



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO PARA LA DETECCIÓN  
ELECTROQUÍMICA INDIRECTA DE TRANSFERRINA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Alfredo de Jesús Hernández Martínez

Dr. Julio César Aguilar Cordero

Facultad de Química, UNAM

CDMX. Ciudad Universitaria, junio 2022



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO PARA LA DETECCIÓN  
ELECTROQUÍMICA INDIRECTA DE TRANSFERRINA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. Alfredo de Jesús Hernández Martínez

Dr. Julio César Aguilar Cordero

Facultad de Química, UNAM



CDMX. Ciudad Universitaria, junio 2022

## Índice

Agradecimientos	1
1 Introducción	2
1.1 El papel fisiológico del hierro	3
1.2 Transferrina	5
1.3 Detección de transferrina en el suero sanguíneo: Ensayos típicos	7
1.4 Sensores electroquímicos con lectinas	9
2 Justificación	10
2.1 Objetivos	10
3 Metodología	11
3.1 Preparación de electrodos de carbón vítreo	11
3.2 Modificación de electrodos de carbón vítreo oxidados con Concanavalina A	12
4. Análisis y resultados	13
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía	21

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al CONACYT por la beca otorgada (CVU 894091) durante toda mi permanencia en la Maestría en Ciencias Químicas, la cual me permitió concluir satisfactoriamente el presente proyecto.

También quiero agradecer a los sinodales, que se dieron el tiempo de leer y corregir este escrito. Al Dr. José Luz Gonzales Chávez, al Dr. Bernardo Antonio Fontana Uribe, a la Dra. María Teresa Ramírez Silva, al Dr. Edgar Borja Arco y al Dr. Arturo de Jesús García Mendoza, a quienes le agradezco enormemente su tiempo.

De la misma manera quiero agradecer al Dr. Julio César Aguilar Cordero por abrirme las puertas de su laboratorio y por su apoyo tanto en este proyecto, como en el día a día. A mis compañeros del laboratorio porque siempre disfruto de su compañía.

## 1 Introducción

En el año de 1932 se demostró la participación del hierro en la síntesis de hemoglobina (Worwood, M., 2006; Saito H., 2014), proteína responsable del transporte de oxígeno en sangre. Esto hizo evidente que el hierro es un elemento necesario para la vida de los mamíferos, aunque puede ser tóxico a través de distintos mecanismos. Por ejemplo, la disminución de los niveles de hierro en un organismo por debajo de un valor dado produce anemia (la destrucción o producción insuficiente de glóbulos rojos), mientras que un exceso de hierro puede causar daño oxidativo, a través de reacciones del hierro con el oxígeno y la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno, tales como el ion superóxido o el peróxido de hidrógeno.

El mecanismo biológico de incorporación del hierro al cuerpo inicia en el intestino, donde es transportado por los tejidos con ayuda de la transferrina (MacKenzie, E., et al, 2008; Saito H., 2014), una proteína de transporte específico de hierro en el plasma sanguíneo. La transferrina es una glicoproteína que en los humanos posee una masa molecular de cerca de los 76 kDa. Aproximadamente el 30 % de los sitios de unión totales acumulados en las moléculas de transferrina están ocupados con iones  $Fe^{III+}$  (Montreuil, J., et al, 1997). Cuando no está unida al hierro, se le llama apotransferrina, mientras que en la forma con hierro es conocida como holotransferrina. Los receptores de transferrina en la célula son las membranas glicoproteicas, y ciertos tipos de glicoproteínas como las lectinas pueden usarse para identificar a la transferrina de forma selectiva (Zeng, X., et al, 2011; Lam, S. K., & Ng, T. B., 2011; Belicky, T, et al, 2016).

La identificación y cuantificación de transferrina en el suero puede usarse para caracterizar desórdenes principalmente inflamatorios como los que se presentan durante cuadros de COVID-19, es útil al diagnóstico de neuropatías como el Alzheimer (Connor, J. R., et al, 1992), además de servir como identificador de otros desórdenes en el metabolismo como la anemia (Saito H., 2014; Worwood, M., 2006). Debido a esto, en el presente proyecto se plantea el estudio y desarrollo de sensores electroquímicos caracterizados por la técnica de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés), haciendo uso de electrodos modificados con lectinas, para detectar y cuantificar transferrina en suero, a fin de poder evaluar la factibilidad de emplearlos como herramientas en estudios clínicos para auxiliar en el diagnóstico de diversas condiciones de salud.

## 1.1 El papel fisiológico del hierro

El hierro tiene presencia en varios procesos enzimáticos que no están directamente relacionados con la sangre. El más relevante de ellos suele ser el proceso de transporte de electrones en la mitocondria a través de los clusters de hierro-azufre (MacKenzie, E., et al, 2008). Este elemento no solamente es capaz de manifestarse a través de complejos enzimáticos, sino que también existe dentro de las células de los mamíferos en forma iónica ( $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$ ), donde se le conoce como piscina de hierro (*labile iron pool*, en inglés), una especie de almacén de hierro que está compuesto de iones de hierro libres listos para asociarse a proteínas u organelos (Worwood, M., 2006; MacKenzie, E., et al, 2008).

El viaje del hierro inicia en el intestino delgado, donde se establecen las condiciones que permiten que este metal se encuentre en la forma química adecuada ( $Fe^{II+}$  o  $Fe^{III+}$ ) para introducirse al organismo (Worwood, M., 2006; Nemeth, E., & Ganz, T., 2009). En caso de que el hierro se encuentre como  $Fe^{III+}$ , debe ser reducido en la membrana duodenal por una ferrireductasa, en un proceso mediado por un transportador de iones divalentes que lo llevará a través de la membrana (Nemeth, E., & Ganz, T., 2009). A partir de ahí, el hierro tiene dos destinos posibles: transportarse y almacenarse o transportarse para su incorporación a procesos de síntesis de proteínas. Si debe almacenarse su destino, la responsable de hacerlo es una proteína llamada ferritina o hemosiderina (forma insoluble de la ferritina). En cualquier caso, el hierro debe asociarse primero a la transferrina, que es una proteína que lo introducirá al plasma sanguíneo. Los procesos de absorción de hierro y tanto su almacenamiento como transporte, están mediados por la transcripción de ferritina y de proteínas receptoras de transferrina. La regulación de este proceso ocurre en la célula, a través de proteínas reguladoras de hierro, cuya función es asociarse con el m-RNA para impedir la transcripción de las regiones que están asociadas con la síntesis de ferritina y los receptores de transferrina (Worwood, M., 2006; Nemeth, E., & Ganz, T., 2009).

Estas proteínas reguladoras del metabolismo del hierro responden naturalmente a los niveles de hierro, en especial al hierro libre intracelular (Nemeth, E., & Ganz, T., 2009; MacKenzie, E., et al, 2008; Bhagavan, N. V., & Ha, C.-E., 2015). Existe además una hormona reguladora de hierro en el plasma, llamada hepcidina, y su receptor correspondiente, la ferroportina. Como puede verse en la figura 1, el papel de la hepcidina es el de coordinar principalmente el ingreso del hierro al organismo, el transporte plasmático y su almacenamiento (Nemeth, E., & Ganz, T., 2009; Bhagavan, N. V., & Ha, C.-E., 2015). Ésta es una hormona segregada por el hígado, y su concentración en el organismo varía respondiendo a estímulos característicos, en relación con las concentraciones de las proteínas relativas al hierro y con las cantidades de hierro libre presentes en el organismo (Worwood, M., 2006; Nemeth, E., & Ganz, T., 2009).

Las interacciones entre la transferrina plasmática, los receptores de transferrina y la proteína de hemocromatosis humana influyen en la expresión celular de hepcidina (Nemeth, E., & Ganz, T., 2009). La regulación de la hepcidina también está relacionada con los procesos de producción de glóbulos rojos (eritropoyesis) y con procesos inflamatorios como puede verse en la figura 1.

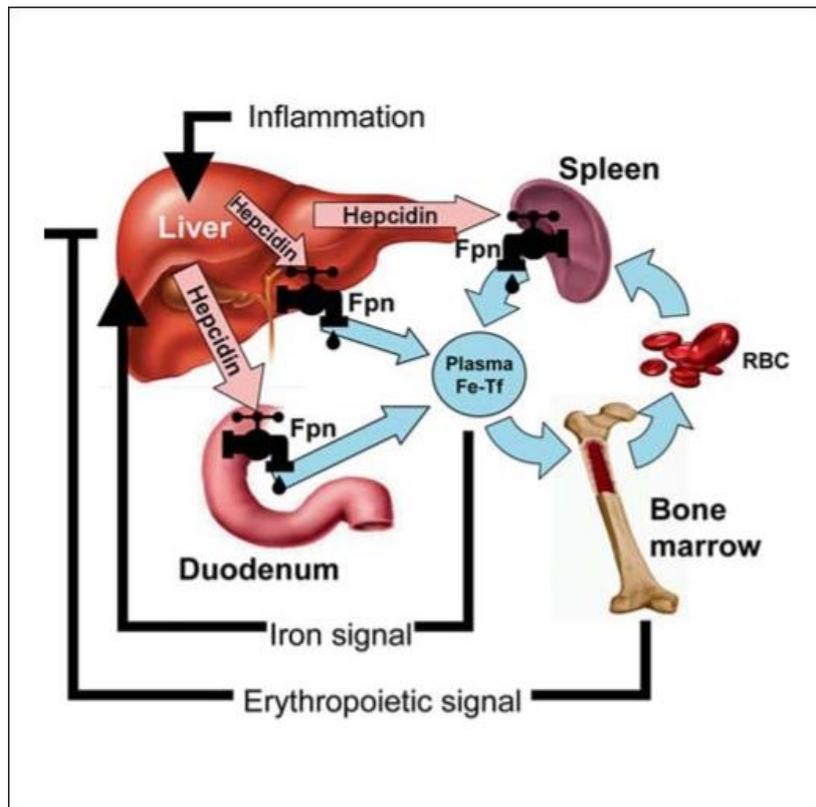


Figura 1. Homeostasis del hierro. La interacción hepcidina-ferroportina (Fpn) determina el flujo de hierro al plasma. La concentración de hepcidina, a su vez, está regulada por el hierro, la actividad eritropoyética y la inflamación. Imagen recuperada de Nemeth, E., & Ganz, T. (2009).

Los niveles plasmáticos de hierro respecto a otros tejidos son relativamente bajos, como puede verse en la tabla 1, pero son la clave en la homeostasis de este metal en el organismo. Esto es importante debido a que una cierta cantidad de transferrina es utilizada para hacer llegar el hierro a los eritrocitos inmaduros para la síntesis de porfirinas, un proceso complejo que es usualmente llamado síntesis del hemo (Bhagavan, N. V., & Ha, C.-E., 2015). Algunas de estas porfirinas eventualmente se convertirán en hemoglobina, que es la proteína responsable del transporte de oxígeno en sangre en los mamíferos, mientras que otras se transformarán en mioglobina, que es una proteína similar a la hemoglobina, responsable del transporte de oxígeno a los músculos (Worwood, M., 2006).

Los ensayos clínicos que estiman la concentración de transferrina en el suero usualmente relacionan la cantidad total de hierro (que proviene de varias fuentes) con la capacidad de saturación de la proteína (Pfeiffer, C. M., & Looker, A. C., 2017). Estimar estos niveles de concentración es importante, pues puede ayudar en el diagnóstico clínico de principalmente deficiencia y envenenamiento por hierro, y en el futuro se busca utilizarlo en el diagnóstico de diabetes, accidentes cerebrovasculares y trastornos por estrés oxidativo (Elsayed, M. E., et al, 2016).

Tabla 1. Distribución de hierro en un adulto de 70 kg. Adaptada de Worwood, M. (2006).

Proteína	Ubicación	Contenido de hierro [mg]
Hemoglobina	Glóbulos rojos	3 000
Mioglobina	Músculos	400
Citocromo y proteínas con hierro-azufre	Todos los tejidos	50
Transferrina	Suero y fluidos extravasculares	5
Ferritina y Hemosiderina	Hígado, bazo y médula ósea	100 - 1 000

La cantidad de hierro en el organismo responde a muchos factores, desde la edad y la dieta hasta el sexo del individuo, de ahí la dificultad de usar a la transferrina y ferritina como biomarcadores (Elsayed, M. E., et al, 2016). En la tabla 1 se puede ver la distribución de hierro en un hombre adulto de 70 kg, alrededor de 1 800 mg de hierro componen a los eritrocitos, es decir a los glóbulos rojos en la sangre. El tejido parenquimático del hígado, la médula y el bazo, contienen gran cantidad de hierro, alrededor de 1 000 mg. La mioglobina dispone de 400 mg, distribuidos en los músculos. Por otro lado, se ve que sólo 5 mg de hierro están asociados al transporte mediante transferrina en el plasma. Estas cantidades se mantienen así gracias a que el organismo recicla continuamente el hierro (Worwood, M., 2006). Sin embargo, es posible perder cierta cantidad de este metal a través de la erosión de las células del duodeno. Cabe señalar que no existen rutas fisiológicas para perder hierro en el ser humano, pero puede perderse a través del sangrado, la menstruación o durante el embarazo (Worwood, M., 2006).

## 1.2 Transferrina

La transferrina es una proteína humana con contenido de hierro, pero no relacionada al hemo, que fue descubierta en 1925 y aislada hasta 1952, cuando se reportó el primer cristal de serotransferrina (Montreuil, J., et al, 1997). El nombre de transferrina se propuso en el año de 1947 por Laurell e Ingelman, quienes trabajaban aislando una proteína del plasma sanguíneo de cerdos a la que llamaron transferrina, a partir de entonces se adoptó el nombre para designar a esta familia de proteínas, entre las que se encuentran la serotransferrina, la ovotransferrina, la lactotransferrina y la melanotransferrina (Elsayed, M. E., et al, 2016).

Esta familia de glicoproteínas, usualmente biglobulares, está presente en fluidos corporales de varios animales vertebrados e invertebrados. Además de compartir estructuras similares, que coinciden en alrededor de entre 60-80 % en la secuencia de los aminoácidos, la característica más importante de las transferrinas es que tienen la capacidad de enlazar de forma reversible átomos de hierro (Montreuil, J., et al, 1997; Elsayed, M. E., et al, 2016).

La transferrina o siderofilina en humanos puede encontrarse en el suero sanguíneo (serotransferrina), en el fluido cerebroespinal y en el semen. Este polipéptido es producido en gran parte por los hepatocitos (Montreuil, J., et al, 1997). El papel de la transferrina es el transporte vascular y linfático de hierro, y en ciertas ocasiones el cuerpo humano lo utiliza como refuerzo del sistema inmunológico, pues se aprovecha la capacidad de la proteína de capturar hierro para promover un ambiente hostil que reduzca la capacidad de reproducción de microorganismos (Montreuil, J., et al, 1997).

Estructuralmente, la transferrina es una glicoproteína que tiene una masa molecular de 79.57 kDa. Está compuesta por una porción de proteína que consta de 679 residuos de aminoácidos y dos residuos de carbohidratos ligados a asparaginas (Elsayed, M. E., et al, 2016). En ella se distinguen dos lóbulos como se muestra en la figura 2, cada uno de ellos es designado como N-terminal y C-Terminal. Entre los subdominios de cada lóbulo hay una región que es capaz de unir un ion de  $Fe^{3+}$ , la afinidad de enlace a este ion es más alta para el lóbulo N-terminal. Las zonas de coordinación incluyen dos residuos de tirosina, uno de histidina y un residuo de ácido aspártico, y la formación del complejo de coordinación al interior del lóbulo está promovido por un efecto sinérgico de iones carbonato (Harris, W. R., 2012).

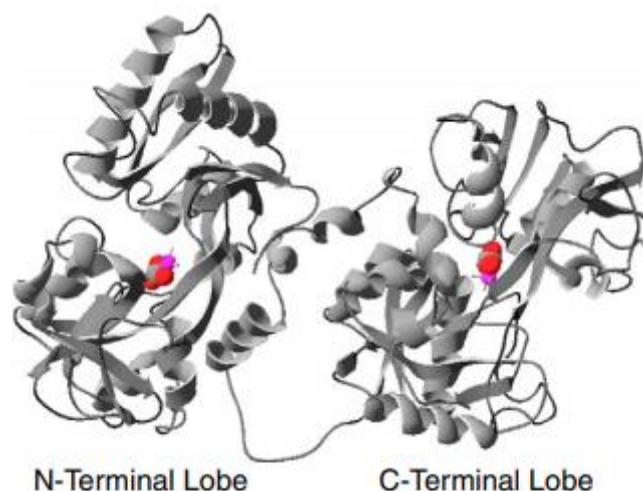
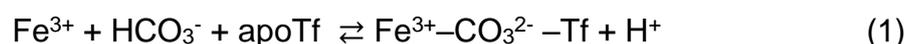


Figura 2. Estructura de la proteína serotransferrina diférrica. Recuperada de Harris, W. R. (2012).

Los iones carbonato participan en el complejo formado ocupando un par de sitios de coordinación y estabilizando las cargas al interior del sitio de unión del hierro. El equilibrio total que describe la formación de este complejo en uno de los lóbulos es el siguiente:



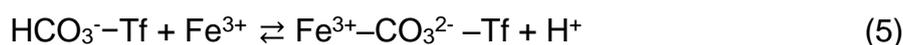
$$K_M = [Fe^{3+}-CO_3^{2-}-Tf][H^+] / [Fe^{3+}][apoTf][HCO_3^-] \quad (2)$$

Donde  $K_M$  es la constante de equilibrio de formación del complejo. La apoTf es la transferrina libre sin hierro, también llamada apotransferrina, y  $Fe^{3+}-CO_3^{2-}-Tf$  es el complejo formado entre la transferrina, un ion carbonato y un ion de hierro (III). En este caso el equilibrio colateral es el que pueden promover los carbonatos ácidos con la apotransferrina, y está dada por la siguiente reacción:



$$K_c = [HCO_3^- - Tf] / [apoTf][HCO_3^-] \quad (4)$$

Por lo tanto, es posible reescribir la reacción en términos del equilibrio condicional.



$$K' = [Fe^{3+}-CO_3^{2-}-Tf][H^+] / [Fe^{3+}][Tf^*] \quad (6)$$

donde  $[Tf^*] = [apoTf] + [HCO_3^- - Tf]$ . La reacción se propone por definición a pH fisiológico de 7.4, por lo que no se suele incluir el término  $[H^+]$  como una variable en el equilibrio. Es fácil ver que también es posible escribir la fracción  $HCO_3^- - Tf$  en términos de la concentración de apoTf.

$$\phi = K_c [apoTf] / [1 + K_c [apoTf]] \quad (7)$$

Por lo tanto, resulta que  $\log K' = \log K_M + \log \alpha$ , los valores de  $K'$  están reportados a concentraciones de  $HCO_3^-$  de entre 5 a 15 mM y con exceso de apotransferrina. El valor de  $K_M$  para el  $Fe^{3+}$  es de  $10^{22}$  M. Otros valores reportados son  $10^{13.7}$  M para el  $Al^{3+}$ ,  $10^{9.2}$  M para el  $Gd^{3+}$  y  $10^{7.4}$  M para el  $Zn^{2+}$  (Harris, W. R., 2012).

### 1.3 Detección de transferrina en el suero sanguíneo: Ensayos típicos

Las características específicas, así como las técnicas analíticas empleadas en los ensayos clínicos relacionados a la determinación de hierro en el suero sanguíneo pueden variar, dependiendo del tipo de equipos utilizados y los reactivos (Pfeiffer, C. M., & Looker, A. C., 2017). Estos ensayos son normalmente colorimétricos y las muestras de suero deben ser procesadas para estimar directamente la cantidad de hierro total y la capacidad de la transferrina de asociarse con iones de hierro (Worwood, M., 2006). Entre los principios de funcionamiento de los ensayos puede requerirse que el hierro reaccione directamente con otras sustancias para ser identificado o el ensayo puede ser inmunológico (haciendo uso de anticuerpos específicos) cuando se desea estimar la presencia directamente de proteínas.

Para determinar la cantidad del elemento hierro, se han definido tres parámetros que ayudan a estimar la carga de hierro en el organismo: cantidad de hierro sérico total, capacidad total de unión a hierro y capacidad latente de unión a hierro (Elsayed, M. E., et al, 2016). Los ensayos para determinar estos parámetros requieren la desnaturalización de las proteínas en la muestra sérica y de esta forma, el hierro libre puede formar compuestos de coordinación coloridos que sean detectados mediante espectrofotometría UV-Vis (Pfeiffer, C. M., & Looker, A. C., 2017; Worwood, M., 2006).

La cantidad de hierro se estima a través de la absorbancia de la muestra y un reactivo estándar a la longitud de onda de máxima absorción del complejo. El ligante usado comúnmente es la sal monosódica del [3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenil sulfónico)-1,2,4-triazina, que también es conocido como FerroZine. Este ligante forma complejos octaédricos de color morado con el hierro (II), como los que pueden verse en la figura 3. Tras procesar la muestra completamente y determinar la cantidad de hierro en el suero, se obtiene el parámetro de cantidad de hierro sérico total (Worwood, M., 2006).

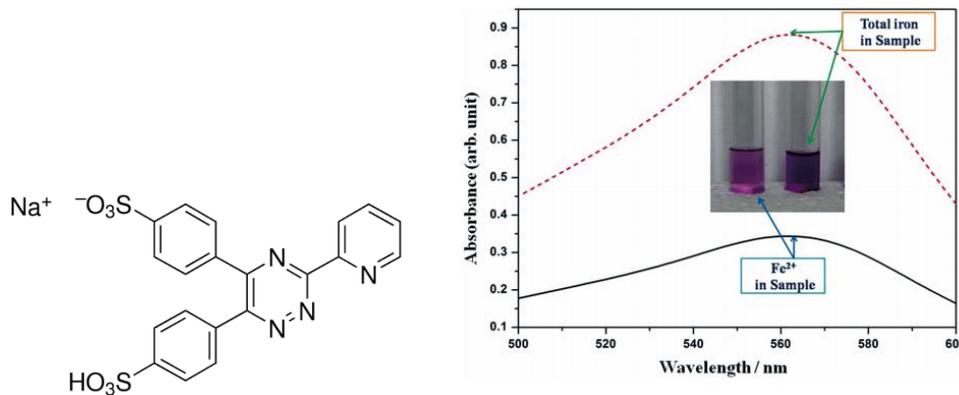


Figura 3. FerroZine, espectro UV-Vis del complejo con hierro y celdas para espectrofotómetro con el compuesto de coordinación. Recuperada De Mandal, B., Sinha, P. K., Sen, R., & Mandal, A. K. (2016).

Para la determinación de la capacidad latente de unión al hierro, se determina la cantidad de hierro máxima que puede formar complejos con las proteínas de suero sanguíneo. Esto incluye también a aquellas que en principio no están formando complejos. El método exige que se agregue un exceso de hierro a la muestra del suero, permitir que la mezcla llegue al equilibrio y posteriormente se elimina el hierro que no reacciona. Una vez eliminado el residuo, se procesa la muestra como si se fuera a determinar el hierro sérico total. La capacidad total de unión a hierro es la suma de la cantidad latente y del hierro sérico.

Los parámetros de hierro sérico total y capacidad de unión de hierro son importantes para el diagnóstico de la deficiencia de hierro o de sobrecarga, así como en otras condiciones clínicas como cirrosis o COVID-19 (Pfeiffer, C. M., & Looker, A. C., 2017; Elsayed, M. E., et al, 2016; Claise, C., et al, 2022).

## 1.4 Sensores electroquímicos con lectinas

Los ensayos clínicos típicos para la determinación de hierro total en el suero requieren principalmente desnaturalizar las proteínas de la muestra para medir las cantidades de este elemento en ella. Una alternativa que se ha estado planteando en los últimos años es emplear las bases de los ensayos inmunológicos orientados hacia el área de electroquímica para diseñar electrodos cuya superficie sea afín a transferrina y que permitan la determinación electroquímica en muestras de suero humano.

Este diseño se puede abordar principalmente de dos formas: a través de anticuerpos específicos a la transferrina, o usando proteínas de reconocimiento como las lectinas. En ambos casos, lo más común es que se haga una determinación indirecta, es decir, se hace uso de un indicador electroquímico, como el ferricianuro de potasio o el cloruro de hexaaminrutenio(III) (Ganesh, V., et al, 2006). La señal electroquímica cambia en función del grado de cobertura de la superficie de los electrodos, por lo que el cambio de la señal es proporcional a la cantidad de proteína en la muestra.

Las lectinas son proteínas que se unen a azúcares de forma selectiva. Una característica representativa de las lectinas es que son proteínas con la capacidad de aglutinarse, a mediados del siglo XX, se descubrió que tal propiedad podía ser utilizada para distinguir eritrocitos de distintos tipos de sangre (Espino-Solis, G. P., 2015). Las lectinas también son bien conocidas como receptores, pues son capaces de asociarse selectivamente con azúcares, por lo que están involucradas en los procesos de reconocimiento o la adhesión a otras proteínas o biomoléculas (Lam, S. K., & Ng, T. B., 2011). Dada su capacidad de reconocer selectivamente algunos azúcares, estas proteínas han sido utilizadas ampliamente en métodos analíticos de determinación de sacáridos y de proteínas glicosiladas (Abrantes-Coutinho, V. E., et al, 2021). Como se observa en la figura 4, es común que se haga uso de cromóforos o fluoróforos que permitan la cuantificación, aunque también se tienen reportados una amplia variedad de sensores electroquímicos basado en lectinas, de los que se presentan dos tipos: uno donde la glicoproteína o el glicósido están fijados en una superficie y es la lectina en disolución la que interactúa en la interfase (figura 4 B y C), y el otro tipo es donde la lectina se fija a la superficie (figura 4 A) y la glicoproteína es la que interactúa con la interfase.

En el caso de sensores para la determinación de muestras en disolución, es más simple fijar un exceso de la lectina en la interfase y variar la concentración de sustratos en las disoluciones. Por otro lado, los electrodos modificados con lectinas se pueden obtener de dos formas: promoviendo una interacción electrostática o una covalente de la lectina con la superficie del electrodo.

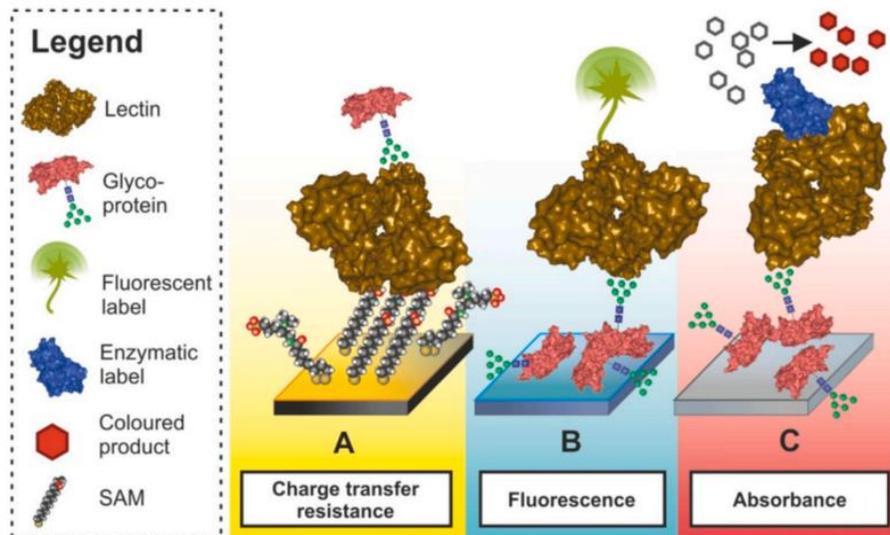


Figura 4. Esquema general del uso de lectinas en sensores. Recuperada de Abrantes-Coutinho, V. E., Santos, A. O., Moura, R. B., Pereira-Junior, F. N., Mascaró, L. H., Morais, S., & Oliveira, T. (2021).

Los depósitos de lectinas por interacciones electrostáticas tienen la desventaja de que no se tiene control sobre la orientación ni por la cantidad de proteína depositada, lo que puede reducir seriamente la actividad de la proteína (Alava, T., et al, 2013). Sin embargo, es un método muy simple y que puede no requerir de más reactivos que la lectina misma.

En el caso de los depósitos por interacción covalente, se requiere que entre la superficie del electrodo y la proteína ocurra una reacción de entrecruzamiento, normalmente promovida por reacciones con carbodiimidas y sus ésteres (Filip, J., et al, 2017). En éstos se puede promover que el polipéptido retenga la actividad, debido a un mejor control en la orientación de las proteínas, ya que el sitio de enlace siempre es el mismo (Zhang, H., et al, 2020; Alava, T., et al, 2013), el residuo de amina y la reacción promueve la formación de una monocapa de proteína. Se deben encontrar las condiciones que permitan la reacción química entre la superficie modificada y la lectina.

La concanavalina A (ConA) es una lectina de 104 kDa que se encuentra normalmente formando un tetrámero a valores de pH de entre 6 y 7.4 (Senear, D. F., & Teller, D. C., 1981). La ConA es afín a residuos de glucosa y manosa (Farina, R. D., & Wilkins, R. G., 1980), por lo que ha sido ampliamente utilizada en sensores electroquímicos de glucosa (Ye, C., et al, 2015), invertasa (Filip, J., et al, 2017), glucooxidasa y dextrano (Liu, X., et al, 2014), ovoalbúmina (Vargová, V., et al, 2016), algunos derivados de manosa (Bhattarai, J. K., et al, 2016), y también para microorganismos como el E.coli (Cimafonte, M., et al, 2020). Además, está reportado que la ConA en disolución tiene afinidad por la transferrina (Mislovičová, D., et al, 2012), por lo que sería posible pensar en la posibilidad de desarrollar un sensor electroquímico de transferrina con base en esta lectina.

## 2 Justificación

Con la invención del glucómetro portátil, y con ello de los sensores electroquímicos de glucosa, fue evidente que ya no era necesario procesar toda una muestra de sangre en un laboratorio para determinar la cantidad de azúcar en sangre de un paciente. Dando paso a toda un área de oportunidad en el ámbito del análisis químico, los sensores clínicos portátiles.

Por su parte, la cantidad de hierro en el suero humano es también un indicador de un número muy amplio de enfermedades y padecimientos, por lo que la investigación y desarrollo de un sensor electroquímico de hierro como el que se plantea en este trabajo podría tener un impacto en el tratamiento y pronta atención de enfermedades como la anemia, el alzhéimer, la cirrosis o el COVID-19. Además, en la literatura existen reportados una gran cantidad de electrodos de carbón vítreo modificados con lectinas, pero en ninguna de estas investigaciones se utiliza a la transferrina como una medida indirecta de la cantidad de hierro en el suero humano.

### 2.1 Objetivos

General

Desarrollar un electrodo que permita la detección y cuantificación de transferrina con base en electrodos de carbón vítreo modificados con ConA.

Particulares

1. Estudiar y desarrollar métodos de modificación de electrodos de carbón vítreo utilizando la lectina Con A.
2. Estudiar el comportamiento electroquímico del ion hexacianoferrato(II/III) sobre los electrodos de carbón vítreo modificados con ConA.
3. Estudiar la interacción de la transferrina con los electrodos de carbón vítreo modificados con ConA mediante técnicas electroquímicas.

## 3 Metodología

### 3.1 Preparación de electrodos de carbón vítreo

Se pule el electrodo de disco de 3 mm de diámetro con una suspensión de alúmina de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro por 2 min; enseguida se enjuaga el electrodo con agua desionizada (de resistividad igual a 18.2  $\text{M}\Omega\text{ cm}$ ) y se sumergió en un baño ultrasónico en agua desionizada por 1 min.

Posteriormente, el electrodo fue sometido a un proceso de electrooxidación mediante un pulso de cronoamperométrico a un potencial de +1.65 V vs  $\text{Ag}^0/\text{AgCl}_{(s)}$  en una disolución de 0.5 mol  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  por un periodo de 15 min. Al concluir este tratamiento, el electrodo se enjuagó con abundante agua desionizada.

### 3.2 Modificación de electrodos de carbón vítreo oxidados con ConA

Se prepara una disolución de 1 g L<sup>-1</sup> ConA, en 10 mmol L<sup>-1</sup> de fosfatos pH igual a 7.4, debe considerarse su agitación vigorosamente con ayuda de un plato de agitación magnético. Las disoluciones se almacenaron en frascos de polietileno dentro del refrigerador a 4 °C. En estas condiciones son útiles hasta por 10 días.

*Para modificación de los electrodos de carbón vítreo por adsorción:* Se colocaron 40 µL de la disolución de ConA por 1 h en un electrodo recién oxidado, que finalmente se enjuagó con la disolución de buffer de fosfatos.

*Para modificación de los electrodos de carbón por crosslinking:* Se pesaron 17 mg de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y 25 mg de clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (EDC-HCl), y se disolvieron en 3 mL de disolución buffer de morfolinoetansulfonato (MES) 10 mmol L<sup>-1</sup> a un valor de pH igual a 5.5. Se sumergió el electrodo en la disolución por 20 min y después se lavó con la disolución buffer de MES. Inmediatamente se colocan 40 µL de la disolución de ConA por 1 h en el electrodo, y finalmente se enjuaga con buffer de fosfatos.

En el caso de las disoluciones de la transferrina fueron preparadas a partir de una disolución stock de 206 µg mL<sup>-1</sup>, y en el caso de la glucosa fueron preparadas a partir de una disolución comercial al 5 % de glucosa. Todas las diluciones fueron realizadas utilizando una disolución de buffer de fosfatos 10 mmol L<sup>-1</sup> de pH igual a 7.4.

Los estudios voltamperométricos de los electrodos de carbón vítreo prístinos, los electrodos de óxido de carbón vítreo (OCV) y los electrodos modificados con la lectina (OCV/ConA) se realizan en una disolución 10 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] en 0.15 mol L<sup>-1</sup> NaCl y buffer 10 mmol L<sup>-1</sup> de fosfatos pH igual a 7.4 como electrolito soporte, a una velocidad de barrido de 100 mV s<sup>-1</sup>. De acuerdo con los experimentos de impedancia, la resistencia la disolución con la sonda redox es normalmente de entre 75 a 80 Ω, se considera suficientemente baja para no compensar por caída óhmica ninguno de los voltamperogramas realizado.

El análisis de espectroscopía de impedancia electroquímica para los electrodos de óxido de carbón vítreo (OCV), los electrodos modificados con la lectina (OCV/ConA) y los electrodos modificados que fueron incubados en transferrina y glucosa, se utiliza disolución 10 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] en 0.15 mol L<sup>-1</sup> NaCl y buffer 10 mmol L<sup>-1</sup> de fosfatos a pH igual a 7.4 como electrolito soporte. Con una amplitud en la señal de 5 mV, entre 50 kHz a 0.01 Hz, con el propósito de hacer más rápida la captura datos se usan 3 frecuencias por década. Para hacer los ajustes de los circuitos equivalentes se utilizó la herramienta de análisis de datos del programa PSTrace versión 1.59. En el ajuste de los circuitos equivalentes, la suma de cuadrados ( $\chi^2$ ) es de 5×10<sup>-4</sup> para los electrodos OCV y OCV/ConA (con interacción covalente), mientras que es de 2×10<sup>-4</sup> para el electrodo con interacción electrostática.

#### 4. Análisis y resultados

La figura 5 muestra el cronoamperograma de un electrodo de carbón vítreo durante el proceso de oxidación. En ésta se puede observar, que la corriente decae en función del tiempo hasta cerca de los 200 s, cuando comienza a aumentar gradualmente. El incremento observado se debe a que la oxidación del electrodo procede al mismo tiempo que la reacción de evolución de oxígeno (Yi, Y., et al, 2017). Así, el oxígeno molecular es consumido en la oxidación del carbón vítreo, lo que da como resultado un gradiente de protones en la interfase de electrodo debido a la reacción de evolución de oxígeno, que promueve un incremento en la corriente de oxidación. Con la oxidación del electrodo de carbón vítreo (figura 5) se obtiene un material llamado óxido de carbón vítreo (OCV), que tiene propiedades similares a las del óxido de grafeno (Santhiago, M., Maroneze, C. M., et al, 2015). Por esta razón, estos electrodos fueron usados como anclaje de la ConA al electrodo, a través de una reacción de entrecruzamiento con carbodiimida (EDC) e hidroxisuccinimida (NHS) de los grupos carboxilato en la superficie y el residuo N terminal de la proteína, en un protocolo similar al propuesto por Klukova (2016).

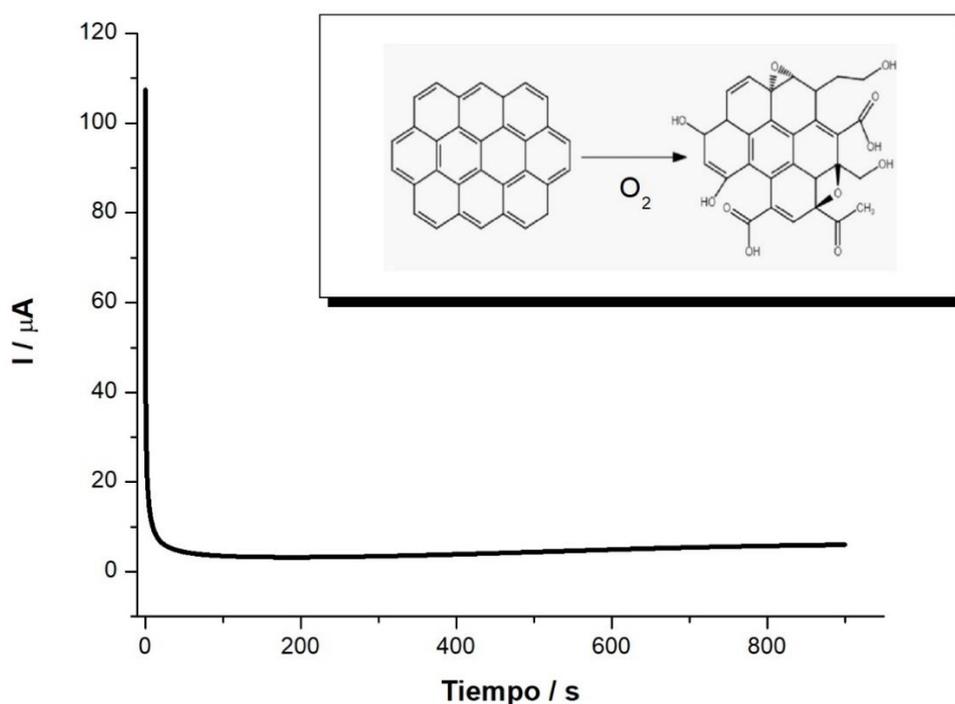


Figura 5. Cronoamperograma obtenido de un electrodo de carbón vítreo en una disolución  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido sulfúrico a un potencial de  $+1.65 \text{ V vs Ag}^0/\text{AgCl}_{(s)}$ . Se inserta el esquema general de la reacción de oxidación del carbón vítreo a OCV.

Dado que los electrodos modificados con lectinas no presentan por sí mismos actividad electroquímica, una práctica ampliamente extendida es el uso de sondas redox, como el hexacianoferrato(II/III) de potasio, que permitan el seguir los cambios de la interfase del electrodo (Abrantes-Coutinho, et al., 2021). Por lo que los datos obtenidos de las técnicas electroquímicas no son propiamente los de la superficie modificada, si no, de la sonda redox y normalmente se comparan los resultados de los electrodos prístinos y modificados con el fin de entender cómo es que la sonda

redox interactúa con la interfase y de cómo eso está relacionado con la modificación realizada. En el caso de la voltamperometría, la diferencia de potencial entre picos de corriente, así como la altura del pico se utilizan para analizar el estado de la superficie (Da Silva, D. J. R., & Diniz, F. B., 2014). En el caso de la espectroscopía de impedancia electroquímica, la resistencia a la transferencia de carga es el parámetro utilizado (Farina, R. D., & Wilkins, R. G., 1980; Ye, C., et al, 2015; Filip, J., et al, 2017; Liu, X., et al, 2014).

Tomando en cuenta lo anterior y con la finalidad de observar cuales son los cambios que se pueden observar en el comportamiento electroquímico de la sonda redox al estar expuesta a electrodos con y sin modificaciones, realizó una primera caracterización de los electrodos mediante voltamperometría cíclica en una disolución  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de hexacianoferrato(II/III) de potasio en  $0.15 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl y buffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de fosfatos pH igual a 7.4 como electrolito soporte, como muestran las figuras 6 A y B. La Figura 6 B muestra en detalle el voltamperograma de un electrodo de óxido de carbón vítreo, donde se observa una transición, de un electrodo donde la reacción electroquímica del hexacianoferrato está muy impedida (Figura 6B, línea negra) hacía un electrodo (Figura 6B, línea roja) cuya forma y características del voltamperograma tiene mucha similitud con el de carbón vítreo prístino (Figura 6 A, línea azul), esto sugiere que la superficie probablemente se descompone parcialmente al finalizar el primer ciclo, lo que podría estar reduciendo la cantidad de sitios posibles para el anclaje de la proteína. Esto da como resultado un material (Figura 6 A, línea negra) donde existe una reducción en las corrientes de pico de  $144$  a  $119 \mu\text{A}$  para el pico de oxidación y un aumento en la diferencia de potencial entre picos de  $100$  a  $239 \text{ mV}$ , respecto al electrodo de carbón vítreo (figura 6 A, línea azul). Con esto se puede deducir que la reacción del ferro/ferricianuro tiene una constante de transferencia electrónica más baja que en el electrodo del OCV y esto está de acuerdo con los reportes previos (Santhiago, M., Maroneze, C. M., et al, 2015).

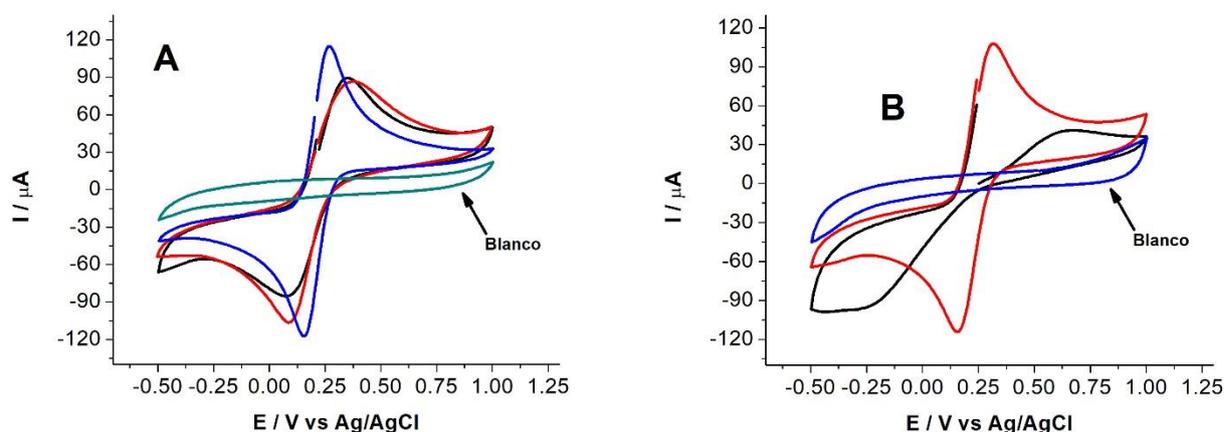


Figura 6. A. Voltamperogramas de electrodos de carbón vítreo (línea azul), óxido de carbón vítreo (línea negra) y óxido de carbón vítreo modificado con ConA (línea roja). B. Voltamperogramas de un electrodo de óxido de carbón vítreo, primer ciclo (línea negra) y segundo ciclo (línea roja), en una disolución  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en  $0.15 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl y buffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de fosfatos pH igual a 7.4 como electrolito soporte. Todos los voltamperogramas son obtenidos iniciando el barrido en el potencial de circuito abierto, en el sentido que indican las flechas y a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . El experimento indicado como *blanco* en A y B corresponde, a un voltamperograma adquirido solo en disolución de buffer con NaCl con los electrodos de carbón vítreo y OCV, respectivamente.

Por otro lado, el voltamperograma del electrodo modificado con la lectina muestra que la diferencia de potencial entre picos difiere en 10 mV entre el electrodo de OCV (figura 6 A, línea negra) y el modificado con ConA (figura 6 A, línea azul). Sin embargo, la corriente del pico catódico es mayor que la del pico anódico, resultando en una relación de corriente de picos ( $I_c/I_a$ ) de 1.11, mientras que para el OCV resulta de 1.02 y para el carbón vítreo de 1.00. Estos valores sugieren efectivamente entre los electrodos de carbón vítreo y el modificado con la lectina hay un cambio en la interfase propiciado por la presencia de la ConA. Dado que el pico catódico tiene casi el mismo valor que en el voltamperograma del OCV, la diferencia está en la capacidad del ion hexacianoferrito de alcanzar la superficie del electrodo.

Song (2014) reportó la preparación de electrodos modificados con óxido de grafeno y ConA en los cuales pudo observar que la interacción entre la carga eléctrica superficial de la proteína y la carga eléctrica del hexacianoferrato(II/III) de potasio podía impedir la llegada de la especie electroactiva a la superficie, variando el pH entre 4 y 9, con ello consigue bloquear parcialmente la reacción electroquímica.

En el presente trabajo, el pH es igual a 7.4, por lo que se puede suponer que es suficientemente alto para que la proteína tenga una carga parcial negativa que rechace el ingreso de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  a la interfase y permita el paso al  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . Debido a que la ConA es una proteína que no conductora, su presencia en la superficie del electrodo reduce la región en la que puede ocurrir la reacción electroquímica de la sonda redox.

La figura 7 muestra una serie de voltamperogramas de un electrodo modificado con la lectina que es expuesto a una disolución de buffer de fosfatos por distintos intervalos de tiempo. Estas gráficas indican que conforme se incrementa el tiempo de exposición a la disolución de fosfatos, la diferencia de potencial entre los picos de corriente se hace cada vez más grande. Esto podría ser un indicativo de que la sonda redox tiene cada vez más impedimento para alcanzar la superficie del electrodo.

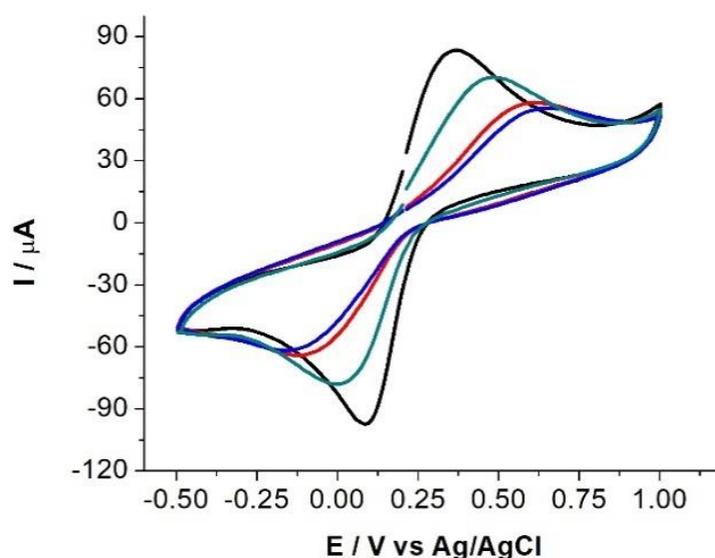


Figura 7. Voltamperogramas de electrodos de óxido de carbón vítreo modificado con ConA (NHS/EDC) (línea negra), 10 min en buffer de fosfatos (línea verde), 20 min en buffer de fosfatos (línea roja) y 30 min en buffer de fosfatos (línea azul). Todos los voltamperogramas se obtienen en una disolución 10 mmol L<sup>-1</sup> de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  /  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en 0.15 mol L<sup>-1</sup> NaCl y buffer 10 mmol L<sup>-1</sup> de fosfatos pH 7.4 como electrolito soporte. Todos los voltamperogramas son obtenidos iniciando el barrido en el potencial de circuito abierto, en el sentido que indican las flechas y a una velocidad de barrido de 100 mV s<sup>-1</sup>.

La relación entre las corrientes de los picos ( $I_c/I_a$ ) se incrementa. Se observó que, inicialmente es 1.04; a los 10 min es 1.06; a 20 min es 1.33 y tras 30 min es de 1.53. Esto probablemente esté promovido por la descomposición de los ésteres que no reaccionaron resultado de la activación de los electrodos con NHS/EDC. Es posible que gradualmente se propicie que la superficie pase de presentar ésteres succinimídicos a grupos carboxilato. Los cambios en los voltamperogramas podrían estar relacionados con un cambio en el entorno electrostático, ya que claramente los carboxilatos ofrecerán una interacción electrostática con la proteína diferente que los ésteres. Se ha reportado que la ConA experimenta un cambio estructural al depositarse en una superficie, incrementando su radio (Diniz, F. B., et al, 2014), este incremento en el radio de la proteína aumenta a su vez su área de interacción con la superficie, reduciendo los sitios donde la sonda redox puede reaccionar y esto explicaría el sucesivo decaimiento en las corrientes de pico como función del tiempo en los voltamperogramas de la Figura 7.

Conforme aumenta el tiempo de exposición al buffer, los valores de las corrientes de pico en la Figura 7 alcanzan valores límite, por lo que la tendencia sugiere que la superficie se estabiliza. Tras varios experimentos similares se observó que esta deriva en los electrodos está dada en mayor parte por el simple hecho de realizar la voltamperometría, es decir, la polarización del electrodo en el intervalo entre -0.5 y +1 V vs  $Ag^0/AgCl_{(s)}$  promueve que la superficie se modifique continuamente. Aun así, tras conseguir estabilizar el electrodo en buffer de fosfatos, estos electrodos de carbón vítreo modificados con ConA no presentaron actividad frente a transferrina.

Como se observó en la Figura 6 B, un paso crítico parece ser la técnica utilizada para estudiar la superficie. Con la intención de emplear una técnica donde el potencial de la superficie del electrodo varíe poco, se empleó espectroscopia de impedancia electroquímica. La Figura 8 A, muestra los diagramas de Nyquist de los electrodos OCV y de los electrodos de OCV modificados con ConA, uno mediante el anclaje covalente de la proteína al electrodo OCV, y el otro a través de la interacción electrostática de la lectina a la superficie del electrodo OCV.

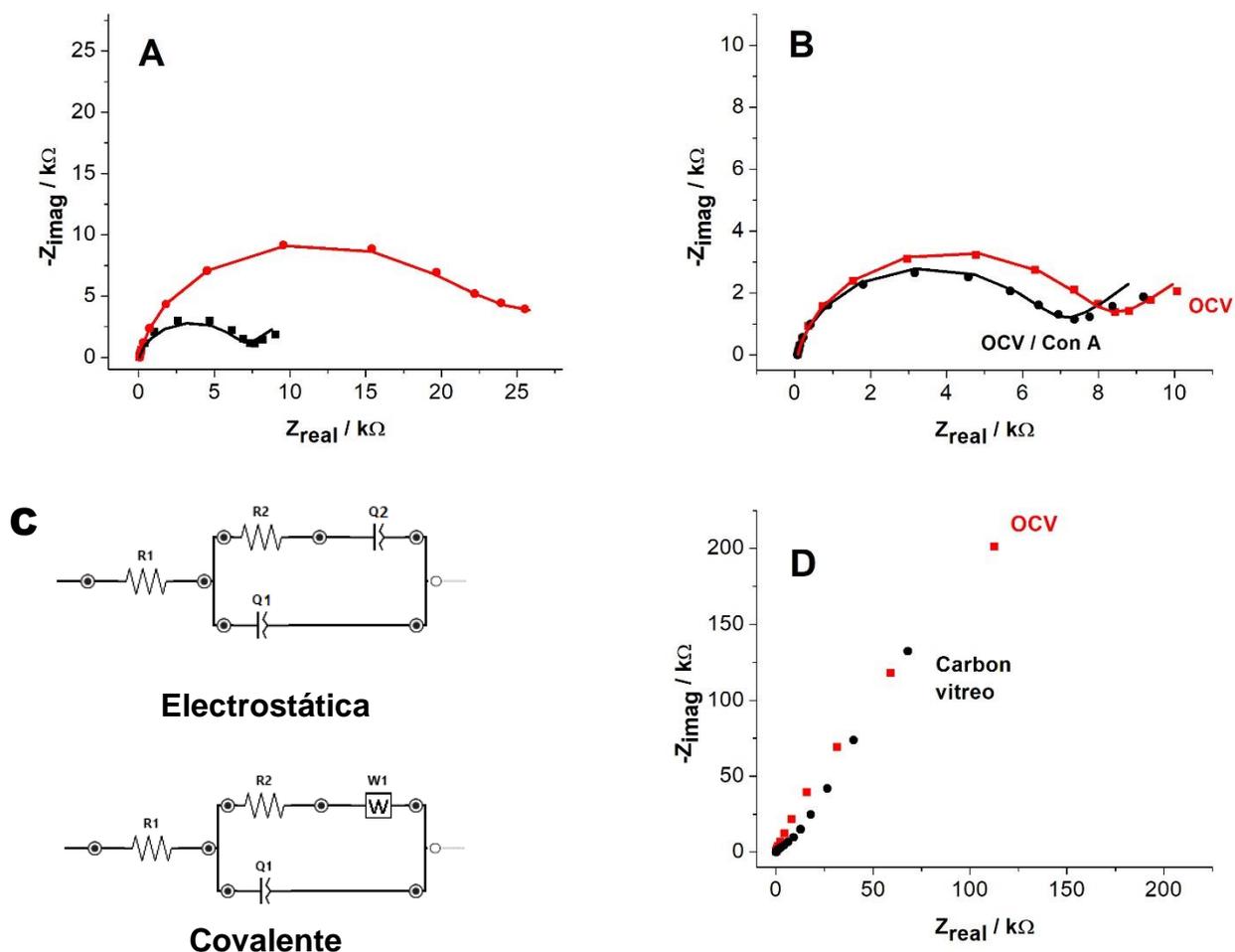


Figura 8. A. Diagrama de Nyquist de dos electrodos de OCV modificado con ConA (covalente, línea negra) y mediante adsorción (electrostática, línea roja). B. Diagrama de Nyquist de un electrodo de OCV (línea roja) y un electrodo OCV modificado con ConA (covalente, línea negra). C. Circuitos equivalentes para cada tipo de interacción;  $R_1$  es la resistencia de la disolución,  $R_2$  es la resistencia a la transferencia de carga,  $Q_1$  es el elemento de fase constante de la película de proteína,  $Q_2$  es el elemento de fase constante correspondiente a la difusión,  $W_1$  es el elemento de difusión de Warburg. D. Diagrama de Nyquist de un electrodo de OCV y de carbón vítreo en disolución buffer con NaCl.

La superficie modificada mediante enlace covalente exhibe un comportamiento que puede ajustarse a un circuito de Randles. La diferencia en la resistencia a la transferencia de carga y la capacitancia entre ambos circuitos es clara, esto podría sugerir dos situaciones. La primera es que, en el caso de la proteína depositada por interacción electrostática, prácticamente se cubre toda la superficie promovida por la interacción de los carboxilatos con la lectina, hasta el grado de que queda bloqueado el transporte de materia hacia la superficie del electrodo y por eso en el circuito equivalente, el coeficiente  $n$  en  $Q_2$  es de 0.130, exhibiendo un carácter más cercano a un resistor que a un capacitor o a un elemento de difusión. La segunda situación es que la lectina no se absorbe sobre los ésteres succinimídicos, y se favorece la formación del enlace covalente con la superficie. La resistencia a la transferencia y la capacitancia es más baja que con la interacción electrostática, sugiriendo un grado de ocupación de la superficie menor, probablemente atribuido a una mejor distribución de la proteína en la superficie.

Por otro lado, en la Figura 8 B, la modificación de la superficie del óxido con la ConA de forma covalente (electrodos OCV y OCV/ConA) da como resultado una reducción en la resistencia a la transferencia de carga. Ya que los valores estimados de resistencia a la transferencia de carga y del elemento de fase constante son respectivamente de 6.93 k $\Omega$  y 17.05  $\mu$ T ( $n = 0.924$ ) para el electrodo oxidado modificado con la lectina (OCV/ConA) y 8.93 k $\Omega$  y 17.95  $\mu$ T ( $n = 0.930$ ) para el electrodo oxidado (OCV), y un valor de impedancia de Warburg de 0.446 k $\sigma$  para ambos electrodos. Esto sugiere que la reacción electroquímica sobre el electrodo de OCV y ConA está más favorecida que en los electrodos sin modificar, debido probablemente a la repulsión electrostática que experimentan el ferro/ferricianuro por parte de los carboxilatos. La proteína tiene una contribución en la capacitancia del electrodo diferente a lo esperado, sin embargo, esto ya había sido reportado por Da Silva (2014), quien observó que el dipolo de la ConA tiende a orientarse perpendicular al campo eléctrico de la superficie, y no a favor como en los materiales dieléctricos, lo que da como resultado una reducción en la capacitancia del electrodo.

Los electrodos modificados con ConA de forma covalente fueron expuestos de forma sucesiva en una disolución 10 mmol L<sup>-1</sup> de fosfatos pH igual 7.4, con lo que se obtienen los espectros de impedancia de la Figura 9 A. Se observa que, a diferencia de los obtenidos mediante voltamperometría, éstos se exponen durante más tiempo a las disoluciones de buffer de fosfatos (30 min cada uno), con lo que podemos darnos cuenta de que, usando la espectroscopia de impedancia electroquímica, el electrodo se estabiliza en tiempos mayores. Esto sugiere que efectivamente la voltamperometría cíclica forzó la conversión de los ésteres a carboxilatos. Una vez estabilizada la señal, con electrodos distintos se obtuvieron los espectros de impedancia de la Figura 9 B y C, los que fueron incubados 30 min en cada disolución de glucosa 100, 500 y 1000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> y apotransferrina 20, 40 y 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Los electrodos se incubaron en las disoluciones a temperatura ambiente. En estas figuras se observa que conforme la concentración de los sustratos aumenta, también lo hace el cambio en resistencia a la transferencia de carga ( $\Delta R_{CT}$ ). Estos valores se recuperan en la Tabla 2. Este valor se obtiene de restar la resistencia a la transferencia de carga encontrada tras incubar el electrodo con el sustrato y del electrodo al inicio.

Tabla 2. Concentración del sustrato y cambio los valores de la resistencia a la transferencia de carga. Para obtener los valores de resistencia a la transferencia de carga, los espectros de impedancia de la figura 9 B y C se ajustan a un circuito de Randles, la suma de cuadrados ( $\chi^2$ ) es de  $5 \times 10^{-3}$ .

	Concentración [ $\mu$ g mL <sup>-1</sup> ]	$\Delta R_{TC}$ [k $\Omega$ ]	1/Concentración [ $\times 10^3$ mol <sup>-1</sup> L]	1/ $\Delta R_{TC}$ [k $\Omega$ <sup>-1</sup> ]
Glucosa	100	1.49	1.82	0.66
	500	3.24	0.36	0.30
	1 000	4.77	0.18	0.20
Apotransferrina	20	1.45	3.97	0.68
	40	3.30	1.98	0.30
	100	5.59	0.79	0.17

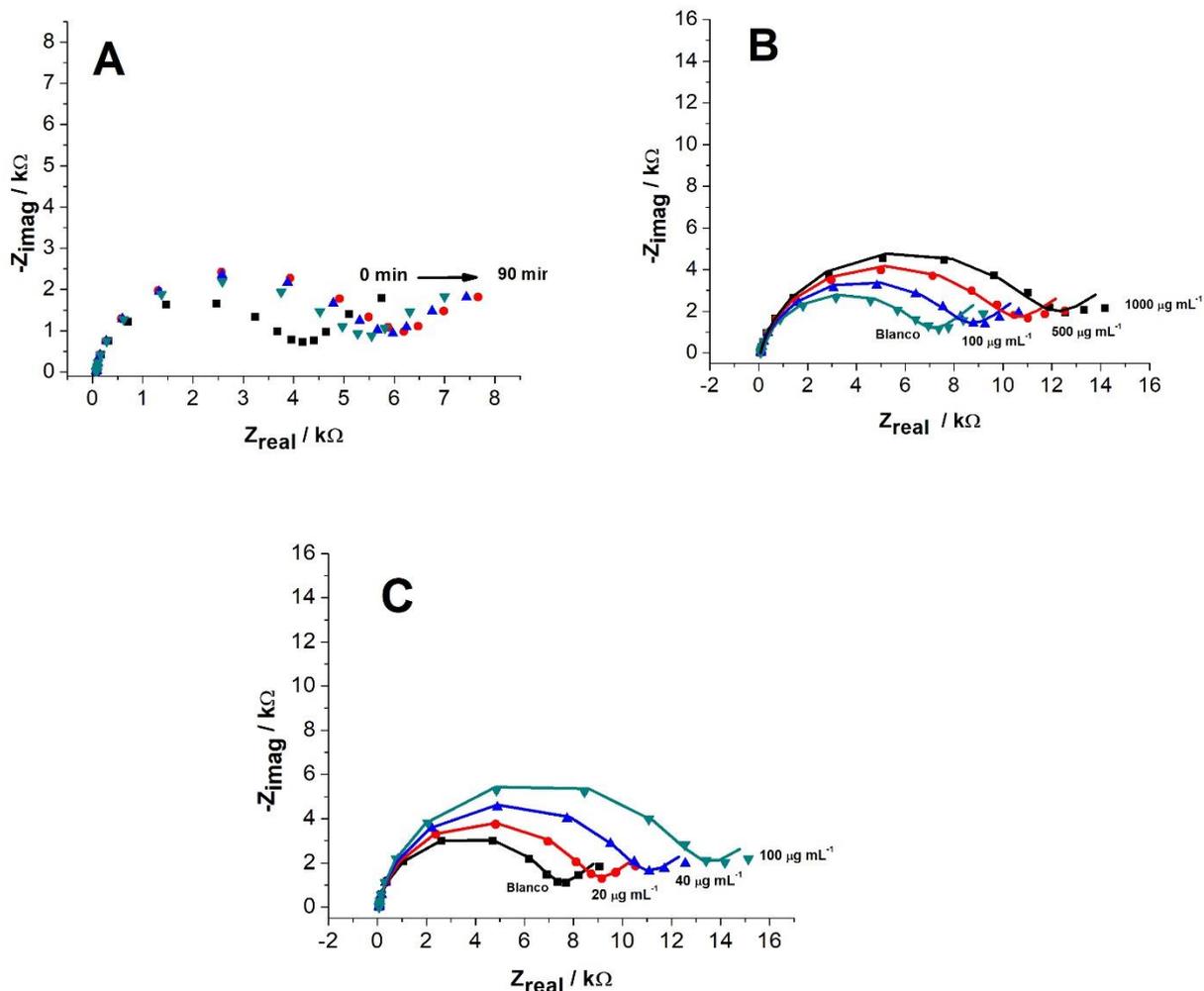


Figura 9. A. Diagrama de Nyquist de un electrodo de óxido de carbón vítreo modificado con ConA (covalente, negro) y de su exposición sucesiva a buffer de fosfatos. B. Electrodo de óxido de carbón vítreo modificado con ConA (covalente, línea verde) incubado en disoluciones de glucosa 100, 500 y 1 000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . C. Electrodo de óxido de carbón vítreo modificado con ConA (covalente, negro) incubado en disoluciones de apotransferrina 20, 40 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Entre los glicósidos y la lectina se establece el equilibrio de la Ecuación 8, y cuyo valor de constante de equilibrio de disociación está descrito en la literatura para la glucosa y la transferrina (Mislovičová, D., et al, 2012; Kim, J., & Park, K., 2001). Se ha reportado que la determinación esta constante debe considerar que la cinética de reacción puede ser descrita por una isoterma de Langmuir (Coulibaly, F., & Youan, B., 2014), desde luego considerando que cada lectina expone sólo un sitio activo para su unión a los azúcares y, por lo tanto, la glicoproteína y el azúcar forman una monocapa en la superficie del electrodo. Con esto es posible escribir la dependencia de la concentración con el cambio en la resistencia en la transferencia de carga como se muestra en la Ecuación 9. Donde  $C$  es la concentración del sustrato,  $K_{\text{dis}}$  es la constante de disociación,  $\Delta R_{\text{CT}}$  es el cambio en la resistencia a la transferencia de carga y  $\Delta R_{\text{CTmax}}$  es el valor de la resistencia a la transferencia de carga una vez saturada la superficie.



$$\frac{1}{\Delta R_{CT}} = \frac{1}{K_{dis} \Delta R_{CTmax} C} + \frac{1}{\Delta R_{CTmax}} \quad (9)$$

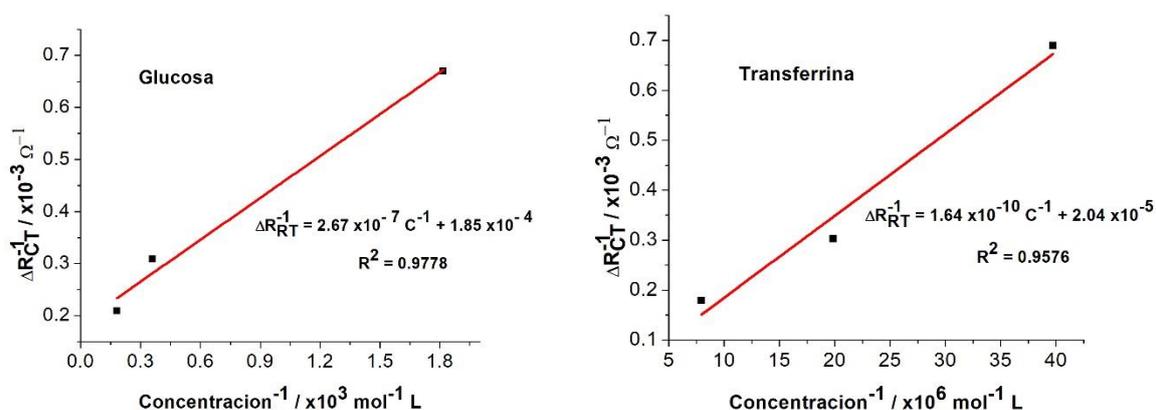


Figura 10. Ajuste lineal de los datos, inverso de la concentración de los sustratos (glucosa y transferrina) como función del inverso del cambio en la resistencia a la transferencia de carga mostrados en la Tabla 2.

De los ajustes lineales de la Figura 10, se obtiene que para la transferrina la constante de disociación ( $K_{dis}$ ) es de  $0.8 \times 10^{-6} \text{ M}$ , mientras el valor reportado es de  $1.15 \times 10^{-6} \text{ M}$  (Mislovičová, D., et al, 2012). En cuanto a la glucosa, resulta en un valor de  $1.45 \times 10^{-3} \text{ M}$  y el valor reportado es de  $1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$  (Kim, J., & Park, K., 2001). El coeficiente  $R^2$  en los ajustes lineales es alto respecto al reportado para otros métodos comunes empleados en la determinación de proteínas como lo son los ensayos inmunológicos (Mislovičová, D., et al, 2012), que normalmente ronda entre 0.86 a 0.95. Las diferencias con los valores reportados en la literatura claramente están influenciadas por la baja cantidad de puntos empleada para obtener las gráficas de la Figura 10. Sin embargo, fueron suficientes asegurar con esto que el fenómeno observado sí corresponde a la interacción de la ConA con la glucosa y la transferrina y, por lo tanto, es posible que los electrodos de carbón vítreo modificados con ConA sean usados para la determinación analítica de estos sustratos. Dado que las adiciones de los sustratos se realizaron sobre un mismo electrodo esto pudo modificar la forma de la isoterma, con los datos obtenidos no es posible evaluar si este cambio en la isoterma tiene una influencia significativa en los resultados.

Como perspectivas de este estudio vale la pena señalar que dado que los equilibrios de disociación de los tetrámeros de ConA son lentos y normalmente conducen la desnaturalización (Seneer, D. F., & Teller, D. C., 1981), además de que la disociación de los complejos ConA con glicósidos no está favorecida termodinámicamente, estos electrodos no son reutilizables. Por lo que se tiene como perspectiva transferir esta tecnología a un sistema donde tenga mejores oportunidades de desarrollo como electrodos serigrafados o impresos. Por otro lado, un análisis con más datos de concentración de sustratos es necesario para conocer los verdaderos alcances de estos electrodos modificados.

## 5. Conclusiones

Se determinaron las condiciones de preparación de electrodos de carbón vitreo modificados con Con A, éstos presentaron actividad frente a transferrina y glucosa. La voltamperometría no pudo ser utilizada para evaluar la actividad de los electrodos modificados, sin embargo, apporto datos respecto a las características del electrodo y de cómo la lectina interactúa con la superficie del OCV. La espectroscopía de impedancia electroquímica es la técnica electroquímica que permitió monitorear los electrodos a lo largo de todas sus modificaciones. Se consiguieron unos electrodos en los que es posible realizar varias mediciones sucesivas. Fue posible determinar las constantes de disociación de la ConA con la apotransferrina y la glucosa. Es posible que los electrodos preparados puedan ser empleados en análisis cuantitativos de muestras de glucosa y transferrina.

## 6. Bibliografía

Abrantes-Coutinho, V. E., Santos, A. O., Moura, R. B., Pereira-Junior, F. N., Mascaro, L. H., Morais, S., & Oliveira, T. (2021). Systematic review on lectin-based electrochemical biosensors for clinically relevant carbohydrates and glycoconjugates. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 208, 112148. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112148

Alava, T., Mann, J. A., Théodore, C., Benitez, J. J., Dichtel, W. R., Parpia, J. M., & Craighead, H. G. (2013). Control of the Graphene-Protein Interface Is Required To Preserve Adsorbed Protein Function. *Analytical Chemistry*, 85(5), 2754–2759.

Belicky, T, Katrlík, J., & Tka , J. (2016). Glycan and lectin biosensors. *Essays In Biochemistry*, 60(1), 37–47. doi:10.1042/ebc20150005

Bhattarai, J. K., Tan, Y. H., Pandey, B., Fujikawa, K., Demchenko, A. V., & Stine, K. J. (2016). Electrochemical impedance spectroscopy study of Concanavalin A binding to self-assembled monolayers of mannosides on gold wire electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 780, 311–320. doi:10.1016/j.jelechem.2016.09.04

Bhagavan, N. V., & Ha, C.-E. (2015). Metabolism of Iron and Heme. *Essentials of Medical Biochemistry*, 511–529. doi:10.1016/b978-0-12-416687-5.00027-0

Brownson, D. A. C., Smith, G. C., & Banks, C. E. (2017). Graphene oxide electrochemistry: the electrochemistry of graphene oxide modified electrodes reveals coverage dependent beneficial electrocatalysis. *Royal Society Open Science*, 4(11), 171128. doi:10.1098/rsos.171128

Cimafonte, M., Fulgione, A., Gaglione, R., Papaiani, M., Capparelli, R., Arciello, A., Bolletti Censi, S., et al. (2020). Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of *Escherichia coli* in Drinking Water. *Sensors*, 20(1), 274. MDPI AG. doi.org/10.3390/s20010274

Claise, C., Saleh, J., Rezek, M., Vaulont, S., Peyssonnaud, C., & Edeas, M. (2022). Low transferrin levels predict heightened inflammation in patients with COVID-19: New insights. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 116, 74–79. doi.org/10.1016/j.ijid.2021.12.340

Connor, J. R., Menzies, S. L., St. Martin, S. M., & Mufson, E. J. (1992). A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *Journal of Neuroscience Research*, 31(1), 75–83. doi:10.1002/jnr.490310111

Coulibaly, F. S., & Youan, B.-B. C. (2014). Concanavalin A–Polysaccharides binding affinity analysis using a quartz crystal microbalance. *Biosensors and Bioelectronics*, 59, 404–411. doi:10.1016/j.bios.2014.03.040

Da Silva, D. J. R., & Diniz, F. B. (2014). Electrochemical Impedance Spectroscopy Study of Concanavalin A Adsorption on Glassy Carbon Electrode: An Analysis of Capacitance Dispersion. *Electrochimica Acta*, 119, 99–105. doi:10.1016/j.electacta.2013.12.021

Diniz, F. B., da Silva, D. J. R., Ueta, R. R., & Ribeiro, R. T. (2019). Insights on the Kinetics of Concanavalin A Adsorption on Platinum and Glassy Carbon Electrodes from Electrochemical Impedance Spectroscopy Data. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 577, 42–44. doi:10.1016/j.colsurfa.2019.05.045

Elsayed, M. E., Sharif, M. U., & Stack, A. G. (2016). Transferrin Saturation. *Advances in Clinical Chemistry*, 75, 71–97. doi:10.1016/bs.acc.2016.03.002

Espino-Solis, G. P. (2015). Lectins: A brief review. *Vitae*, 22(1), 9-11. doi:10.17533/udea.vitae.v22n1a01

Farina, R. D., & Wilkins, R. G. (1980). Kinetics of interaction of some  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-monosaccharides with concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 631(3), 428–438. doi:10.1016/0304-4165(80)90019-7

Filip, J., Zavahir, S., Klukova, L., Tkac, J., & Kasak, P. (2017). Immobilization of concanavalin A lectin on a reduced graphene oxide-thionine surface by glutaraldehyde crosslinking for the construction of an impedimetric biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 794, 156–163. doi:10.1016/j.jelechem.2017.04.01

Ganesh, V., Pal, S. K., Kumar, S., & Lakshminarayanan, V. (2006). Self-assembled monolayers (SAMs) of alkoxy cyanobiphenyl thiols on gold—A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296(1), 195-203.

Harris, W. R. (2012). Anion binding properties of the transferrins. Implications for function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 348–361. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.017

Hermanson, G. T. (2013). Introduction to Bioconjugation. *Bioconjugate Techniques*, 1–125. doi:10.1016/b978-0-12-382239-0.00001-7

Kim, J. J., & Park, K. (2001). Glucose-Binding Property of Pegylated Concanavalin a. *Pharmaceutical Research*, 18(6), 794–799. doi:10.1023/a:1011084312134

Klukova, L., Filip, J., Belicky, S., Vikartovska, A., & Tkac, J. (2016). Graphene oxide-based electrochemical label-free detection of glycoproteins down to aM level using a lectin biosensor. *The Analyst*, 141(14), 4278–4282. doi:10.1039/c6an00793g

Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 45–55. doi:10.1007/s00253-010-2892-9

Laurell, C.B., & Ingelman, B. (1947). Iron-Binding Protein of Swine Serum. *Acta Chemica Scandinavica*, 1, 770-776.

Liu, X., Ou, X., Lu, Q., Chen, S., & Wei, S. (2014). A biorecognition system for concanavalin a using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles, dextran and glucose oxidase. *Microchimica Acta*, 182(3-4), 797–803. doi:10.1007/s00604-014-1390-7

MacKenzie, E. L., Iwasaki, K., & Tsuji, Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(6), 997–1030. doi: 10.1089/ars.2007.1893

Mandal, B., Sinha, P. K., Sen, R., & Mandal, A. K. (2016). A Comparative Spectrophotometric Study Using Ferrozine and 1,10-Ortho-phenanthroline to Evaluate the Iron Redox Ratio ( $Fe^{2+}/\Sigma Fe$ ) in Glass Prepared by Microwave Heating. *Analytical Sciences*, 32(5), 571–576. doi:10.2116/analsci.32.571

Mishra, A., Behura, A., Mawatwal, S., Kumar, A., Naik, L., Mohanty, S. S., Manna, D., Dokania, P., Mishra, A., Patra, S. K., & Dhiman, R. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 134, 110827. doi:10.1016/j.fct.2019.110827

Mislovičová, D., Katrlík, J., Paulovičová, E., Gemeiner, P., & Tkac, J. (2012). Comparison of three distinct ELLA protocols for determination of apparent affinity constants between Con A and glycoproteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 163–169. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.03

Montreuil, J., Spik, G., & Mazurier, J. (1997). Transferrin superfamily. *New Comprehensive Biochemistry*, 203–242. doi:10.1016/s0167-7306(08)60623-7

Nemeth, E., & Ganz, T. (2009). The Role of Heparin in Iron Metabolism. *Acta Haematologica*, 122(2-3), 78–86. doi:10.1159/000243791

Pfeiffer, C. M., & Looker, A. C. (2017). Laboratory methodologies for indicators of iron status: strengths, limitations, and analytical challenges. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(Supplement 6), 1606S–1614S. doi:10.3945/ajcn.117.155887

Saito H. (2014). Metabolism of Iron Stores. *Nagoya Journal of Medical Science*, 76(3-4), 235–254.

Santhiago, M., Maroneze, C. M., Silva, C. C. C., Camargo, M. N. L., & Kubota, L. T. (2015). Electrochemical Oxidation of Glassy Carbon Provides Similar Electrochemical Response as Graphene Oxide Prepared by Tour or Hummers Routes. *ChemElectroChem*, 2(5), 761–767. doi:10.1002/celec.201402387

Senear, D. F., & Teller, D. C. (1981). Thermodynamics of concanavalin A dimer-tetramer self-association: sedimentation equilibrium studies. *Biochemistry*, 20(11), 3076–3083. doi:10.1021/bi00514a014

Song, Y., Liu, H., Tan, H., Xu, F., Jia, J., Zhang, L., ... Wang, L. (2014). pH-Switchable Electrochemical Sensing Platform based on Chitosan-Reduced Graphene Oxide/Concanavalin A Layer for Assay of Glucose and Urea. *Analytical Chemistry*, 86(4), 1980–1987. doi:10.1021/ac402742m

Vargová, V., Helma, R., Paleček, E., & Ostatná, V. (2016). Electrochemical sensing of concanavalin A and ovalbumin interaction in solution. *Analytica Chimica Acta*, 935, 97–103. doi:10.1016/j.aca.2016.06.055

Verkoelen, C. F., van der Boom, B. G., Kok, D. J., & Romijn, J. C. (2000). Sialic acid and crystal binding. *Kidney International*, 57(3), 1072–1082. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00934.x

Wang, B., & Anzai, J. (2015). Recent Progress in Lectin-Based Biosensors. *Materials*, 8(12), 8590–8607. doi:10.3390/ma8125478

Worwood, M. (2006). Iron deficiency anaemia and iron overload. *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 131–160. doi:10.1016/b0-44-306660-4/50011-8

Ye, C., Zhong, X., Chai, Y., & Yuan, R. (2015). Sensing glucose based on its affinity for concanavalin A on a glassy carbon electrode modified with a C60 fullerene nanocomposite. *Microchimica Acta*, 182, 2215-2221.

Zhang, H., Catania, R., & Jeuken, L. J. C. (2020). Membrane Protein Modified Electrodes in Bioelectrocatalysis. *Catalysts*, 10(12), 1427. doi:10.3390/catal10121427

Zeng, X., Andrade, C. A. S., Oliveira, M. D. L., & Sun, X.-L. (2011). Carbohydrate–protein interactions and their biosensing applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(10), 3161–3176. doi:10.1007/s00216-0