 2) presencia de ASH. Tomado de (Sun, W.; Han, J., 2006). Utilizan la convención estadounidense para presentar los datos.

Encontraron que los parámetros electroquímicos no variaban considerablemente, **tabla 3**, así que llegaron a la conclusión de que la interacción de AACK con ASH formó un complejo electroinactivo. En presencia de ASH, la concentración de equilibrio de AACK disminuyó, lo que resultó en la disminución de la corriente máxima.

Parámetros	AACK	AACK + ASH
E^0 (V)	-0.198	-0.195
αn	1.89	1.96
k_s (s^{-1})	0.83	0.85

Tabla 3. Parámetros electroquímicos del AACK en ausencia y presencia de ASH.

Asumieron la formación de un solo complejo y utilizaron las **ecuaciones 19-23** para este sistema y de la relación lineal $\log(\Delta i / (\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i))$ vs $\log[AACK]$ de los resultados obtenidos por polarografía de barrido lineal obtuvieron que $m = 2$ y $\beta = 1.29 \times 10^8$, lo que indicó que se formó un complejo estable 1:2 de $ASH[AACK]_2$.

En otro trabajo publicado por Sun y sus colaboradores en el mismo año, estudiaron la interacción de la torina, que es un colorante azoico, con la ASH en solución mediante voltamperometría cíclica utilizando un electrodo de mercurio (Sun, W.; Jiao, K., 2006).

Como en los trabajos anteriores, estudiaron el comportamiento del colorante en presencia y ausencia de la ASH, **figura 18**, trabajando a un valor de pH de 3.0 en una solución amortiguadora Britton-Robinson. Como resultado encontraron que la corriente pico reductora se modifica al adicionar ASH, pero el potencial de pico no tuvo una modificación aparente.

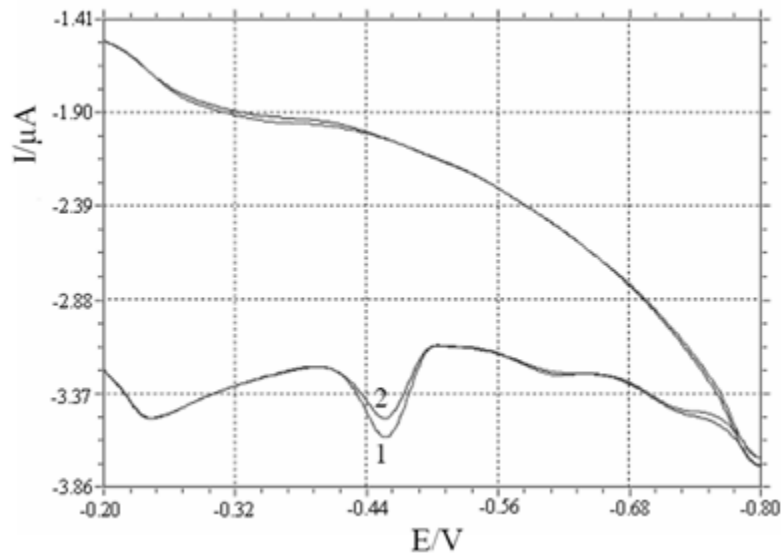


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos de torina en ausencia (1) y presencia (2) de ASH. Tomado de (Sun, W.; Jiao, K., 2006). Utilizan la convención estadounidense para presentar los datos.

En este trabajo también estudiaron los parámetros electroquímicos del colorante solo y en presencia de ASH. Utilizaron la ecuación de Laviron, **Ec. 17**, debido al comportamiento de adsorción y al proceso irreversible de reducción de torina frente al electrodo de mercurio. Encontraron que no hubo cambios significativos y, al igual que en los dos trabajos anteriores, concluyeron que el colorante azoico formaba un complejo electroinactivo en presencia de la proteína, la concentración de equilibrio de torina libre disminuyó lo que generó la disminución de la corriente máxima.

Para obtener la constante de unión y la estequiometría del complejo AHS-torina utilizaron las ecuaciones 20-24 y dedujeron $\beta = 1.15 \times 10^9$ y la formación de un complejo 2:3 $[\text{ASH}]_2[\text{torina}]_3$.

En 2007, Boghaei y colaboradores publicaron un trabajo donde estudiaron la interacción de un complejo de cobre de una base diimino tetradentada de Schiff ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}$) con ASB a un valor de pH de 7, utilizando voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial (Boghaei, 2007).

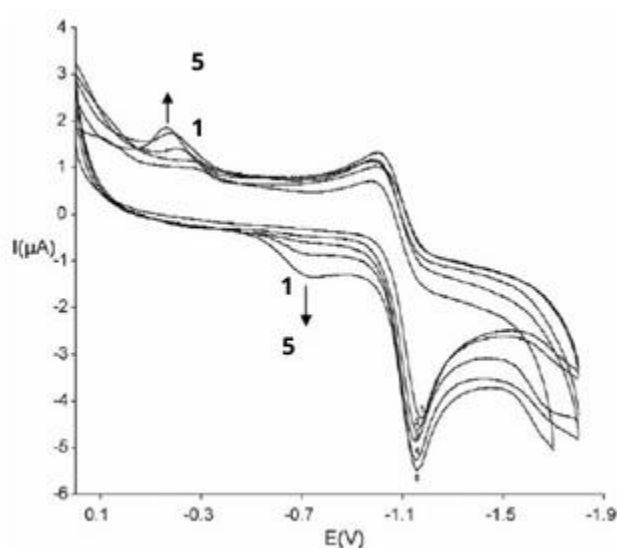


Figura 19. Voltamperogramas cíclicos de $\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}$ en ausencia y presencia de distintas concentraciones de ASB (1 – menor concentración, 5 – mayor concentración). Tomado de (Boghaei, 2007). Utilizan la convención estadounidense para presentar los datos.

El complejo metálico de la base de Schiff presentó un pico anódico y catódico atribuidos al par redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$. En presencia de ASB hay una disminución en la corriente máxima de la oxidación con un desplazamiento positivo del potencial máximo y la aparición de un nuevo par redox, señalado con flechas en la **figura 19**. Los autores explican que esta disminución en la corriente máxima de oxidación y el desplazamiento en el potencial máximo se debe a que la concentración de equilibrio del complejo $\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}$ disminuye. También mencionan que la formación de un complejo entre $\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}$ y ASB cambia la geometría del Cu^{II} , generando la aparición de un nuevo pico de corriente anódico y catódico que aumentan con el aumento en la concentración de ASB.

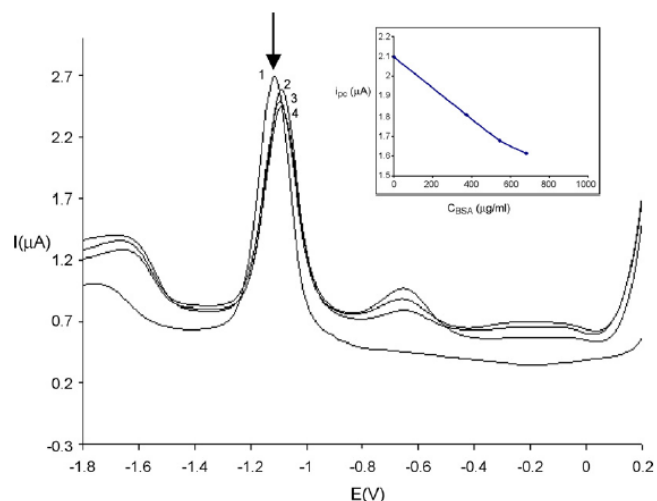


Figura 20. Voltamperogramas de pulso diferencial de mezclas que contienen concentración constante de Cu^{II} y diferentes concentraciones de BSA (1 – menor concentración, 5 – mayor concentración). Tomado de (Boghaei, 2007).

Boghaei y colaboradores, relacionaron linealmente las disminuciones en la corriente máxima con la concentración de ASB, **Figura 20**, Determinaron los valores de $E_{1/2}$ a partir del potencial máximo de VPD mediante la **ecuación 24**.

$$E_{1/2} = E_p + \frac{\Delta E}{2} \quad (24)$$

VC				VPD		
[ASB] (mol dm^{-3})	E_{pc} (V)	E_{pa} (V)	β	[ASB] (mol dm^{-3})	$E_{1/2}$ (V)	β
0	-1.183	-1.034	2.08×10^4	0	-1.164	1.84×10^4
10^{-6}	-1.156	-1.000		5.5×10^{-6}	-1.136	
2.5×10^{-6}	-1.149	-1.000		8×10^{-6}	-1.147	
4×10^{-6}	-1.156	-1.000		10^{-5}	-1.140	
6×10^{-6}	-1.156	-0.993				

Tabla 4. Resultados de VC y VPD y la constante de unión calculada para ambas técnicas.

Donde $E_{1/2}$ es el equivalente del promedio de E_{pc} y E_{pa} en experimentos de VC y ΔE es la amplitud del pulso. Mencionan que los valores que obtuvieron de $E_{1/2}$ concordaban con los que determinaron a partir de sus experimentos de VC. En la **tabla 4** se encuentran recopilados los resultados voltamperometricos de ambas técnicas.

Los autores utilizan la disminución de la corriente máxima del complejo resultante de la adición de ASB a $Cu^{II}L$ para determinar la constante de unión, asumiendo que estas especies forman un solo complejo. Para lo cual hacen uso de la siguiente ecuación:

$$\log\left(\frac{1}{[ASB]}\right) = \log(K) + \log\left(\frac{i_{HG}}{i_G - i_{HG}}\right) \quad (25)$$

Donde K es la constante de unión aparente, i_G e i_{HG} son la corriente pico de la base de Schiff libre y HG el aducto $Cu^{II}L$ -ASB. Los autores mencionan que una gráfica lineal $\log(1/[ASB])$ vs $\log(i_{HG}/i_G - i_{HG})$ es característica de un aducto 1:1. Los autores hicieron un promedio entre los dos valores que obtuvieron para la constante de unión, reportando un valor de 1.96×10^4 .

Hasta aquí, se han revisado trabajos donde la interacción entre la albumina sérica y moléculas pequeñas da como resultado la formación de un complejo, aunque no siempre resulta así, como lo fue en el trabajo publicado por Ding en 2007. Ding y colaboradores utilizaron voltamperometría cíclica para estudiar el cambio en la conformación de la albumina sérica bovina en presencia del tensoactivo dodecil sulfato de sodio (DSS), un tensoactivo aniónico (Ding, 2007).

En dicho trabajo, no utilizan una sonda redox y no presentan un voltamperograma cíclico del DSS para saber si es una especie electroactiva, sólo presentan la **Figura 21**, que son los voltamperogramas cíclicos de la ASB en presencia del DSS, a distintas concentraciones del tensoactivo. Mencionan que la curva 1 son los picos de oxidación y reducción asociados a la ASB. Cuando se adiciona 5×10^{-4} M del tensoactivo, curva 2, las corrientes pico aumentan y los potenciales pico se mantienen. Cuando adicionan 6×10^{-3} M del tensoactivo, curva 3, las corrientes de pico disminuyen mientras que los potenciales se mantienen casi constantes.

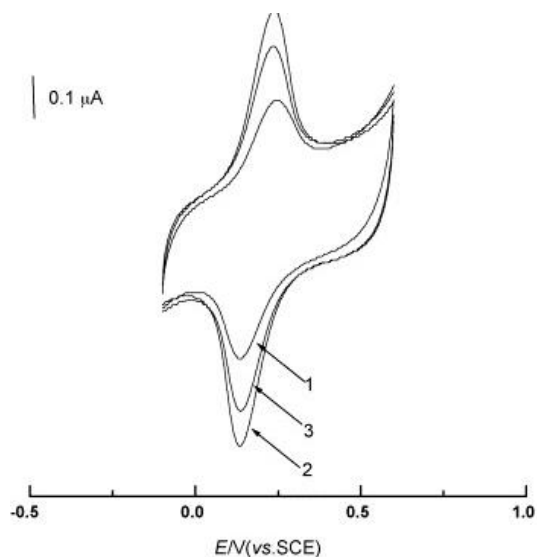


Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de ASB en presencia de DSS a diferentes concentraciones del tensoactivo. DSS (mol L^{-1} : 1) 0, 2) 5.0×10^{-4} , 3) 6.0×10^{-3} , a la misma velocidad de exploración (180 mV s^{-1}). Tomado de (Ding, 2007).

Los autores asocian los potenciales pico de la **figura 21** a la ASB, no mencionan la formación de un complejo entre la ASB y DSS. Al contrario, mencionan que el carácter redox de ASB se debe a los puentes disulfuro de su estructura. Esto llama la atención, porque en trabajos anteriormente revisados, se menciona que la ASB no es una especie electroactiva.

Los autores presentan la **figura 22** para explicar la interacción que se da entre la proteína y el tensoactivo. Mencionan que a concentraciones más bajas que el punto a, la corriente pico aumenta rápidamente y alcanza un máximo en el punto a. Después, disminuye abruptamente hasta que la concentración llega al punto b. El cambio en la disminución en la corriente pico se vuelve lento hasta llegar al punto c y a mayores concentraciones desde este punto, ya no hay un cambio significativo en la corriente pico.

Ding y colaboradores indican que la corriente pico catódica está estrechamente relacionada con los cambios conformacionales de la ASB. El aumento en la corriente pico antes del punto a, explican los autores, se debe a que, a bajas concentraciones de tensoactivo, la parte aniónica del DSS se une a un grupo catiónico en la ASB por atracción electrostática, mientras que la parte hidrofóbica del DSS se une a una sección hidrofóbica en la proteína por atracción hidrofóbica. Esto hace que la estructura de la ASB se despliegue ligeramente,

lo que reduce el impedimento estérico y mejora la transferencia de electrones de los enlaces disulfuro hacia el electrodo. Obteniendo un aumento rápido en la corriente pico catódica hasta alcanzar un máximo (punto a).

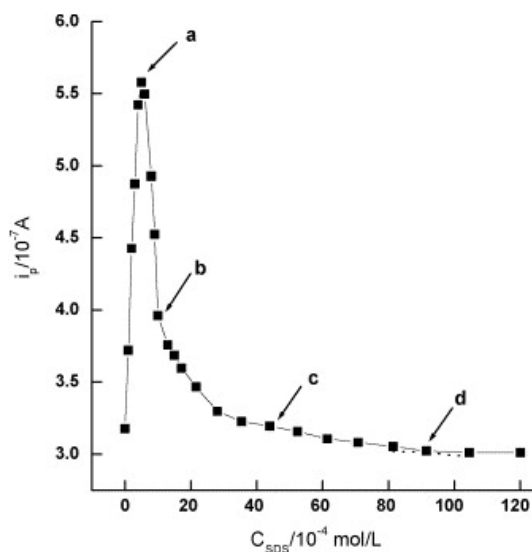


Figura 22. Efecto de DSS en la corriente máxima catódica de ASB. Tomado de (Ding, 2007).

Conforme aumenta la concentración de DSS, aumenta la unión superficial de este alrededor de la ASB, lo que va dificultando la transferencia de electrones de ASB hacia el electrodo, dando como resultado una disminución en la corriente pico catódica. Después del punto b, comienza a haber una repulsión electrostática entre la parte aniónica de las moléculas de DSS presentes provocando un despliegue parcial de la proteína y en este punto, la parte hidrofóbica del DSS puede penetrar la estructura globular para interactuar con el esqueleto hidrofóbico de la proteína. Este proceso conduce a la exposición gradual de los enlaces disulfuro, lo que facilita el proceso redox de la ABS y, por lo tanto, la disminución de la corriente de pico catódica se vuelve lenta. Después del punto c, la unión del DSS a la ASB aumenta considerablemente y se comienzan a formar agregados similares a micelas en la superficie de la proteína, lo que provoca su desnaturalización. Los enlaces disulfuros se encuentran rodeados por los grupos similares a micelas, lo que afecta la tasa de transferencia de electrones, generando que el cambio en la corriente pico catódica se vuelva aún más lenta. A partir del punto d, las moléculas de DSS adsorbidas en la superficie

de la ASB se saturan y se forman micelas libres, ya no hay una afectación considerable a la corriente pico catódica. Los autores concluyen que la voltamperometría cíclica es una herramienta poderosa para mostrar los cambios conformacionales inducidos por un tensoactivo.

Es Heli y colaboradores, quienes presentan en 2007 un estudio del comportamiento de adsorción de la ASH sobre el electrodo de carbono vítreo empleando voltamperometría cíclica (Heli, 2007). En la **figura 23** se puede observar que cuando se expone al electrodo de carbono vítreo a una solución con ASH, hay una disminución en la corriente máxima y un aumento en la separación del potencial máximo con el paso del tiempo. Los autores asociaron esos resultados con la formación de una capa continua de ASH que se formó sobre la superficie del electrodo, que dificulta la transferencia de electrones entre la sonda redox y el electrodo.

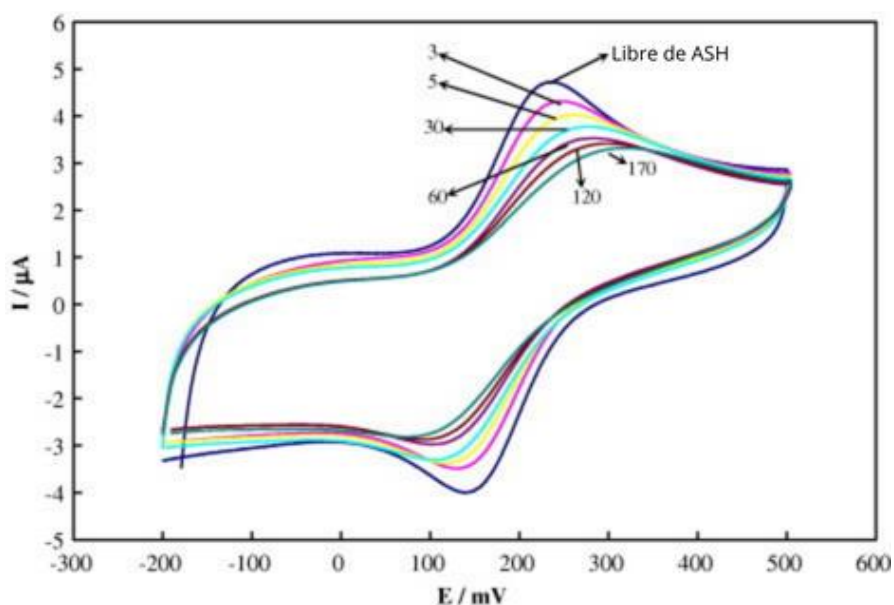


Figura 23. Voltamperogramas cíclicos consecutivos de la ASH, con ferricianuro de potasio como sonda redox, utilizando una tasa de barrido de potencial de 50 mV s^{-1} . Los números en el voltamperograma representan los ciclos. Tomado de (Heli, 2007).

Estudiaron también, la probabilidad de desorción de la ASH adsorbida en la superficie del electrodo de carbono vítreo, encontrando que la inmovilización de la ASH en la superficie es irreversible. De este modo, propusieron un método para estudiar las interacciones ASH-

ligando y explorar el modo de unión del ligando a las macromoléculas biológicas enfocado en las interacciones hidrofóbicas y no hidrofóbicas.

Construyeron un electrodo de carbono vitreo modificado con ASH. Compararon la interacción del electrodo desnudo y el modificado con el ácido 8-analino-1-naftalenosulfónico (ANS), **figura 24**, encontrando que el potencial de oxidación máximo cambia en dirección positiva cuando se emplea el electrodo modificado. Este cambio es un indicador de interacciones entre las moléculas.

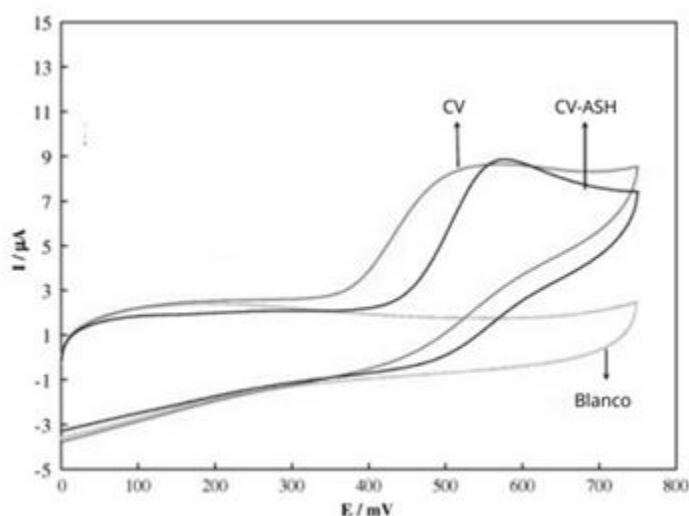


Figura 24. Voltamperogramas cíclicos en amortiguado fosfato salino o sus siglas en inglés PBS que contiene ANS frente al electrodo de carbono vitreo (CV) y carbono vitreo modificado (CV-ASH), y voltamperograma en blanco. Tomada y modificada de (Heli, 2007).

Pese a que los autores estudian la unión de la ASH con otras especies para detectar el tipo de interacciones que tienen, no presentan ningún dato sobre constantes de unión ni estequiometría.

Dong y colaboradores presentaron en 2008 un trabajo enfocado en la interacción entre claritromicina y ASB utilizando voltamperometría de barrido lineal en soluciones amortiguadoras con valores de pH ácido y fisiológico (Dong, 2008). La claritromicina (CAM)

es una especie electroactiva que presentó un pico de reducción (P_1) en el rango de pH 4.5-5.7 y dos picos de reducción (P_2 y P_3) en el rango 6.0-8.0, frente al electrodo de mercurio.

Al adicionar ASB a la solución de CAM la corriente pico disminuye con un movimiento positivo en el potencial de pico, **figura 25**. La aparición de un nuevo pico de reducción indica la formación de una nueva especie resultante de la interacción CAM-ASB. Los autores encontraron que el proceso electroquímico estaba controlado por adsorción además de ser un proceso irreversible.

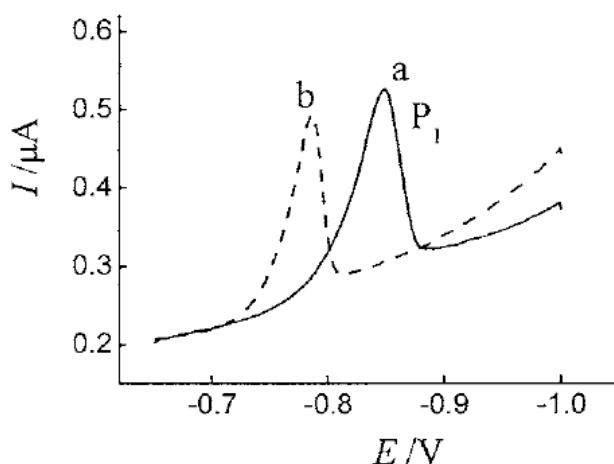


Figura 25. Voltamperogramas de barrido lineal de a) CAM y b) CAM-ASB, a un valor de pH 4.5. Tomado de (Dong, 2008).

CAM a un valor de pH de 7.4 presenta dos picos de reducción. Los autores indican que P_2 es un pico de reducción irreversible y P_3 es un pico de hidrogeno catalítico. Al estudiar la interacción de CAM con ASB, los autores encontraron que la corriente pico de la onda P_2 disminuyó en presencia de ASB, pero el potencial pico no cambio ni apareció un nuevo pico. Lo que les indicó a los autores que se formaba un complejo CAM-ASB que era no electroactivo, **figura 26.1**. Reportan una constante de unión de 1.51×10^{12} y una estequiometría de 3:1 CAM-ASB.

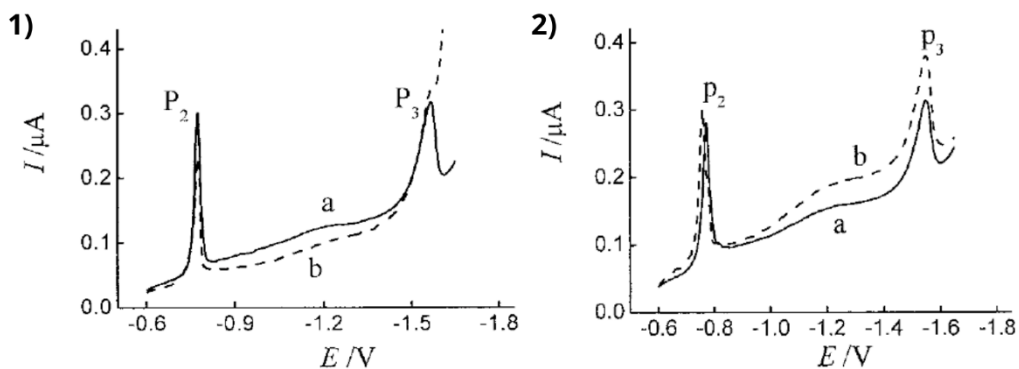


Figura 26. Voltamperogramas de barrido lineal de a) CAM y b) CAM-ASB. Tomado y modificado de (Dong, 2008).

En el caso de la onda P_3 , al adicionar ASB se registra un aumento en la corriente pico sin un cambio significativo en el valor del potencial de pico, **figura 26.2**. Los autores mencionan que los resultados indican que hubo interacción entre el grupo que contiene nitrógeno en CAM y ASB, y la formación de un complejo electroquímicamente no activo. Reportan una constante de unión de 4.53×10^5 y una estequiometría de 1:1.

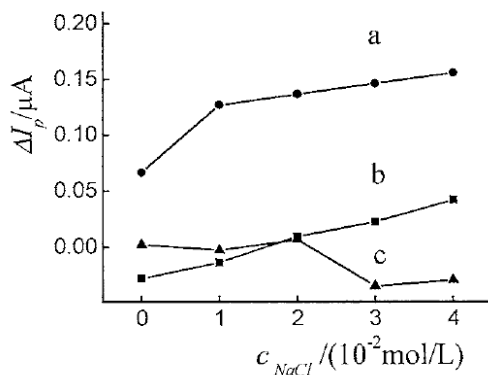


Figura 27. Efecto de la fuerza iónica en la interacción de CAM-ASB, utilizando NaCl como electrolito; a) pH 7.4, 2×10^{-5} M CAM, 2×10^{-7} M ASB, b) pH 7.4, 2×10^{-5} M CAM, 2×10^{-8} M ASB, c) pH 4.5, 1×10^{-5} M CAM, 2×10^{-7} M ASB. Tomado de (Dong, 2008).

Los autores presentan un estudio sobre el efecto de la fuerza iónica en la interacción de complejo CAM-ASB, **figura 27**. El cambio en la concentración de NaCl afecta la Δi_p . Observamos que el Δi_p de la onda P_1 (curva c) disminuye cuando la concentración de NaCl es mayor que 2×10^{-2} M en medios ácidos. Explican que, cuando se trabaja a un pH menor

al punto isoeléctrico de ASB ($pI = 4.8$), la proteína se encuentra cargada positivamente, mientras que CAM se encuentra cargada negativamente, por lo que se pueden unir mediante atracciones electrostáticas. Así que, la atracción electrostática se vio favorecida a bajas concentraciones de NaCl confirmando que la interacción de CAM-ASB se debe a las fuerzas electrostáticas bajo estas condiciones. Algo distinto paso para las ondas P_2 y P_3 , el Δi_p aumento con el aumento de la concentración NaCl cuando trabajaron a pH fisiológico. Los autores indican que la presencia de la sal destruyó la estructura de la proteína, exponiendo el grupo hidrofóbico de la ASB. Así que, la interacción CAM-ASB se debe a fuerzas hidrofóbicas.

En el año 2009, Feliciano y colaboradores publicaron un artículo donde estudiaron, mediante voltamperometría cíclica, la unión de complejos de molibdenoceno con la albúmina sérica humana (Feliciano, 2009). En dicho trabajo, estudiaron las interacciones de unión entre la ASH y los complejos de Mo(IV): Cp_2MoCl_2 , $Cp_2Mo(\text{malonato})$ y $[Cp_2Mo(\text{maltolato})]Cl$. Lo anterior lo hicieron en condiciones fisiológicas, usaron amortiguador trisaminometano (Tris) 100 mM/NaCl 10 mM a un valor de pH de 7.4.

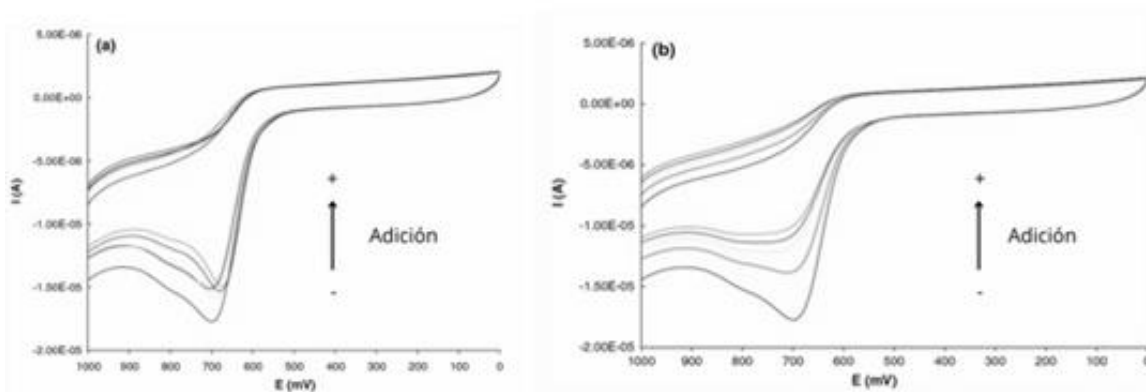


Figura 28. Voltamperogramas cíclicos de Cp_2MoCl_2 después de la adición constante de a) 250 mL de amortiguador y b) ASH 2.5×10^{-5} M, a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} . En total, realizaron 4 adiciones de cada especie. Tomado y modificado de (Feliciano, 2009). Utilizan la convención estadounidense para presentar los datos.

Los autores comparan el comportamiento electroquímico del blanco (el amortiguador) y las adiciones de ASH para estimar las interacciones de unión. Ellos tenían antecedentes donde

utilizaron el potencial de pico anódico para evaluar el porcentaje de interacción entre el metal y el ADN, así que lo aplicaron para su sistema.

En la **figura 28** se puede ver que cuando se adicionó el amortiguador no hubo un cambio significativo en el potencial de pico después de cada adición. Tras la adición de ASH a Cp_2MoCl_2 el potencial de pico se desplaza a valores más altos y para la adición final el pico de oxidación prácticamente desaparece. Los autores utilizan la **ecuación 26** para estimar la interacción basándose en los cambios en E_{pa} e I_{pa} durante el experimento. En la **tabla 5** se encuentran los resultados.

$$Interacción (\%) = \frac{E(Cp_2MoCl_2+ASH) - E(Cp_2MoCl_2+Tris/NaCl)}{E(Cp_2MoCl_2+Tris/NaCl)} \times 100 \quad (26)$$

En esta ecuación solamente cambiaron los valores de potencial que ahí se muestran con los valores de corriente de pico de las especies que ahí se indican.

Especie	Mo-ASH interacción	
	ΔE_{pa} (%)	ΔI_{pa} (%)
Cp_2MoCl_2	15	32
Cp_2Mo (malonato)	3.2	21
$[Cp_2Mo$ (maltolato)]Cl	0.9	15

Tabla 5. Porcentajes de interacción de los complejos de molibdenoceno con ASH.

Los resultados indican que la interacción máxima es del 15%. Los autores mencionan que las posibles interacciones entre molibdenoceno y ASH son principalmente hidrofóbicas, y que el 15% es significativo y sugiere que la albumina es un potencial transportador para Cp_2MoCl_2 . Llegan a la conclusión de que por ser principalmente interacciones hidrofóbicas que no generan un cambio en el entorno de coordinación, el potencial no es lo suficientemente sensible para estimar las interacciones entre estas especies.

Deciden utilizar el cambio en la corriente, ya que este se puede vincular a un cambio en la difusión como resultado de la incorporación de molibdenoceno a la parte hidrofóbica de la ASH. De esta forma, usando la **ecuación 26**, los autores encontraron un máximo de 32% de

interacción con ASH. Mientras que para $\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{malonato})$ un 21% y para $[\text{Cp}_2\text{Mo}(\text{maltolato})]\text{Cl}$ un 15%. Lo que les sugiere que el dicloruro de molibdenoceno tiene más afinidad por ASH que las otras dos especies. No reportan datos sobre constantes de unión ni estequiometría.

Feng y colaboradores en el año 2011 desarrollaron un electrodo de carbono vitreo modificado con nanopartículas de níquel recubierto de carbono (C-Ni), poli-*o*-fenilendiamina (PoPD) para estudiar la interacción de ASB con papaverina (Feng, 2011). Mediante voltamperometría cíclica los autores caracterizaron el electrodo modificado, estudiando cada modificación que le realizaron al electrodo, utilizando PoPD como sonda electroquímica. En la **figura 29** se puede ver que cuando se adiciona ASB la corriente redox disminuye, pero el potencial de pico no cambia y no hay aparición de nuevos picos, curva c. Los autores proponen que estos cambios se deben a que PoPD y ASB forman un complejo electroinactivo, indicando la inmovilización de la proteína sobre el electrodo.

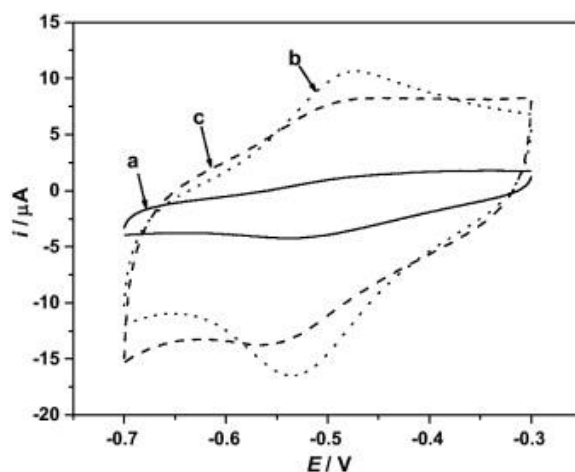


Figura 29. Voltamperogramas cíclicos de a) ECV/PoPD, b) ECV/C-Ni/PoPD y c) ECV/C-Ni/PoPD/ASB en solución amortiguadora PBS 0.1 M (pH 5). Tomado de (Feng, 2011).

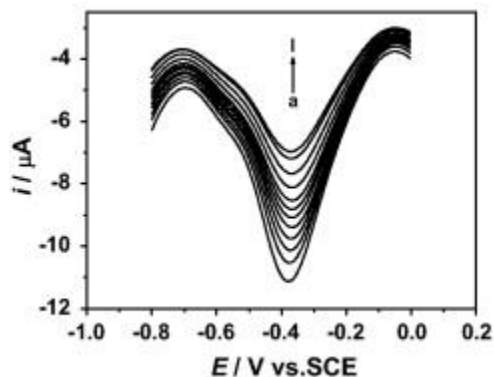


Figura 30. Voltamperograma de pulso diferencial del electrodo modificado ECV/C-Ni/PoPD/ASB a diferentes concentraciones de PAP: a) 0 mol/L – l) 4.5×10^{-5} mol/L. Tomado y modificado de (Feng, 2011).

Los autores emplearon VPD para estudiar la interacción entre ASB con la papaverina (PAP). Encuentran que cuando se adiciona PAP al sistema y mayor es su concentración, existe un decremento en la corriente pico de PoPD, **figura 30**. Explican que este decremento se debe a la unión de PAP con ASB, que formaron un complejo electroinactivo. Los autores reportan una constante de unión de 1.7×10^4 para dicho complejo.

Liang y colaboradores desarrollaron en el año de 2012 un electrodo modificado basado en albumina de suero bovino y poli-o-fenilendiamina (PoPD) para estudiar la interacción de ASB con la nicotina (Liang, 2012). Los autores modificaron un electrodo de carbono vitreo con PoPD y después lo recubrieron con ASB. Estudiaron la interacción entre la nicotina y ASB mediante voltamperometría de pulso diferencial. En la **figura 31** se encuentran los voltamperogramas que obtuvieron los autores. Se puede observar que conforme la concentración de nicotina es mayor, la corriente pico de PoPD disminuye sin un aparente cambio en el potencial pico. Los autores indican que obtuvieron una relación lineal entre la señal y la concentración, que son los recuadros que aparecen en la **figura 31**.

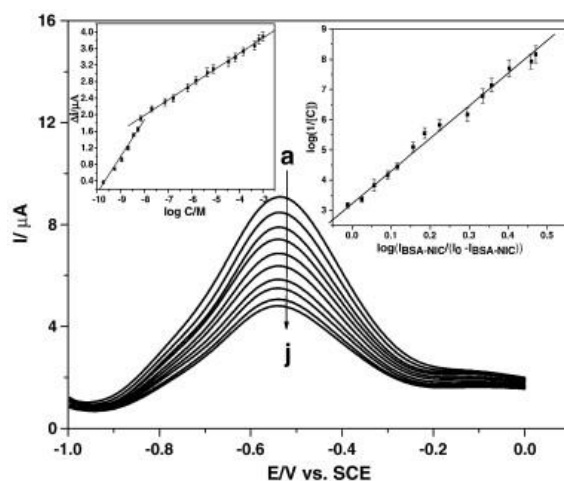


Figura 31. Voltamperogramas de pulso diferencial del electrodo modificado en solución amortiguadora PBS a pH 7 después de la adición de distintas concentraciones de nicotina, donde (a) es la de menor concentración y (j) la de mayor concentración. Tomado de (Liang, 2012).

La disminución en la corriente pico de PoPD la atribuyeron a la unión de nicotina a la ASB. Los autores determinaron la constante de unión haciendo uso de una ecuación muy similar a la **ecuación 26**, anteriormente presentada. Reportan un valor de 0.18×10^4 para el complejo ASB-nicotina.

En el año 2016, Özdemir y colaboradores realizaron un estudio de las interacciones de algunos esteroides con la albumina sérica humana frente al electrodo de gota colgante de mercurio (Özdemir, 2016). En dicho trabajo utilizaron voltamperometría de onda cuadrada y voltamperometría cíclica para estudiar el comportamiento de los esteroides en ausencia y presencia de ASH, emplearon una solución amortiguadora Britton-Robinson (BR) con un valor de pH de 7.4.

Los tres esteroides que estudiaron (ácido fusídico (AF), ouabaína (OUB) y diacetato de etinodiol (DE)) son especies electroactivas. Los autores presentan a la ASH como una especie electroactiva, en la **figura 32** se encuentran los voltamperogramas de la proteína. Mencionan que son el voltamperograma típico para esta especie. Asocian los picos catódicos y anódicos al proceso redox de los enlaces disulfuro de la cisteína en la proteína.

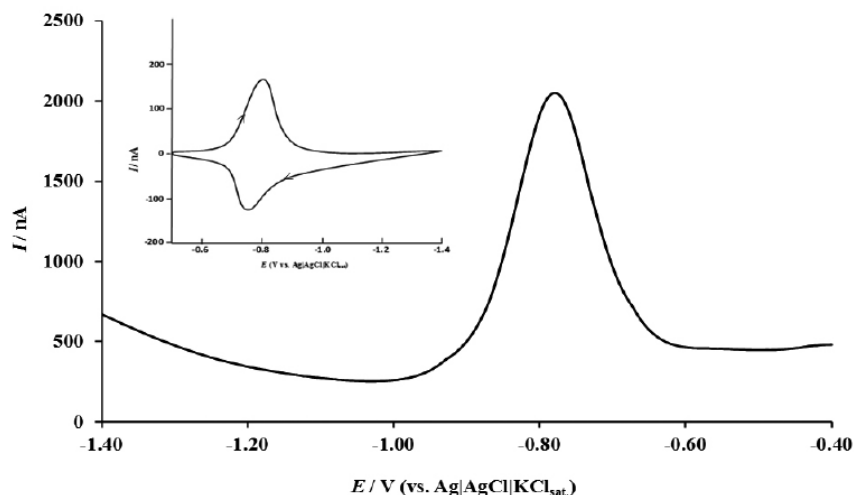


Figura 32. Voltamperograma de onda cuadrada de la ASH en solución amortiguadora BR a pH 7.4. En el recuadro se encuentra el voltamperograma cíclico de la ASH frente a un electrodo de mercurio de gota colgante. Tomado de (Özdemir, 2016).

Los autores utilizaron voltamperometría de onda cuadrada para estudiar las interacciones entre los esteroides y la albumina, obteniendo los voltamperogramas presentados en la **figura 33**. Al adicionar ASH a la solución de cada esteroide, los autores encontraron que las corrientes de pico disminuyeron con un cambio en el potencial de pico, demostrando que había interacción entre la ASH y los esteroides.

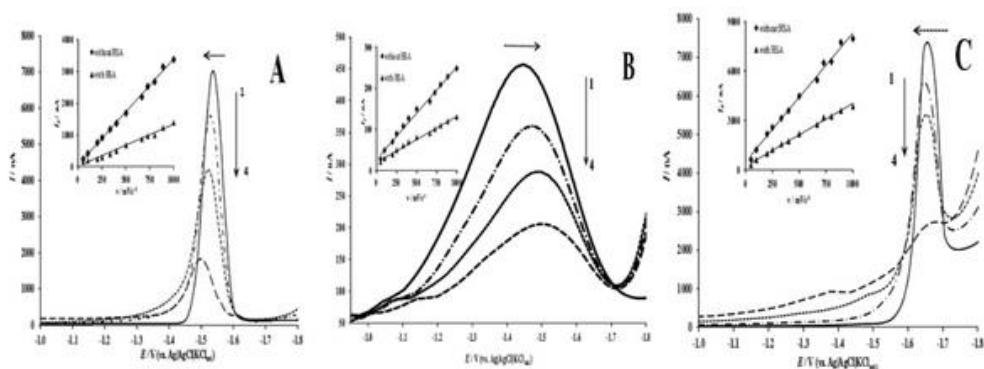


Figura 33. Voltamperogramas de onda cuadrada para A) ácido fusídico, B) ouabaína y C) diacetato de etinodiol. A concentración constante de esteroide y adicionando ASH, en solución amortiguadora Britton Robinson a pH 7.4. Tomado de (Özdemir, 2016).

Los autores asocian la disminución en la corriente pico y el cambio en el potencial pico a la formación de un complejo electroactivo entre la albumina y los esteroides. Cuando hay ASH en el medio, la concentración en solución de los esteroides libres disminuye, lo que hace que las corrientes máximas disminuyeran de igual forma. Además, mencionan que estos cambios pueden verse afectados por la disminución de los coeficientes de difusión de cada esteroide al formarse los complejos con la ASH.

Los autores emplearon la siguiente ecuación para determinar la constante de unión entre la ASH y los esteroides:

$$\ln \left[\frac{\Delta i}{\Delta i_{m\acute{a}x} - \Delta i} \right] = \ln \beta + m \ln[\text{esteroide}] \quad (27)$$

Determinaron una constante de unión para distintas temperaturas utilizando los resultados de voltamperometría de onda cuadrada. Los autores encontraron que cuando la temperatura aumentaba las constantes de unión del complejo ASH-AF aumentan mientras que para los complejos ASH-OUB y ASH-DE disminuyen. Esta información se encuentra recabada en la **tabla 6**. Los autores mencionan que, para estos sistemas, los enlaces de hidrogeno y las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas de enlace predominantes. Los enlaces de hidrogeno disminuyen mientras que las fuerzas hidrofóbicas aumentan con el aumento de la temperatura.

T(K)	ASH-AF		ASH-OUB		ASH-DE	
	<i>m</i>	β	<i>m</i>	β	<i>m</i>	β
297.5	1.1	3.11×10^5	2.3	5.90×10^{12}	2.1	1.09×10^{11}
300.5	1.5	1.02×10^{10}	2.1	9.43×10^{11}	1.8	2.00×10^{10}
303.5	1.5	2.13×10^{10}	1.8	2.85×10^{10}	1.4	1.84×10^7
306.5	2.1	4.48×10^{10}	1.7	6.55×10^9	1.0	3.82×10^5
309.5	2.1	2.16×10^{11}	1.6	2.42×10^9	0.6	6.94×10^3
312.5	2.3	1.12×10^{12}	1.4	7.97×10^7	0.5	9.67×10^2

Tabla 6. Constantes de unión y estequiometría de los complejos entre la ASH y esteroides obtenidos por voltamperometría de onda cuadrada a diferentes temperaturas. Tomada de (Özdemir, 2016).

Para el año 2018 Chilom y colaboradores presentan un trabajo donde estudiaron la interacción del ácido fólico (AF) con la albumina sérica humana a pH fisiológico frente a un electrodo de oro (Chilom, 2018). Los autores adsorbieron la ASH sobre la superficie de oro y realizaron las mediciones en una solución amortiguadora de HEPES a pH 7.25, usando ferricianuro de potasio como sonda redox. Los voltamperogramas resultantes se presentan en la **figura 34 A y B**.

En la **figura 34A** se puede observar que al adicionar ASH a la solución hay una disminución en la corriente máxima y un aumento en la separación del potencial, lo que indica la adsorción de ASH sobre el electrodo. Los autores indican que se forma una capa continua de ASH sobre la superficie del electrodo que dificulta la transferencia de electrones entre la superficie del electrodo y las especies de ferrocianuro. En la **figura 34B** vemos el comportamiento del electrodo modificado cuando se agrega AF a la solución y también existe una disminución en la corriente pico conforme la concentración de AF aumenta. Los autores explican que esto se debe a que se forma una capa más gruesa sobre la superficie del electrodo lo que vuelve más lenta la transferencia de electrones a la superficie del electrodo. La disminución de la corriente máxima ocurrió hasta concentraciones de AF > 40 μM , lo que indicó que la unión de ASH-AF alcanzó un equilibrio, **figura 34C**.

Los autores indican que la unión del AF con la ASH que se encontraba adsorbida en la superficie del electrodo de oro parece tener el comportamiento de una isoterma de Langmuir. Utilizaron la **ecuación 28** para determinar la constante aparente de enlace.

$$\frac{C}{i} = \frac{1}{\beta \cdot i_{m\acute{a}x}} + \frac{C}{i_{m\acute{a}x}} \quad (28)$$

Donde i representa la corriente máxima anódica, $i_{m\acute{a}x}$ el máximo de la corriente máxima (correspondiente a la fracción de sitios accesibles en la proteína), C la concentración de AF y β la constante de unión aparente. De la relación lineal $C/i = f(C)$, los autores calcularon un valor de 4.6×10^5 para la constante de unión aparente.

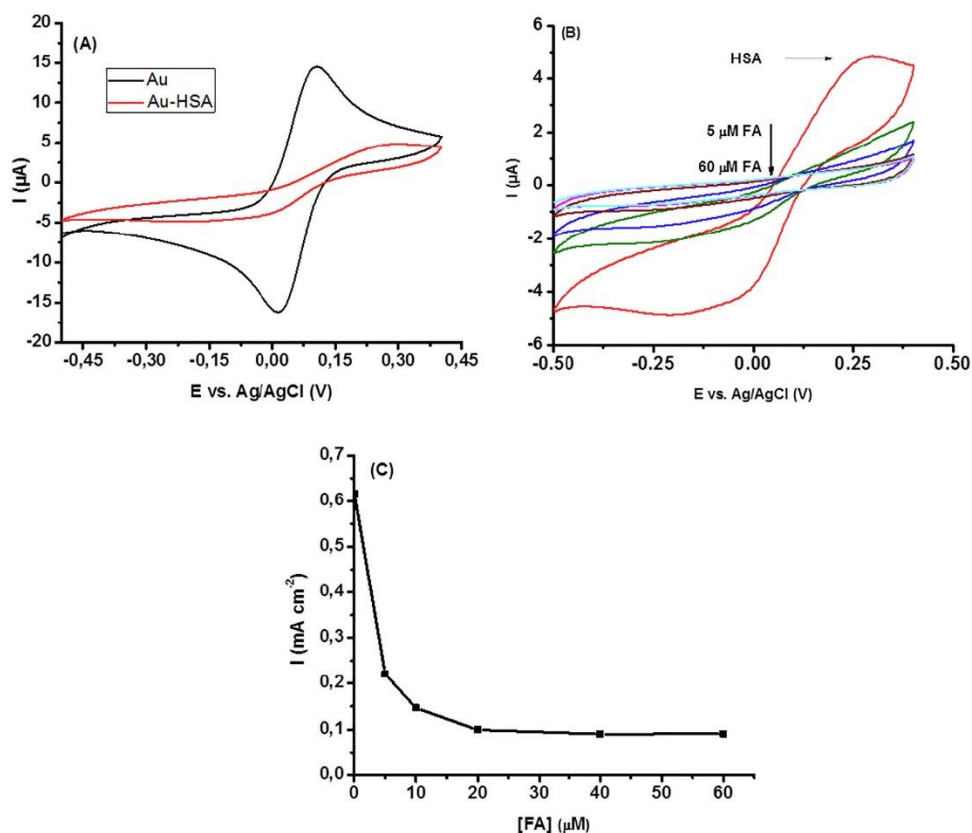


Figura 34. Voltamperogramas cíclicos en solución amortiguadora HEPES para: A) electrodos de Au y Au-ASH, B) electrodo de Au modificado al adicionar AF en concentraciones crecientes y C) variaciones de las intensidades máximas de oxidación para el electrodo modificado con ASH-AF. Tomado de (Chilom, 2018).

Rezaeinasab y colaboradores publicaron en 2019 un trabajo enfocado en desarrollar un método para determinar albumina sérica bovina, para ello estudiaron la interacción entre ASB y carvacrol (CAR), un terpenoide, utilizando voltamperometría cíclica, voltamperometría diferencial de pulso, voltamperometría de onda cuadrada y técnicas espectroscópicas (Rezaeinasab, 2019).

En este trabajo emplean voltamperometría cíclica para estudiar la oxidación de las especies sobre el electrodo de carbono vitreo. Encontraron que al adicionar ASB en concentraciones crecientes, la corriente pico de CAR disminuyó junto con un cambio en el potencial pico. Los autores explican que este fenómeno se debe a la disminución de la concentración de CAR libre debido a formación de un complejo entre ASB-CAR. También realizaron un experimento donde la concentración de ASB se mantuvo constante y se fue agregando CAR

en concentraciones crecientes. La ASB no presentó comportamiento redox, pero al adicionar CAR apareció un nuevo pico y su corriente aumentó gradualmente. Explican que estos cambios se pueden explicar por la formación de un complejo entre ASB-CAR. Concluyeron que los picos de oxidación de CAR libre y del complejo ASB-CAR se superponen y los voltamperogramas registrados son la suma de esos dos fenómenos. Por desgracia los autores no presentan dichos voltamperogramas.

Por otro lado, de voltamperometría diferencial de pulso obtienen los voltamperogramas de la **figura 35**. Realizaron un análisis a concentración constante de CAR y fueron adicionando ASB, encontrando que conforme la concentración de ASB aumentaba, la corriente máxima disminuía con un cambio positivo en el potencial máximo. Los autores consideran dos posibles factores para este fenómeno, 1) la disminución de la corriente máxima con un cambio positivo sugiere que CAR se une a ASB a través de la formación de un complejo electroinactivo y 2) la adsorción competitiva entre CAR y ASB en la superficie del electrodo. Descartan la segunda opción porque a baja concentración de proteína y tiempos cortos de acumulación solo el 10 % del área total del electrodo puede cubrirse de biomoléculas como la albumina. De forma contraria, cuando se mantuvo constante la concentración de ASB y se fue adicionando CAR, la corriente máxima aumentaba conforme aumentaba la concentración de CAR y el potencial máximo se desplazó a valores más positivos.

Los autores concluyen que existe una fuerte superposición entre la señal de CAR libre y la forma complejada con ASB. No pudieron obtener más información de los voltamperogramas y para resolver la superposición hacen uso de métodos quimiométricos.

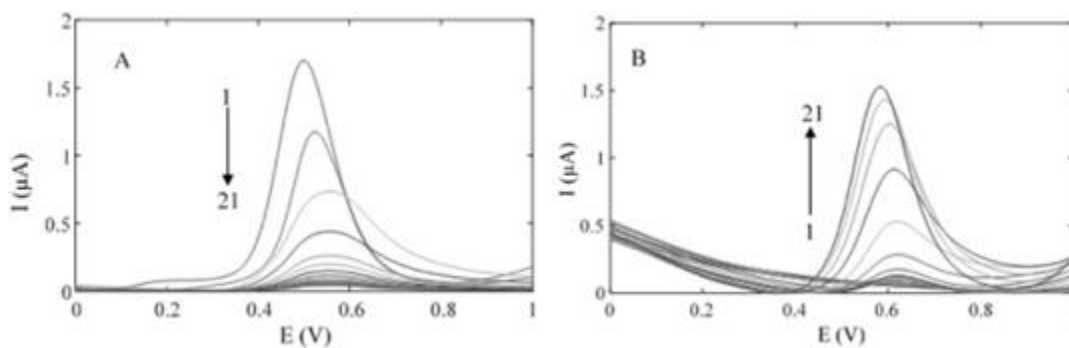


Figura 35. Voltamperogramas diferencial de pulso para A) CAR (100 μM) a con diferentes concentraciones de ASB en el rango de 0-100 μM y B) ASB (100 μM) con diferentes concentraciones de CAR en el rango de 0-800 μM . Tomado de (Rezaeiasab, 2019).

Realizaron un análisis de voltamperometría de onda cuadrada manteniendo la concentración constante de CAR, adicionando concentraciones crecientes de ASB. En otro, mantuvieron constante la concentración de ASB y adicionaron concentraciones de CAR crecientes. Obtuvieron los mismos resultados que en las otras técnicas voltamperométricas. Llegando a la misma conclusión, los voltamperogramas de CAR libre y CAR-ASB se superponen. De las técnicas voltamperométricas no llegan a obtener ningún dato de constante de unión ni de estequiometría.

En el trabajo publicado por Chilom en el año 2020, estudiaron la interacción entre el ácido fólico (AF) y la albumina sérica bovina mediante espectroscopía y electroquímica. Para la primera técnica estudiaron la unión de ambas especies en solución, mientras que para la segunda técnica inmovilizaron a la proteína sobre la superficie de un electrodo de oro para así seguir la interacción entre la ASB inmovilizada y el ácido fólico libre (Chilom, 2020). Lo proponen de esta forma porque sabían que la ASB se adsorbe sobre la superficie del electrodo. Adaptan la ecuación de la isoterma de Langmuir para determinar la constante de unión aparente ($K_{b\text{ ap}}$) al equilibrio.

Para estudiar las características superficiales de electrodo usaron voltamperometría cíclica. En la **figura 36A** se observa un cambio evidente en la intensidad de los picos redox como el desplazamiento de los potenciales máximos entre el electrodo de oro desnudo y el electrodo en que se encuentra inmovilizada la ASB. Estos sugieren que la transferencia de

electrones se ve afectada por la proteína inmovilizada en la superficie. En la **figura 36B** tenemos el resultado de agregar distintas concentraciones de AF frente al electrodo modificado, mostrando una disminución en los picos redox cuando la concentración aumenta. Esto es evidencia de la unión de AF-ASB, que dificulta aún más la transferencia de electrones. Para resaltar este fenómeno, la capacitancia del electrodo modificado con ASB se representó en función de la concentración de FA. El análisis de capacitancia, **Figura 36C**, da como resultado una isoterma de Langmuir.

La capacitancia la calcularon para un potencial fijo en la región no faradaica del voltamperograma cíclico usando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{\Delta j}{\nu} \quad (29)$$

Donde Δj es la diferencia entre la densidad de corriente leída en el escaneo directo e inverso del voltamperograma cíclico en la **figura 36B** y ν es la velocidad de barrido. La unión entre las moléculas de AF con la ASB, da lugar a una isoterma en forma de Langmuir. Los autores adaptaron la ecuación de la isoterma de Langmuir y la utilizaron para determinar la constante de unión aparente $K_{b\ ap}$ en el equilibrio:

$$\frac{c}{C} = \frac{c}{C_e} + \frac{1}{K_{b\ ap} C_e} \quad (30)$$

Donde C representa la capacitancia (mF cm^{-2}), C_e la capacitancia en equilibrio (saturación), c la concentración de AF y $K_{b\ ap}$ la constante de unión aparente de AF a la ASB confinada en la superficie de oro.

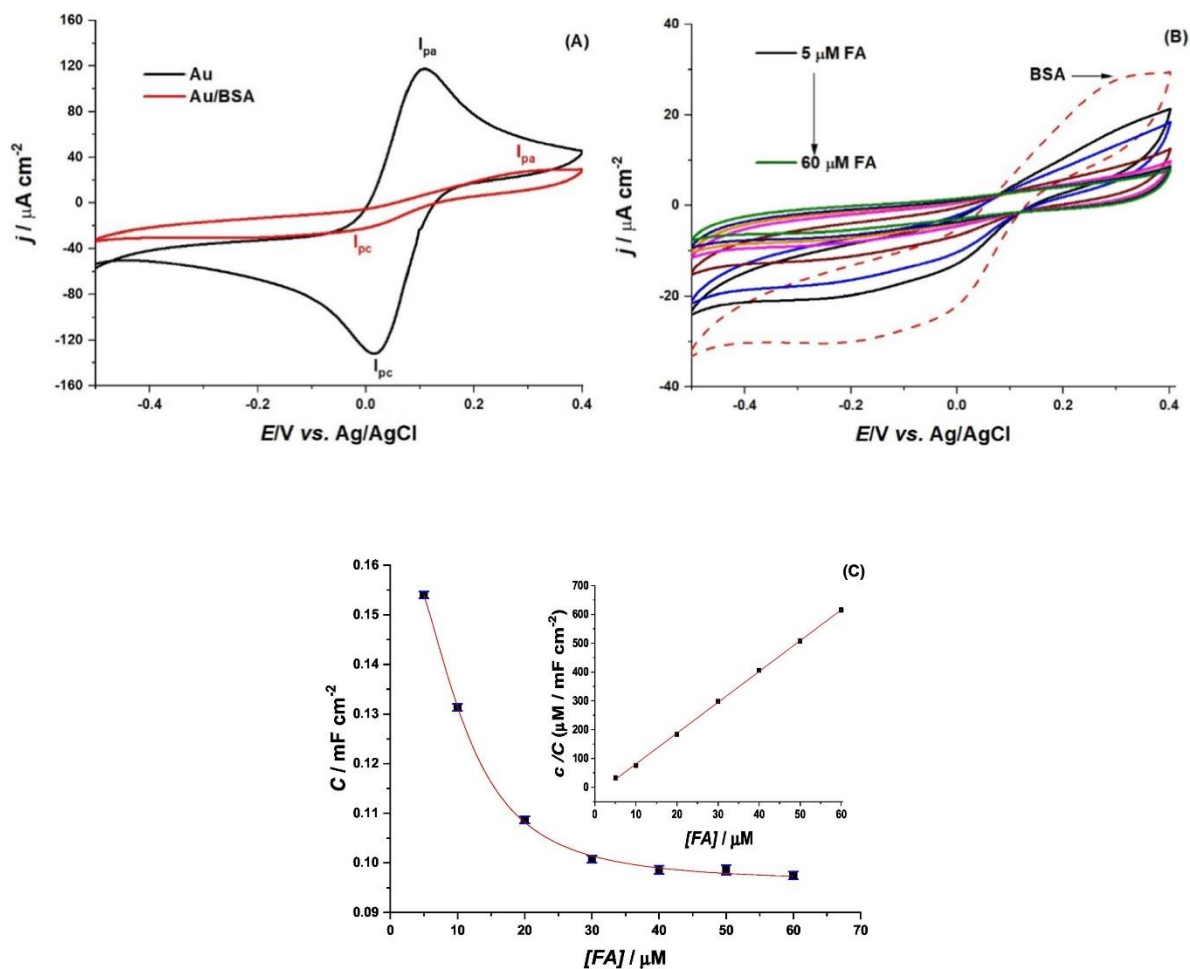


Figura 36. Voltamperogramas cíclicos en amortiguador HEPES 0.1 M a un valor de pH de 7.25 en presencia de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mM, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ para: A) electrodos Au y Au-ASB, B) Au-ASB electrodo para aumentar las adiciones de AF (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μM) y C) variación de capacitancia con concentración de AF e inserción de análisis de regresión lineal. Tomado de (Chilom, 2020).

Concluyen que el valor de $K_{b \text{ ap}}$ obtenido por voltamperometría (41×10^4) es superior al que obtuvieron mediante fluorescencia (8.72×10^4). Mencionan que esta diferencia observada en la constante de unión aparente se puede atribuir a que la ASB se encontraba confinada en la superficie de oro afectando la conformación de la proteína y, en consecuencia, influir en la orientación de los sitios de unión de ASB con las moléculas del ácido fólico, lo que termino aumentando la fuerza de la interacción biomolecular.

Se han estudiado sistemas donde existe la formación de un complejo ternario entre ASH, aspirina (ASP) y vitamina C (Zhang, 2020). La información que obtienen de dicho estudio va enfocada a si el consumo de aspirina o vitamina C afecta la absorción del otro. Los autores

para caracterizar los complejos no solo hacen uso de la voltamperometría, sino que realizan un estudio con distintas técnicas para obtener un enfoque más integral.

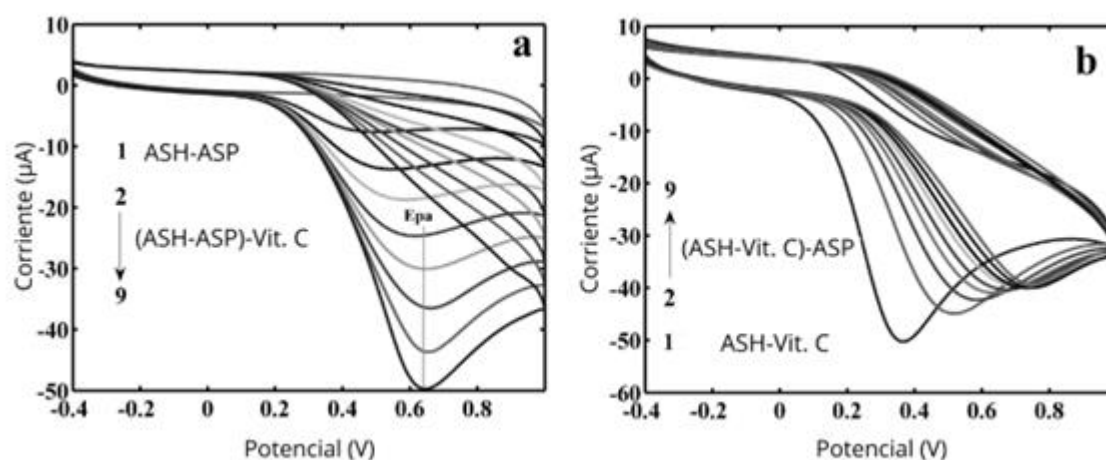


Figura 37. Voltamperogramas cíclicos de a) la interacción entre ASH-ASP y distintas concentraciones de Vit. C; b) La interacción entre ASH-Vit. C y distintas concentraciones de ASP. Tomado y modificado de (Zhang, 2020).

Ellos concluyen de los voltamperogramas, **figura 37**, que la aspirina afecta la formación del complejo entre ASH-vitamina C. Por el contrario, la vitamina C no afecta la formación del complejo ASH-aspirina. Todo esto hablando del orden de adición, primero se forma el complejo entre dos especies y después el complejo ternario. Desafortunadamente los autores no realizaron un análisis más exhaustivo de los datos voltamperometricos para determinar la constante de unión de ninguno de los complejos ni mucho menos su estequiometría.

Trabajos recientes destacan el campo de aplicación que podría tener el emplear las técnicas electroquímicas mediante el desarrollo de sensores electroquímicos especializados en detectar a la albumina (Nasori, 2021; Aye, 2021; Khumsap, 2021).

En el trabajo de Nasori publicado en el año 2021, desarrollaron un electrodo de matrices nanocuatras de Ag y otros dos de una película delgada de Ag; una depositada mediante pulverización catódica por corriente continua y otra mediante recubrimiento por rotación, para detectar niveles de albumina sérica en sangre (Nasori, 2021). Los caracterizaron óptica y electroquímicamente. Utilizan ASB como proteína modelo por su semejanza con ASH. Su

trabajo está enfocado en caracterizar los electrodos que desarrollaron y no realizan pruebas en muestras clínicas (**Figura 38**). De voltamperometría cíclica registran la respuesta de la corriente de los biosensores frente al aumento de ASB en el medio. También determinan la sensibilidad, siendo el electrodo de matrices nanocuatras de Ag el que presenta una mayor sensibilidad.

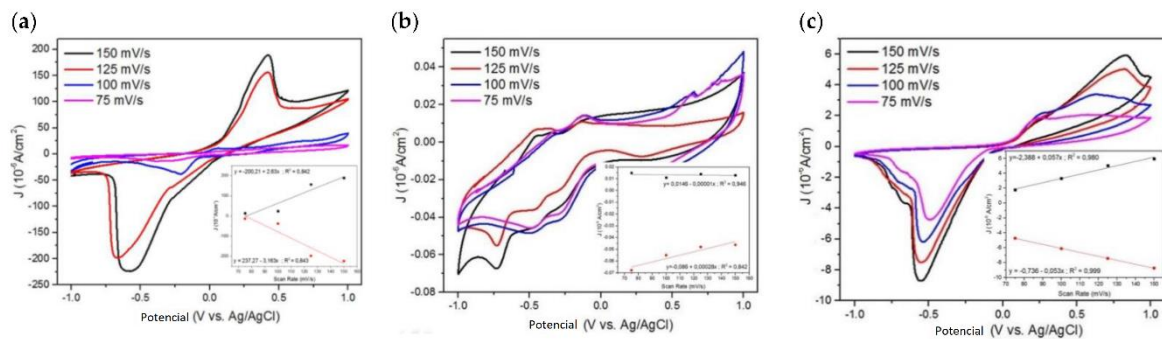


Figura 38. Voltamperogramas cíclicos, picos de las corrientes de oxidación y reducción en función de la velocidad de barrido en (a) el electrodo de película delgada de Ag depositado mediante pulverización catódica con corriente continua, (b) el electrodo de película delgada de Ag depositado mediante recubrimiento por rotación y (c) el electrodo de matriz nanocuatras de Ag. Tomado y modificado de (Nasori, 2021).

Concluyen que el electrodo de matrices nanocuatras de Ag es la mejor opción para la potencial aplicación en la determinación de albumina sérica para el diagnóstico de cáncer en sangre. Desafortunadamente no reportan datos estequiométricos ni constantes de equilibrio de formación de complejo para la unión de la ASB a los electrodos metálicos.

En el trabajo de Aye publicado en el año 2021, desarrollaron un aptasensor electroquímico basado en grafeno para la detección rápida y de alta sensibilidad de albumina glucosilada (Aye, 2021). Emplean electrodos de carbono serigrafados modificados con oxido de grafeno, en ellos inmovilizan el aptámero específico para albumina glucosilada. Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN cortos, sintéticos y monocatenarios. Aunque en su trabajo mencionan que, si hay unión entre el aptámero inmovilizado y la proteína, desafortunadamente ellos no presentan ningún dato termodinámico como la constante de unión ni datos estequiométricos, solamente evaluaron de forma cualitativa dicha unión. Emplearon voltamperometría cíclica para caracterizar el aptasensor electroquímico, **figura**

39, y así ver la variación en la transferencia de carga con cada modificación de la superficie que se realizó al electrodo, analizando los cambios en la corriente máxima. Ellos utilizaron como sonda electroquímica al $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/-3}$, ya que tanto el analito como el aptámero específico para albumina glucosilada no presentan electroactividad.

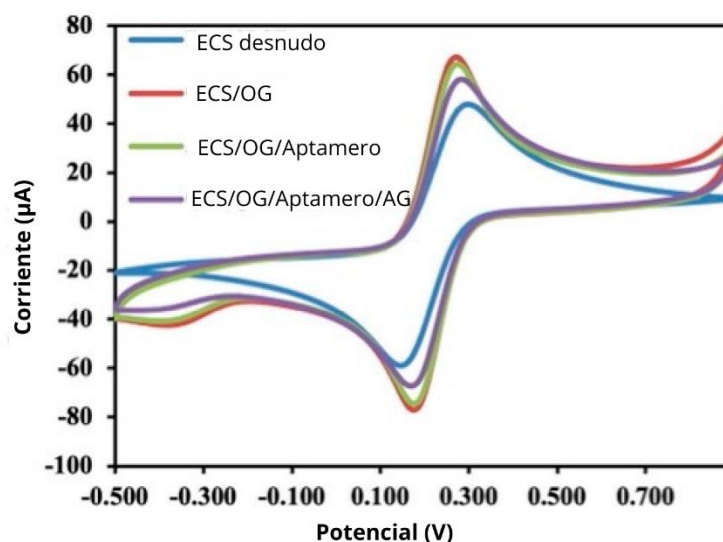


Figura 39. Voltamperograma cíclico de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/-3}$ para el estudio del comportamiento del electrodo de carbono serigrafiado desnudo y el electrodo de carbono serigrafiado modificado con oxido de grafeno. Tomado y modificado de (Aye, 2021).

Khumsap y colaboradores desarrollaron un sensor electroquímico sensible y selectivo a ovoalbúmina (OVA), basado en polidopamina sintetizada en un electrodo de carbono serigrafiado recubierto con nanopartículas de oro en presencia de un epítodo de unión a OVA (Khumsap, 2021). Realizaron experimentos de voltamperometría cíclica para electrodepositar las nanopartículas de oro y al mismo tiempo, caracterizar su sensor. De ellos obtuvieron información sobre la deposición de las nanopartículas de oro en la superficie del electrodo y así conocer su comportamiento electroquímico en diferentes etapas de la modificación. Hacen uso de una sonda, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/-3}$, ya que las moléculas biológicas no son electroactivas, y aunque en su investigación reportan haber trabajado con muestras reales donde obtuvieron buena respuesta, no presentan ningún estudio

termodinámico respecto a la unión del epítipo y la ovoalbúmina, es un trabajo del tipo cualitativo respecto a la caracterización del complejo entre estas dos especies.

La albumina sérica bovina tiene un efecto de bloqueo en la superficie de los electrodos y puede experimentar adsorción en la superficie de electrodos metálicos. Cuando hay un aumento en la concentración de ASB en el medio se genera una capa de adsorción en el electrodo, lo que le permite bloquear e inhibir la transferencia de iones (Nasori, 2021).

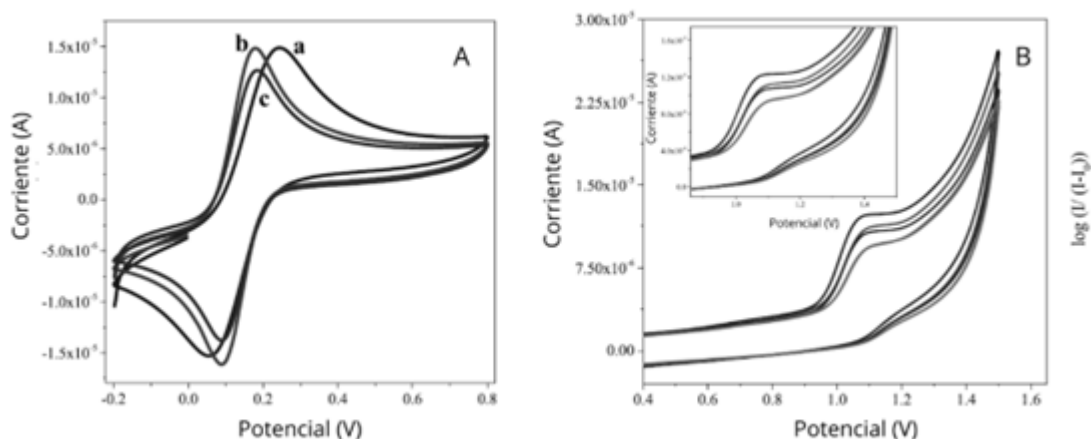


Figura 40. Voltamperogramas cíclicos de la sonda redox A) en presencia de a) MIL b) ASH c) MIL-ASH; B) con la variación en la concentración de MIL-ASH. Tomado y modificado de (Unal, 2022).

El estudio de Unal en el año 2022, modifican un electrodo de carbono vitreo con ASH para estudiar las interacciones de la proteína con un fármaco (Unal, 2022). El fármaco es el inhibidor de la enzima fosfodiesterasa-3 milrinona (MIL). Ellos utilizaron $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ como sonda redox e hicieron uso de la voltamperometría cíclica para ver cómo cambiaba el comportamiento redox de la sonda en presencia del fármaco, la ASH y ambas especies, **figura 40**.

Para determinar la constante de unión del complejo MIL-ASH hicieron un estudio voltamperométrico cíclico a concentración constante de MIL y diferentes concentraciones de ASH y mediante la **ecuación 31** determinaron la constante de unión, con un valor de 4.11×10^6 .

$$C_{MIL}/i = [1/\beta] + [C_{MIL}/i_{m\acute{a}x}] \quad (31)$$

Usaron la voltamperometría de pulso diferencial para determinar la interacción entre el biosensor ECG/ASH y MIL a distintas concentraciones, así caracterizaron el biosensor que desarrollaron.

Se tiene evidencia de que los valores de la constante de asociación de complejos ASH-fármaco obtenidos por voltamperometría tienen concordancia con los valores obtenidos por métodos espectroscópicos (Hashemnia, 2022). Ellos investigaron el comportamiento de la sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/3}$ en presencia de ASH y ASH-efedrina, **figura 41**.

Para el complejo ASH-efedrina, Hashemnia y colaboradores en su trabajo publicado en 2022, reportan una K_b de 2.73×10^4 determinada por voltamperometría cíclica, mientras que el valor de la constante de unión obtenida por el método espectroscópico UV-Vis fue de 2.4×10^4 . La diferencia entre estas dos constantes no es muy grande, lo que permite decir que estudiar complejos ASH-fármaco haciendo uso de técnicas electroquímicas y obtener constantes de unión es posible. La voltamperometría tiene un gran potencial para ser aplicada a este tipo de sistemas.

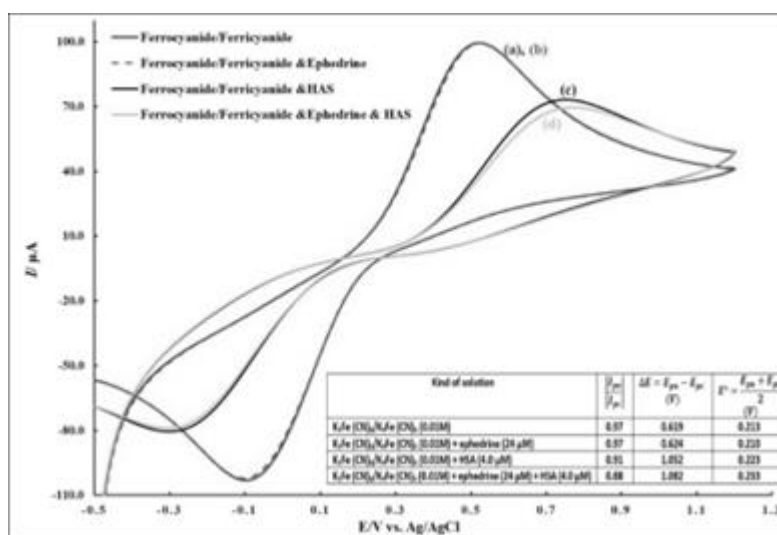


Figura 41. Voltamperograma cíclico de la a) sonda redox, la sonda en presencia de b) efedrina, c) ASH y d) ASH-efedrina. Tomado de (Hashemnia, 2022).

5. Resultados

Como resultado de la revisión bibliográfica se elaboró una tabla (**Tabla 7**) donde se encuentran recopilados datos que, se considera, resultarán de interés para quienes busquen informarse sobre el estudio de estos sistemas. En dicha tabla se encuentra el tipo de albumina con la que trabajaron, el ligante, las técnicas electroquímicas que se utilizaron para determinar la constante de unión, específicamente hablando, tipos de voltamperometría. También, se encuentran enlistados los valores de constantes de unión, si usaron o no una sonda redox en el estudio, el tipo de solución amortiguadora que emplearon y el electrodo de referencia que utilizaron. Todo esto con la intención de facilitarle al lector el encontrar información relevante y de este modo, sepa qué referencias podrían serle de utilidad. En el texto solo se presenta la información de algunos artículos, a modo de ejemplos de resultados encontrados en la literatura, pero en la tabla se encuentran todos los trabajos donde se obtuvieron valores de las constantes de unión.

El papel que desempeñó la voltamperometría para estudiar los sistemas de tipo ASH/ASB-moléculas pequeñas en los distintos trabajos que se revisaron no siempre fue el principal. Más bien, en muchos de estos se empleó como una técnica auxiliar. Y en contraste, los trabajos donde únicamente utilizaron técnicas voltamperométricas para estudiar estos sistemas, fueron muy pocos.

Pese a lo anterior, fue posible dilucidar la gran área de oportunidad que es el utilizar la voltamperometría para estudiar estos complejos, ya que la ASH y ASB, por su origen y dificultad para obtener cantidades suficientes, el tamaño de muestra que puede ser empleada para estudios es poca, así que lo mejor sería emplear una técnica que utilice muy poca cantidad de muestra además de tener tiempos cortos de análisis y sin complicados tratamientos previos de la muestra en comparación con otras técnicas como lo son los distintos tipos de espectroscopias, cristalografía, RMN, por mencionar algunos. Es aquí donde la voltamperometría destaca. Además, tiene la ventaja de que permite trabajar a condiciones cercanas a las fisiológicas y, por ejemplo, cuando el objetivo de un trabajo es ver el efecto de un compuesto en el organismo, resulta de gran relevancia poder trabajar en estas condiciones.

Tabla 7. Resumen de las condiciones y datos experimentales relevantes para el estudio termodinámico de la formación de complejos de ASH/ASB con moléculas pequeñas en donde las constantes de unión reportadas fueron obtenidas a partir de experimentos empleando técnicas voltamperométricas.

Tipo de albumina	Ligante	Técnica electroquímica ¹	Constante de unión	Sonda redox	Amortiguador ²	Electrodo de referencia	Referencia
Sérica bovina	Azitromicina	VC, VDP, VBL	4.36×10^8		A, pH 7	Calomel	Wu 2004
Sérica humana	Colorante azoico	VC, VBL	8.34×10^{11}		BR, pH 3	Calomel	Sun 2005
Sérica humana	Colorante azoico	VC	1.15×10^9		BR, pH 3	Calomel	Sun, W.; Han, J. 2006
Sérica humana	Colorante azoico	VC	1.29×10^8		BR, pH 3	Calomel	Sun, W.; Jiao, K. 2006
Sérica bovina	Cianina ácida 5R	VBL	2.33×10^{-6}		F, pH 7.42	Calomel	Lu 2006
Sérica bovina	Base de Schiff	VC, VDP	1.96×10^4		A, pH 7	Ag/AgCl	Boghaei 2007
Sérica bovina	Claritromicina	VBL	$K_1 = 1.51 \times 10^{12}$ $K_2 = 4.53 \times 10^5$		A, pH 7.4	Ag/AgCl	Dong 2008
Sérica bovina	Quercetina	VC	4.2×10^7		F, pH 7.4	Ag/AgCl	Ni 2009
Sérica humana	Colorante azoico	VBL	4.13×10^4		BR, pH 2.5	Calomel	Hui 2010
Sérica bovina	Papaverina	VDP	1.7×10^4	PoPD ³	D, pH 5	Calomel	Feng 2011
Sérica bovina	Nicotina	VDP	0.18×10^3	PoPD ³	D, pH 7	Calomel	Liang 2012
Sérica bovina	PMT ⁴	VC	7.43×10^5		F, pH 6.5	Calomel	He 2012

¹ VC: voltamperometría cíclica, VDP: voltamperometría diferencial de pulso, VBL: voltamperometría de barrido lineal, VOC: voltamperometría de onda cuadrada.

² A: Fosfato, BR: Britton-Robinson, C: ABS, D: PBS, E: HEPES, F: Tris-HCl, G: TBS, H: acetato, I: ácido fórmico-NaOH

³ Poli-o-fenilendiamina

⁴ Clorhidrato de prometazina

Tabla 7. Continuación resumen de las condiciones y datos experimentales relevantes para el estudio termodinámico de la formación de complejos de ASH/ASB con moléculas pequeñas en donde las constantes de unión reportadas fueron obtenidas a partir de experimentos empleando técnicas voltamperométricas.

Tipo de albumina	Ligante	Técnica electroquímica ¹	Constante de unión	Sonda redox	Amortiguador ²	Electrodo de referencia	Referencia
Sérica bovina	Rutina	VC, VDP	3.89×10^5		A, pH 5.0	Calomel	Duan 2013
Sérica humana	Fármaco anticancerígeno	VC	1.267×10^5	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$	D, pH 7.4	Ag/AgCl	Huang 2014
Sérica bovina	Complejo de Pt(II)	VDP	4.38×10^6		A, pH 7.4	Calomel	Shahabadi 2014
Sérica humana	4-aminoantipirina	VC	1.72×10^5		D, pH 7.4	Ag/AgCl	Gowda 2014
Sérica bovina	Ketoconazol	VC, VDP	1.24×10^4		A, pH 7.4	-	Gowda 2015
Sérica bovina	Vitamina B7	VC, VDP, VBL	4.12×10^4		G, pH 7.4	Calomel	Gholivand 2015
Sérica humana	Miconazol y Econazol	VC	$K_{\text{Mic}} = 2.36 \times 10^4$ $K_{\text{Ec}} = 3.73 \times 10^4$	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$	No indicado	Ag/AgCl	Hu 2015
Sérica humana	Tiabendazol	VC	2.09×10^9		D, pH 6.0	Ag/AgCl	Yang 2015
Sérica humana	Alprazolam y Clorhidrato de fluoxetina	VC	$K_{\text{Al}} = 2.02 \times 10^5$ $K_{\text{Flu}} = 9.86 \times 10^4$		A, pH 7.4	Ag/AgCl	Dangkoob 2015

¹ VC: voltamperometría cíclica, VDP: voltamperometría diferencial de pulso, VBL: voltamperometría de barrido lineal, VOC: voltamperometría de onda cuadrada.

² A: Fosfato, BR: Britton-Robinson, C: ABS, D: PBS, E: HEPES, F: Tris-HCl, G: TBS, H: acetato, I: ácido fórmico-NaOH

Tabla 7. Continuación resumen de las condiciones y datos experimentales relevantes para el estudio termodinámico de la formación de complejos de ASH/ASB con moléculas pequeñas en donde las constantes de unión reportadas fueron obtenidas a partir de experimentos empleando técnicas voltamperométricas.

Tipo de albumina	Ligante	Técnica electroquímica ¹	Constante de unión	Sonda redox	Amortiguador ²	Electrodo de referencia	Referencia
Sérica humana	Ácido fusídico, Ouabaína y Etinodioldiacetato	VOC	$K_{FA} = 3.11 \times 10^5$ $K_{OUB} = 5.90 \times 10^{12}$ $K_{ETH} = 1.09 \times 10^{11}$		BR, pH 7.4	Ag/AgCl	Özdemir 2016
Sérica humana	Clorhidrato de acotiamida	VDP	2.60×10^4		D, pH 7.4	Calomel	He 2016
Sérica bovina	Dimaleato de perzina	VC	4.59×10^4		H, pH 7.2	-	Mahanthappa 2016
Sérica bovina	Diazepam y Clorhidrato de clordiazepóxido	VC,	$K_{DZ} = 2.0 \times 10^6$ $K_{CZP} = 7.76 \times 10^4$		I, pH 4.5	Ag/AgCl	Naggar 2016
Sérica bovina	Colorante azoico	VC	3.98×10^{22}		BR, pH 3.0	Ag/AgCl	Surucu 2017
Sérica bovina	Cumarina	VC, VOC	3.47×10^2		A, pH 5.8	Calomel	Leuna 2018
Sérica humana	Ácido fólico	VC	4.6×10^5	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$	E, pH 7.25	Ag/AgCl	Chilom 2018
Sérica humana	Noscapina	VC	9.6×10^4	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$	pH 7.4	Calomel	Hammami 2018
Sérica bovina	Carvacrol	VDP, VOC, VC	5.75×10^4		A, pH 7.4	Ag/AgCl	Rezaeinasab 2019
Sérica bovina	Pentoxifilina	VDP, VC	8.94×10^4			-	Mallapa 2019

¹ VC: voltamperometría cíclica, VDP: voltamperometría diferencial de pulso, VBL: voltamperometría de barrido lineal, VOC: voltamperometría de onda cuadrada.

² A: Fosfato, BR: Britton-Robinson, C: ABS, D: PBS, E: HEPES, F: Tris-HCl, G: TBS, H: acetato, I: ácido fórmico-NaOH

Tabla 7. Continuación resumen de las condiciones y datos experimentales relevantes para el estudio termodinámico de la formación de complejos de ASH/ASB con moléculas pequeñas en donde las constantes de unión reportadas fueron obtenidas a partir de experimentos empleando técnicas voltamperométricas.

Tipo de albumina	Ligante	Técnica electroquímica ¹	Constante de unión	Sonda redox	Amortiguador ²	Electrodo de referencia	Referencia
Sérica bovina	Ciprofloxacina	VC, VDP	7.4×10^4		BR, pH 7.0	Calomel	Ipte 2019
Sérica bovina	2-ferrocenilbenzonitrilo 4-ferrocenilbenzonitrilo	VC	$K_{2\text{FBN}} = 7.05 \times 10^4$ $K_{4\text{FBN}} = 3.44 \times 10^4$		A, pH 7.4	Calomel	Benamara 2019
Sérica bovina	Ácido fólico	VC	41×10^4	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$	E, pH 7.25	Ag/AgCl	Chilom 2020
Sérica humana	MIL	VC, VDP	4.11×10^6	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$	C, pH 4.7	Calomel	Unal 2022
Sérica humana	Efedrina	VC	2.73×10^4	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$	D, pH 7.4	Ag/AgCl	Hashemnia 2022

¹ VC: voltamperometría cíclica, VDP: voltamperometría diferencial de pulso, VBL: voltamperometría de barrido lineal, VOC: voltamperometría de onda cuadrada.

² A: Fosfato, BR: Britton-Robinson, C: ABS, D: PBS, E: HEPES, F: Tris-HCl, G: TBS, H: acetato, I: ácido fórmico-NaO

Otro punto que vale la pena resaltar es, la discrepancia que se encontró entre los artículos respecto al comportamiento redox de la albumina. En trabajos como el de Shearan y colaboradores (Shearan, 1990) y el grupo de Ding (Ding, 2007) mencionan que la ASH y ASB son electroactivas, mientras que, en el resto de los trabajos, está muy marcado que la proteína albumina es no electroactiva y que se adsorbe sobre la superficie de los electrodos metálicos. Mencionan que, en ocasiones, al unirse la proteína a moléculas pequeñas, se despliega su estructura haciendo que los residuos de triptófano y tirosina que contiene la albumina sean accesibles para su oxidación en la superficie del electrodo, volviendo al complejo electroactivo. Y aunque bajo las condiciones de trabajo de los grupos de Shearan (Shearan, 1990) y de Ding (Ding, 2007) esto pudiera suceder, fueron los únicos artículos donde se discute esta información.

Después de haber revisado el trabajo del grupo de Heli (Heli, 2007), fue muy evidente que en muchos de los artículos no realizan, o al menos no lo mencionan, un estudio previo del comportamiento que tendrá la proteína bajo las condiciones de trabajo. Esto resulta relevante porque de esta forma se puede descartar o no, la adsorción de la albumina sobre la superficie del electrodo y así, los resultados del estudio de la albumina-molécula pequeña pueden ser interpretados de una mejor forma y también ser de ayuda para optimizar las condiciones de trabajo.

Es importante mencionar que, al comparar la cantidad de artículos revisados con la cantidad de artículos donde obtienen valores de constantes de unión y/o algún otro parámetro termodinámico, es muy poca. De los 127 trabajos revisados, solo en 36 presentan constantes de unión.

En la mayoría de los trabajos, la información que obtuvieron por medio de la voltamperometría se limitó a afirmar la unión entre la albumina y la molécula de interés mediante el análisis del cambio de potencial pico y la corriente pico, comparando los valores de la especie antes y después de adicionar la albumina a la solución y viceversa, los valores de la albumina antes y después de adicionar la especie de interés. En otros casos, además

de realizar el análisis anterior, presentaron la constante de equilibrio asociada al complejo y obtuvieron el valor asociado.

Finalmente, aunque para esta revisión bibliográfica el estudio de metaloproteínas mediante técnicas voltamperométricas no ha sido ampliamente explorado, esto no quiere decir que siempre se mantendrá de la misma forma. El tiempo pasa y las necesidades de las investigaciones van cambiando, ocupando análisis más rápidos, menos costosos y confiables. Sin duda, la voltamperometría tiene toda la oportunidad de ser empleada para el estudio de estos sistemas, solo es cuestión de comenzar a emplearla como técnica principal.

6. Conclusiones

En este trabajo se presentó la información de los artículos en donde explicaron con mayor detalle la forma en que analizaron los datos obtenidos por voltamperometría para el estudio de complejos ASH/ASB-moléculas pequeñas. Aunque en la parte de los objetivos se menciona que los complejos de interés eran los del tipo albumina-ion metálico, conforme se fue revisando la información el enfoque tuvo que modificarse, ya que la información respecto al estudio de sistemas albumina-ion metálico empleando voltamperometría era prácticamente nula. Eso no quiere decir que esos sistemas no hayan sido estudiados anteriormente, sino que las técnicas reportadas que se emplean para estudiarlos han sido otras. Dado este hecho, se optó por recabar información donde la técnica empleada es la voltamperometría para estudiar complejos entre la albumina y otras moléculas, como fármacos, colorantes, etc., donde podía o no haber un metal involucrado en la estructura. Al final, lo importante fue obtener un panorama sobre cómo ha sido empleada la voltamperometría para estudiar proteínas y su unión a algún sustrato y qué información han obtenido de ella.

Como resultado de la poca información que se encontró en esta revisión bibliográfica, es claro que el empleo de la voltamperometría cíclica o de pulso diferencial no ha sido utilizada por muchos grupos de investigación para obtener información termodinámica de la formación de complejos proteína-ligante. Lo que convierte a este campo en un tema aún por desarrollar. También resulta interesante que sean muy pocos los estudios reportados de la formación de complejos proteína-ion metálico. Al final de cuentas, se seleccionó un grupo de 146 artículos para revisar, de los cuales sólo 36 contenían información útil sobre constantes de unión para esta revisión. Poco más de un cuarto de información revisada contenía la información que se buscaba, así que es fácil decir que es un área que no tiene mucho desarrollo hasta ahora, siendo un gran campo por explorar para los investigadores.

7. Referencias.

- Alberts, B. (2021). *Introducción a la Biología Celular* (5a ed.). Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana.
- Aye, N. N. S.; Maraming, P.; Tavichakorntrakool, R.; Chaibunruang, A.; Boonsiri, P.; Daduang, S.; Teawtrakul, N.; Prasongdee, P.; Amornkitbamrung, V.; Daduang, J. (2021). A simple graphene functionalized electrochemical aptasensor for the sensitive and selective detection of glycated albumin. *Applied Sciences*, *11*, 10315.
- Baeza, R. A.; García, M. A. J. (2011). Principios de Electroquímica analítica. Colección de documentos de apoyo. Recuperado el 23 de septiembre de 2021, de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOC_APOY_FUNDAMENTOS ELECTROANALITICA 2011 16333.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOC_APOY_FUNDAMENTOS_ELECTROANALITICA_2011_16333.pdf)
- Bal, W.; Sokolowska, M.; Kurowska, E.; Faller, P. (2013). Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1830*(12), 5444-5455.
- Banaszak, J. L. (2000). *Foundations of structural biology*. Cambridge: Academic Press. pp 137 – 147.
- Battaner, A. E. (2012). *Biomoléculas: una introducción estructural a la bioquímica*. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca.
- Benamara, H.; Lanez, T.; Lanez, E. (2020). BSA-binding studies of 2- and 4-ferrocenylbenzonitrile: voltammetric, spectroscopic and molecular docking investigations. *Journal of Electrochemical Science and Engineering*, *10*(4), 335 – 346.
- Boghaei, D. M.; Farvid, S. S.; Gharagozlou, M. (2007). Interaction of copper(II) complex of compartmental Schiff base ligand N,N'-bis(3-hydroxysalicylidene)ethylenediamine with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *66*(3), 650 – 655.

- Bueno, A. C. (2009). Interacciones fármaco-proteína en estados excitados. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Recuperado el 29 de diciembre de 2021, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/6565/tesisUPV3175.pdf;jsessionid=3B4703EC8ED06C2CC359A96624FC8E4E?sequence=1>
- Chilom, G.C.; Bacalum, M.; Stanescu, M.M.; Florescu, M. (2018). Insight into the interaction of human serum albumin with folic acid: A biophysical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 204, 648 – 656.
- Chilom, G. C.; David, M.; Florescu, M. (2020). Monitoring biomolecular interaction between folic acid and bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 230, 118074.
- Clark, P. D.; Pazdernik, J. N.; McGehee, R. M. (2019). *Molecular biology* (3a ed.). San Diego: Academic Cell.
- Crichton, R. R. (2012). *Biological inorganic chemistry: an introduction* (2a ed.). Amsterdam: Elsevier Science.
- Dangkoob, F.; Housaindokht, R. M.; Asoodeh, A.; Rajabi, O.; Zaeri, R. Z.; Doghaei, V. A. (2015). Spectroscopic and molecular modeling study on the separate and simultaneous bindings of alprazolam and fluoxetine hydrochloride to human serum albumin (HSA): With the aim of the drug interactions probing. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 1106 – 1119.
- Ding, Y.; Shu, Y.; Ge, L.; Guo, R. (2007). The effect of sodium dodecyl sulfate on the conformation of bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 298(3), 163 – 169.
- Dong, S.; Xue, C.; Huang, T. (2008). Electrochemical studies of the interaction of clarithromycin with bovine serum albumin. *Analytical Sciences*, 24, 1087 – 1091.
- Duan, L.; Yang, L.; Xiong, H.; Zhang, X.; Wang, S. (2013). Studies on the electrochemistry of rutin and its interaction with bovine serum albumin using a glassy carbon electrode

- modified with carbon-coated nickel nanoparticles. *Microchimica Acta*, 180(5-6), 355 – 361.
- Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. (2017). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197 – 206.
- Feliciano, I.; Matta, J.; Meléndez, E. (2009). Water-soluble molybdenocene complex with both proliferative and antiproliferative effects on cancer cell lines and their binding interactions with human serum albumin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14, 1109 – 1117.
- Feng, L.; Zhang, X.; Zhao, D.; Wang, S. (2011). Electrochemical studies of bovine serum albumin immobilization onto the poly-o-phenylenediamine and carbon-coated nickel composite film and its interaction with papaverine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 152(1), 88 – 93.
- Gholivand, M.; Jalalvand, A. R.; Goicoechea, C. H.; Gargallo, R.; Skov, T. (2015). Chemometrics: An important tool for monitoring interactions of vitamin B7 with bovine serum albumin with the aim of developing an efficient biosensing system for the analysis of protein. *Talanta*, 132, 354 – 365.
- Gowda, B.; Mallappa, M.; Gowda, J. I.; Rengasamy, R. (2015). Interaction of ketoconazole with bovine serum albumin: electrochemical, spectroscopic and molecular modeling studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5, 37 – 44.
- Gowda, J.I.; Nandibewoor, S. T. (2014). Binding and conformational changes of human serum albumin upon interaction with 4-aminoantipyrine studied by spectroscopic methods and cyclic voltammetry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 124, 397 – 403.
- Hammami, A., Nouredine Raouafi, N., Mirsky, M. V. (2018). Electrically controlled Michael addition: Addressing of covalent immobilization of biological receptors. *Biosensors and Bioelectronics*, 121, 72–79.

- Hashemnia, S.; Fard, K. F.; Mokhtari, Z. (2022). A study of the interactions between ephedrine and human serum albumin based on spectroscopic, electrochemical and docking assessments. *Journal of Molecular Liquids*, 348, 118058.
- He, L.; Wang, X.; Lui, B.; Xu, R. (2012). Electrochemical behavior of promethazine hydrochloride and its interaction with bovine serum albumin. *Advanced Material Research*, 554-556, 450 – 453.
- He, J.; Yang, H.; Li, S.; Xu, K.; Wang, Q.; Huang, Y.; Li, H. (2016). Characterization of the interaction between acotiamide hydrochloride and human serum albumin: ¹H STD NMR spectroscopy, electrochemical measurement, and docking investigations. *RSC Advances*, 6(66), 61119 – 61128.
- Heli, H.; Sattarahmady, N.; Jabbari, A.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Hakimelahi, G. H.; Tsai, F. (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, 67 – 74.
- Holm, R.; Kennepohl, P.; Solomon, E. (1996). Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chemical Reviews*, 96(7), 2239 – 2314.
- Hu, Z.; Zhang, J.; Cheng, X. (2015). Antifungal efficiency of miconazole and econazole and the interaction with transport protein: a comparative study. *Pharmaceutical Biology*, 53(2), 251 – 261.
- Huang, S.; Zhu, F.; Xiao, Q.; Zhou, Q.; Su, W.; Hu, H. B.; Sheng, J.; Huang, C. (2014). Combined spectroscopy and cyclic voltammetry investigates the interaction between [(η⁶-p-cymene)Ru(benzaldehyde-N(4)-phenylthiosemicarbazone)Cl]Cl anticancer drug and human serum albumin. *RSC Advances*, 4(68), 36286 – 36300.
- Hui, N.; Niu, X.; Han, J.; Jiao, K. (2010). Voltammetric investigation on interaction of protein with chromotrope 2R and its analytical application. *Amino Acids*, 38(3), 711 – 719.

- Ipte, R.P.; Sahoo, S.; Satpati, K.A. (2019). Spectro-electrochemistry of ciprofloxacin and probing its interaction with bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry*, *130*, 107330.
- Khumsap, T.; Bamrungsap, S.; Thi, V. T.; Nguyen, L. T. (2021). Epitope-imprinted polydopamine electrochemical sensor for ovalbumin detection. *Bioelectrochemistry*, *140*, 107805.
- Leuna, M.J.; Sop, K.S.; Makota, S.; Njanja, E.; Ebelle, C.T.; Azebaze, G.A.; Ngameni, E.; Nassi, A. (2018). Voltammetric behavior of mammeisin (MA) at a glassy carbon electrode and its interaction with bovine serum albumin (BSA). *Bioelectrochemistry*, *119*, 20 – 25.
- Liang, J.; Han, F.; Chen, Y. (2012). An electrochemical method for high sensitive detection of nicotine and its interaction with bovine serum albumin. *Electrochemistry Communications*, *24*(1), 93 – 96.
- Lu, F.; Pan, J.; Liu, Y.; Zhang, H.; Guo, Y.; Wang, Y. (2006). Study on the interaction of bovine serum albumin with acid cyanine 5R and its application in analysis. *Biochemistry and Cell Biology*, *84*(1), 1 – 8.
- Mahanthappa, M.; Gowda, G.B.; Gowda, I. J.; Rengaswamy, R. (2016). Spectroscopic, voltammetry and molecular docking study of binding interaction of antipsychotic drug with bovine serum albumin. *Journal of Electrochemical Science and Engineering*, *6*(2), 155 – 164.
- Mallappa, M.; Savanur, A. M.; Gowda, G. B.; Vishwanth, R. S.; Puthusseri, B. (2019). Molecular interaction of hemorrheologic agent, pentoxifylline with bovine serum albumin: An approach to investigate the drug protein interaction using multispectroscopic, voltammetry and molecular modelling techniques. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, *233*(7), 973 – 994.
- Maurya, N.; Maurya, K. J.; Singh, K. U.; Dohare, R.; Zafaryab, M.; Rizvi, A. M. M.; Kumari, M.; Patel, R. (2019). In vitro cytotoxicity and interaction of noscapine with human serum albumin: Effect on structure and esterase activity of HSA. *Molecular Pharmaceutics*, *16*, 952 – 966.

- Mohani, B.; Arjmand, F. (2004). Template synthesis of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes derived from oxamide ligand and the reactivity of Cu(II) complex towards human serum albumin. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2(3-4), 225 – 235.
- Moman, R. N.; Gupta N.; Varacallo, M. (2021). Physiology, Albumin. En *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado el 12 de noviembre de 2021, de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>
- Naggar, A. H.; Kaoutit, E. M.; Rodríguez, N. I.; Sayed, A. Y.; Hidalgo de Cisneros, H. J. L. (2016). Voltammetric and spectroscopic investigation of the interaction between 1,4-benzodiazepines and bovine serum albumin. *Journal of Solution Chemistry*, 42(12), 1659 – 1678.
- Nasori, N.; Farahdina, U.; Zulfa, V. Z.; Firdhaus, M.; Aziz, I.; Darsono, D.; Cao, D.; Wang, Z.; Endarko, E.; Rubiyanto, A. (2021). A comparison between silver nanosquare arrays and silver thin-films as a blood cancer prognosis monitoring electrode design using optical and electrochemical characterization. *Nanomaterials*, 11, 3108.
- Ni, Y.; Zhang, X.; Kokot, S. (2009). Spectrometric and voltammetric studies of the interaction between quercetin and bovine serum albumin using warfarin as site marker with the aid of chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5), 1865 – 1872.
- Özdemir, S.; Bicer, E. (2016). Temperature effect on binding affinity and stoichiometry between some steroids and human serum albumin. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 61(1), 2809-2815.
- Ozkan, S. A.; Kauffmann, J.; Zuman, P. (2015). Electroanalytical techniques most frequently used in drug analysis (pp 45-82). En *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. Berlin: Springer.
- Rezaeinasab, M.; Benvidi, A.; Gharaghani, S.; Zare, R. H. (2019). Chemometrics approaches based on electrochemical methods for the investigation of interaction between bovine

- serum albumin and carvacrol with the aim of its application to protein sensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 845, 48-56.
- Roat-Malone, M. R. (2002). *Bioinorganic chemistry: a short course*. Hoboken: Wiley-Interscience.
- Sargent, A.; Loi, T.; Gal, S.; Sadik, A. O. (1999). The electrochemistry of antibody-modified conducting polymer electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 470, 144-156.
- Shahabadi, N.; Nemati, L. (2014). Multispectroscopic studies on the interaction of a platinum(II) complex containing L-histidine and 1,10-phenanthroline ligands with bovine serum albumin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(6), 2800-2814.
- Shearan, P.; Fernández, A. J. M; Smyth, R. M. (1990). Adsorptive voltametric investigation of the interaction of cisplatin with cystine and human serum albumin. *Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis*, 8(7), 555-561.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler F. J.; Crouch S. R. (2015). *Fundamentos de Química Analítica* (9a ed.). México: Cengage Learning, pp 610 - 648.
- Solomon, P. E.; Berg R. L.; Martin, W. D. (2021). *Conceptos fundamentales de biología*. México: Cengage Learning.
- Sugio, S.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kashima, A. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, 12(6), 439-446.
- Sun, W.; Jiao, K.; Wang, X.; Lu, L. (2005). Electrochemical studies of the reaction between albumin and amaranth and its analytical application. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 578, 37-43.
- Sun, W.; Han, J.; Jiao, K.; Lu, L. (2006). Studies on the interaction of protein with acid chrome blue K by electrochemical method and its analytical application. *Bioelectrochemistry*, 68, 60-66.
- Sun, W.; Jiao, K.; Han, J.; Zhao, C. (2006). A linear sweep voltammetric determination of proteins with thiorin. *Acta Chimica Slovenica*, 53(3), 367-373.

- Surucu, O.; Abaci, S. (2017). Electrochemical studies on the interaction between (E)-4-((6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)diazanyl)-N-phenylaniline (MBDPA) and bovine serum albumin. *Chemistry Select*, 2(2), 707-713.
- Unal, N. D.; Erkmen, C.; Selcuk, O.; Kurbanoglu, S.; Eren, G.; Uslu, B. (2022). Phosphodiesterase-3 enzyme inhibitor drug milrinone interaction with DNA and HAS: Electrochemical, spectroscopic and molecular docking. *Journal of The Electrochemical Society*, 169, 027521.
- Voet, D.; Voet, G. J.; Pratt, W. C. (2009). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular* (2a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Wu, Y.; Ji, X.; Hu, S. (2004). Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry*, 64, 91-97.
- Yang, J.; Zhang, D.; Wang, L.; Long, Na.; Zhang, M.; Zhang, L. (2015). An electrochemical method for high sensitive detection of thiabendazole and its interaction with human serum albumin. *Food Analytical Methods*, 8(2), 507-514.
- Zhang, Q.; Zhu, Z.; Ni, Y. (2020). Interaction between aspirin and vitamin C with human serum albumin as binary and ternary systems. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 236, 118356.
- Zhong, K.; Xia, J.; Wei, W.; Hu, Y.; Tao, H.; Liu W. (2005). A kinetic model and its parameter estimation for the process of binding copper to human serum albumin by a voltammetric method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(8), 1552-1557.