

## **Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) inmovilizada en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs).**

**Pedro R. Matheus\*<sup>1</sup>, José María Abad<sup>2</sup>, Pedro Navarro<sup>3</sup>,  
Olga M. Belandria<sup>1</sup>, Nathaly Hernández<sup>1</sup> y Víctor M. Fernández<sup>2</sup>**

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

2) Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. España.

3) Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

(\*) e-mail: [pmateus@ula.ve](mailto:pmateus@ula.ve)

**Recibido:** 04/02/2009

**Revisado:** 27/02/2009

**Aceptado:** 17/03/2009

---

### **Resumen**

Se realizaron estudios de Voltametría Cíclica (CV) para investigar el efecto del polímero polietilenimina (PEI) en la reversibilidad electroquímica del mediador tionina y por ende en la actividad catalítica de la enzima peroxidasa de rábano recombinante, HRP-N<sub>His</sub> (*peroxidasa de rábano* a la que se ha añadido una cadena de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína). Para ello se prepararon monocapas autoensambladas de tioles sobre electrodos de oro, con modificaciones químicas obtenidas mediante etapas sucesivas en la fase sólida del electrodo. Los electrodos de oro fueron modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co<sup>2+</sup> [SAM: Monocapa autoensamblada de tioles; TOA: Ácido ditióctico; ANTA: Ácido nitrilotriacético; DADOO: 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano]. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia del polímero mejora la reversibilidad electroquímica del mediador soportando corrientes catalíticas tan altas como las que se consiguen con relaciones molares ANTA:DADOO 10:1 en ausencia de PEI y mejorando la respuesta voltamétrica obtenida.

**Palabras clave:** polietilenimina; monocapas autoensambladas de tioles; electrodos enzimáticos; electrodos de oro modificados.

### **Abstract**

**Effect of the Polyethyleneimine in the Activity Catalytic of the *horseradish peroxidase* Immobilized on Gold Electrodes Modified with a Self-assembled Monolayer of Thiols (SAMs).** Studies were conducted by cyclic voltammetry (CV) to investigate the effect of the polymer polyethyleneimine (PEI) in the electrochemical reversibility of the mediator thionine and thus the catalytic activity of the enzyme horseradish peroxidase of recombinant HRP-N<sub>His</sub> (horseradish peroxidase to the has been added to a chain of six histidine in the extreme N-terminal protein). This self produced monolayers of thiols (SAMS) on gold electrodes, with chemical modifications obtained through successive stages in the solid phase of the electrode. The gold electrodes were modified with monolayer SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co<sup>2+</sup> [SAM: self-assembled monolayers of thiols, TOA: dithioctic acid, ANTA: nitrilotriacetic acid, DADOO: 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane]. The results showed that the presence of the polymer improves the electrochemical reversibility of the mediator to endure catalytic currents as high as those that are obtained with molar ratios ANTA:DADOO 10:1 in the absence of PEI, and improve the response voltammetric obtained.

**Keywords:** polyethyleneimine; self-assembled monolayers of thiols; electrodes enzyme; modified gold electrodes.

### **Introducción**

Una de las configuraciones más exitosas, a juzgar por el número de publicaciones, patentes y dispositivos

comercializados es la combinación de un sistema transductor electroquímico de tipo amperométrico con un sistema biológico de reconocimiento basado en una

enzima, generalmente inmovilizada o en contacto íntimo con el transductor. Por ser este un método electroquímico, tiene la ventaja de poseer una elevada sensibilidad y de proporcionar respuestas con altos intervalos de linealidad entre la intensidad de corriente generada y la concentración de compuesto electroactivo. Una desventaja del método es la poca selectividad, dada la elevada cantidad de especies electroactivas en la estrecha ventana de potenciales disponibles. Por tal motivo, la combinación de estos métodos electroquímicos con un sistema biológico de reconocimiento basado en una enzima, permite dotar al dispositivo de la *selectividad* con la que la enzima reconoce a su sustrato y de la *sensibilidad* inherente al método electroquímico<sup>1</sup>. Con esta metodología se han preparado superficies de oro recubiertas con monocapas que exponen al medio ligandos con afinidad específica por un motivo singular localizado en una región también específica de la enzima. Existen dos métodos empleados habitualmente en la inmovilización de enzimas<sup>2-10</sup>:

1. Métodos físicos: adsorción y atrapamiento. Las interacciones que se establecen entre la enzima y la superficie del electrodo son débiles, de tipo Van der Waals y son muy afectadas por el disolvente, la temperatura y el pH.
2. Métodos químicos: unión covalente, entrecruzamiento y afinidad por reconocimiento específico. Las interacciones entre la enzima y la superficie del electrodo son fuertes, lo que causa un aumento en la estabilidad de la unión enzima-sustrato.

Es importante mencionar que de manera general la elección del método de inmovilización debe regirse principalmente por utilizar aquel que permita inmovilizar la mayor cantidad de enzima por unidad de superficie, manteniendo al máximo sus propiedades durante el mayor tiempo posible y en condiciones poco drásticas.

En nuestra investigación estamos interesados no solo en la arquitectura de estas estructuras supramoleculares sino también en la funcionalidad de las mismas. Por ello hemos utilizado enzimas redox como biomoléculas sonda, y oro metálico como soporte. La conjunción de estos elementos se ha llevado a cabo a través de monocapas de tioles autoensambladas sobre el oro. La enzima utilizada en el presente estudio ha sido la *peroxidasa de rábano* (HRP), a la que se ha añadido una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína. Esta enzima cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua con electrones suministrados directamente por el electrodo o a través de mediadores redox difusibles que transportan los electrones desde la superficie del electrodo al centro activo de la enzima, un anillo porfirínico<sup>11</sup>. Siendo la tionina un buen sustrato redox de las peroxidases<sup>12</sup>, hemos llevado a cabo

un estudio sobre la electroquímica de dicho mediador redox con las monocapas SAM-TOA-ANTA-Co(II) como etapa previa a estudios electroquímicos con este tipo de electrodos.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la polietilenimina (PEI, Fig. 1) en la reversibilidad electroquímica del mediador tionina (Fig. 2) y por ende en la actividad catalítica de la enzima HRP-N<sub>His</sub>. Además, se realizaron diluciones de la molécula de ANTA (Fig. 3) en distintas relaciones molares con moléculas de DADDO (Fig. 4), en la búsqueda de obtener la mejor reversibilidad electroquímica con una máxima actividad catalítica<sup>1</sup>.

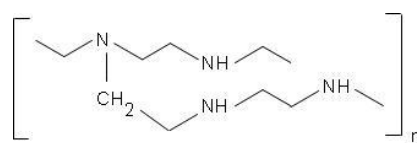


Figura 1. Estructura de la polietilenimina.

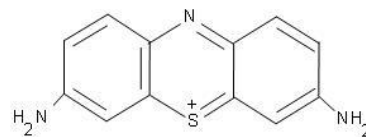


Figura 2. Estructura de la tionina.

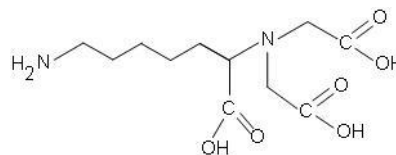


Figura 3. Estructura del ANTA.

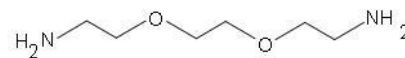


Figura 4. Estructura del DADDO.

## Parte experimental

### Materiales y métodos:

Actividad enzimática y concentración de la enzima HRP-N<sub>His</sub>. La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando el método descrito por Bergmeyer<sup>13</sup>. La concentración de la enzima se determinó por el método de Bradford<sup>14</sup>. La peroxidasa de rábano HRP-N<sub>His</sub> es modificada genéticamente con seis moléculas de histidina en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, la cual es expresada en *Escherichia coli* de acuerdo con el protocolo descrito<sup>15,16</sup>. Las disoluciones de esta enzima fueron preparadas en tampón fosfato 50 mM (PBS) a pH

7,0 a concentraciones de  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  y se alicuotaron en volúmenes de  $20 \mu\text{L}$ , siendo conservados en el frigorífico a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Limpieza de los electrodos.** Los electrodos de hilo de oro se pasaron por la llama suave hasta el rojo vivo, se dejaron enfriar y posteriormente se pulieron con gamma-alúmina 3 ( $0,05 \text{ micron}$ , Buehler). Seguidamente se lavaron con agua bidestilada ( $18 \text{ M}\Omega$ ), se sonicaron durante 15 minutos en etanol- $\text{H}_2\text{O}$  (2:1) y finalmente se secaron al aire.

#### Medidas electroquímicas:

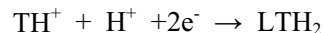
La metodología utilizada para la caracterización y determinación del área efectiva del electrodo, así como para la modificación de la superficie de oro con monocapas de ácido ditióctico y su posterior derivatización, aparecen reportadas en referencias<sup>1,11</sup>. En ambas referencias aparecen explicadas de forma muy detallada la formación de las monocapas de tioles (SAMs), la activación de los grupos carboxílicos, el acoplamiento del ligando, la formación del quelato metálico y finalmente la unión de la proteína HRP modificada genéticamente con cola de 6 histidinas. Como técnica analítica de caracterización de las monocapas y sus derivados enzimáticos se ha empleado la voltametría cíclica en una celda convencional electroquímica de tres electrodos bajo atmósfera de nitrógeno en tampón fosfato salino  $50 \text{ mM}$  (PBS),  $\text{KCl } 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7,0$ . Los experimentos electroquímicos se realizaron utilizando como electrodos de trabajo, electrodos de hilo de oro con  $99,99\%$  de pureza (Goodfellow), de  $0,50 \text{ mm}$  de diámetro y longitud aproximada de  $25 \text{ mm}$  sobre soportes de cobre cilíndrico de  $5 \text{ mm}$  de diámetro y  $40 \text{ mm}$  de longitud. Como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino con  $99,99\%$  de pureza, de  $0,50 \text{ mm}$  de diámetro y como electrodo de referencia  $\text{Ag/AgCl}$ ,  $3\text{M}$  en  $\text{KCl}$ <sup>11</sup>. Se realizaron CV en ausencia de  $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ , tionina  $10 \mu\text{M}$ , PBS y  $\text{pH } 7,0$  a distintas relaciones molares ANTA/DADDO y a distintas concentraciones PEI, para buscar la mejor reversibilidad electroquímica con una máxima actividad catalítica.

Los experimentos fueron realizados en una cámara anaerobia (Mecaplex GB 80) en la cual se produce y mantiene una atmósfera pura, libre de humedad y de oxígeno. En esta cámara utilizamos como gas inerte el nitrógeno, el cual es continuamente reciclado en un circuito cerrado y purificado al pasar por unos filtros los cuales pueden ser regenerados al estar saturados<sup>17</sup>.

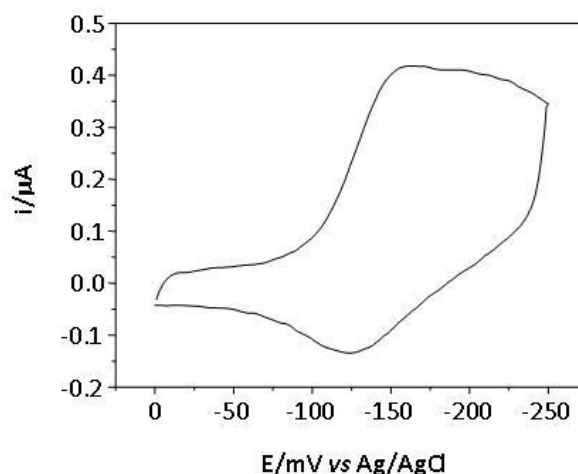
## Resultados y discusión

### Electroquímica de la molécula tionina en electrodos SAM-TOA-ANTA-Co(II).

Es sabido que la molécula tionina está cargada positivamente en su estado oxidado, pero que ésta pierde la carga tras su reducción, según la siguiente reacción:



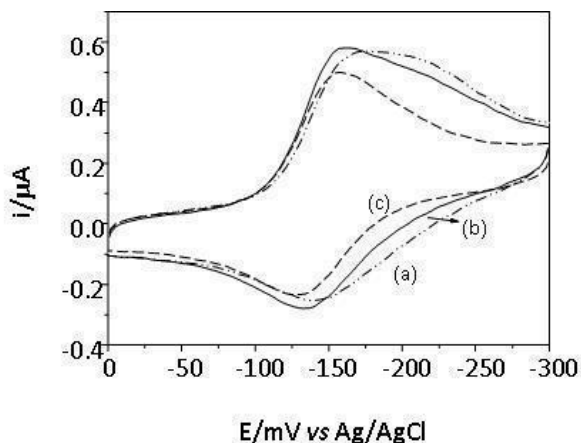
Siendo la tionina un buen sustrato redox de las peroxidasas<sup>11,18,19</sup> hemos llevado a cabo un estudio sobre la electroquímica de dicho mediador redox con las monocapas SAM-TOA-ANTA-Co(II) como etapa previa a estudios electroquímicos con este tipo de electrodos. La figura 5 muestra un voltamograma cíclico de una disolución de tionina  $10 \mu\text{molar}$  obtenido con un electrodo SAM-TOA-ANTA-Co(II) en el que se observa claramente un post-pico de reducción de una especie adsorbida de tionina, más estable en su forma oxidada sobre el electrodo. Aparte del post-pico de reducción se aprecian claramente los picos anódicos y catódicos, con una separación de  $30 \text{ mV}$  como corresponde a un proceso acoplado de 2 electrones, pero de muy diferente intensidad, característico de un proceso de adsorción de una de las formas de la especie redox en el electrodo.



**Figura 5.** Voltamograma cíclico de un electrodo de oro modificado con monocapa SAM-TOA-ANTA-Co(II) en ausencia de  $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ . Presencia de tionina  $10 \mu\text{M}$ . PBS a  $\text{pH } 7,0$ . Velocidad de barrido  $5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Dada la naturaleza de la monocapa cabe pensar que esta adsorción podría tener lugar a través de interacciones electrostáticas entre grupos carboxilatos de la monocapa ionizados y la forma oxidada de la tionina, cargada positivamente. Para investigar el origen de este proceso de adsorción, con vistas a su posible modulación se llevaron a cabo series de experimentos en los que las moléculas de ANTA fueron diluidas en distintas relaciones molares con moléculas de DADDO (Fig. 4). Esta molécula es muy hidrofílica y al disponer de grupos aminos primarios competiría con los grupos aminos del ANTA durante la

etapa de amidación de los ésteres succinimida de los carboxilatos activados en la monocapa y con las moléculas del agua del disolvente con lo que debería disminuir la concentración final de carboxilatos superficiales en la monocapa.



**Figura 6.** Respuestas electroquímicas de tionina 10  $\mu\text{M}$  en electrodos de oro modificados con monocapa SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co(II) tras incubación con HRP- $N_{\text{His}}$  7,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . (a) [ANTA/DADOO; 10:1]. (b) [ANTA/DADOO; 5:1]. (c) [ANTA/DADOO; 1:1]. PBS a pH 7,0. Velocidad de barrido 5  $\text{mV s}^{-1}$ . Atmósfera de  $\text{N}_2$ .

La figura 6 muestra voltamogramas cíclicos de electrodos preparados con distintas relaciones molares ANTA/DADOO, modificados con Co(II) en presencia de tionina 10  $\mu\text{M}$ .

La tabla 1 muestra las relaciones entre la corriente de pico anódica y catódica para cada dilución de ANTA/DADOO ensayada así como la separación de picos expresada en voltios. Podemos apreciar que a medida que se diluye el complejo de cobalto con el ligando DADOO disminuyen las características típicas de un proceso electroquímico con adsorción de una de las especies redox.

En resumen podemos decir que es claro que la mejor reversibilidad electroquímica de la tionina se tiene con una relación molar ANTA:DADOO de 1:1 (Fig. 6, trazo c). Con menores proporciones de DADOO se obtiene resultados intermedios como indican los trazos a y b de la figura 6 para relaciones molares ANTA:DADOO, 10:1 y 5:1, respectivamente. Por el contrario el electrodo con la monocapa de ANTA sin diluir (Fig. 5) presenta voltamogramas con signos de una mayor adsorción del mediador. Estos resultados, apuntan a favor de una interacción electrostática del mediador con grupos cargados de la monocapa.

**Tabla 1.** Corrientes de pico y potenciales de pico para diferentes relaciones molares ANTA:DADOO en electrodos de hilo de oro modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co(II) tras incubación con HRP- $N_{\text{His}}$  7,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Tionina 10  $\mu\text{M}$ . Ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Atmósfera de  $\text{N}_2$ . PBS a pH 7,0.

Relación molar ANTA:DADOO	$i_{p_c}$ ( $\mu\text{A}$ )	$i_{p_a}$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_{p_c}$ (mV)	$E_{p_a}$ (mV)	$\Delta E_p$ (mV)
1:0	0,539	- 0,208	- 172,65	- 143,76	28,89
20:1	0,546	- 0,246	- 165,00	- 136,40	28,60
10:1	0,568	- 0,252	- 173,96	- 141,14	32,82
5:1	0,583	- 0,279	- 160,83	- 134,57	26,26
3:1	0,500	- 0,255	- 160,18	- 126,64	33,54
2,5:1	0,457	- 0,212	- 157,58	- 125,42	32,16
2:1	0,546	- 0,239	- 156,82	- 127,41	29,41
1,5:1	0,500	- 0,239	- 157,58	- 126,64	30,94
1:1	0,495	- 0,238	- 157,16	- 129,32	27,84

$i_{p_c}$ : Corriente de pico catódica.

$E_{p_c}$ : Potencial de pico catódico.

$\Delta E_p$ : Variación de potencial de pico.

$i_{p_a}$ : Corriente de pico anódica.

$E_{p_a}$ : Potencial de pico anódico.

*Efecto de la dilución del nitrilotriacético en la monocapa con DADOO en la actividad de los electrodos funcionalizados con SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co(II)-HRP- $N_{\text{His}}$ .*

Como acabamos de ver en estos experimentos de dilución de ANTA con DADOO, la reversibilidad electroquímica se consigue a costa de disminuir drásticamente la concentración final de grupos ANTA quelantes del  $\text{Co}^{n+}$

por lo que cabe preguntarse si dicha dilución afectaría al recubrimiento de la superficie por moléculas de enzima inmovilizadas. Por ello se analizaron las respuestas electroquímicas de electrodos de HRP-N<sub>His</sub> preparados con distinta relación molar ANTA/DADOO.

En la figura 6 podemos ver voltametrías cíclicas de tionina 10  $\mu\text{M}$  sobre electrodos de oro modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co(II) tras la incubación en HRP-N<sub>His</sub> a distintas relaciones molares ANTA/DADOO en la etapa de reacción con los electrodos TOA-NHS. Con estos electrodos se estudió la actividad electrocatalítica de la Peroxidasa incorporada con peróxido de hidrógeno como sustrato aceptor de electrones.

Cuando realizamos las medidas voltamétricas con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la corriente catalítica medida varía considerablemente en función de la relación ANTA/DADOO en la monocapa. La relación molar con la que se obtuvo una mayor corriente catalítica fue la relación 10:1 con un valor próximo a 35  $\mu\text{A}$ , mientras que con la relación molar 1:1 apenas se midió un 10% de esa corriente catalítica (tabla 2).

Observamos por tanto que existe un conflicto entre las relaciones molares ANTA/DADOO para las que observamos la reversibilidad electroquímica (1:1) y aquellas otras en que tenemos la máxima actividad catalítica (10:1).

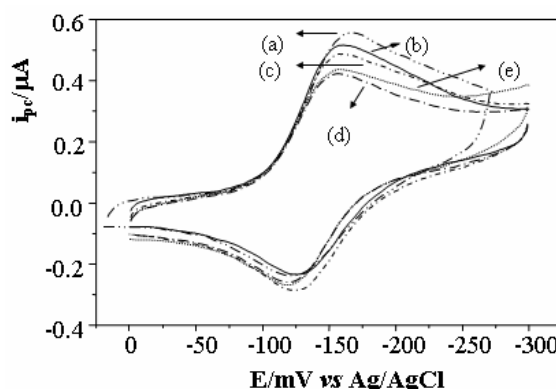
Para tratar de conciliar ambos resultados esto es, mejorar la reversibilidad electroquímica del mediador redox manteniendo un valor elevado de actividad catalítica, ensayamos una estrategia adicional consistente en la neutralización de la carga superficial debida a los carboxilatos de la monocapa mediante la adición del polímero catiónico polietilenimina (PEI).

**Tabla 2.** Corrientes catalíticas obtenidas para diferentes relaciones molares de ANTA/DADOO en electrodos de hilo de oro modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co(II) tras incubación con HRP-N<sub>His</sub> 7,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Tionina 10  $\mu\text{M}$ . Presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PBS a pH 7,0. Atmósfera de N<sub>2</sub>.

Relación molar ANTA:DADOO	Corriente catalítica ( $\mu\text{A}$ )
1:0	23,15
20:1	22,00
10:1	34,73
5:1	26,81
3:1	15,18
2,5:1	11,42
2:1	7,28
1,5:1	5,72
1:1	3,93

*Efecto de la adición de Polietilenimina a electrodos modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO]-Co(II)-HRP-N<sub>His</sub> en la actividad catalítica.*

La figura 7 muestra voltamogramas cíclicos de tionina 10  $\mu\text{M}$  llevados a cabo con electrodos modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO; 10:1]-Co<sup>2+</sup> e incubados sucesivamente con enzima HRP-N<sub>His</sub> y con soluciones acuosas a distinta concentración de polietilenimina, durante 25 minutos, respectivamente, antes de añadir el sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 7.** Voltamogramas cíclicos de electrodos de hilo de oro modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO; 10:1]-Co(II) tras incubación en HRP-N<sub>His</sub> 7,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a diferentes concentraciones de polietilenimina. (a) Sin polietilenimina. (b) Polietilenimina 1 x 10<sup>-4</sup> %. (c) Polietilenimina 5 x 10<sup>-4</sup> %. (d) Polietilenimina 50 x 10<sup>-4</sup> %. (e) Polietilenimina 500 x 10<sup>-4</sup> %. Ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tionina 10  $\mu\text{M}$ . Atmósfera de N<sub>2</sub>. PBS a pH 7,0.

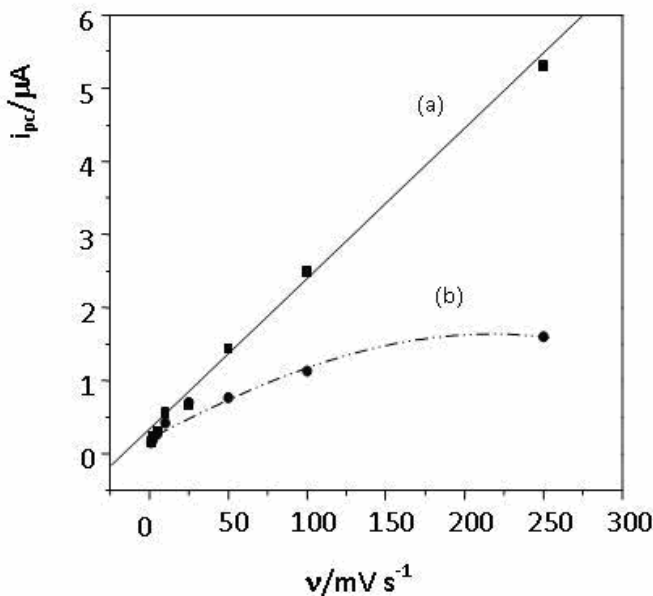
En la tabla 3 se pueden ver los resultados para las distintas diluciones ya corregidos mediante sustracción de las corrientes de fondo en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se observa una fuerte variación de la corriente catalítica dependiendo de la concentración de la polietilenimina en la etapa de incubación. Así cuando la concentración de polímero fue de 50 x 10<sup>-4</sup> % p/v, la corriente catalítica apenas alcanzó un valor de 9,80  $\mu\text{A}$ . En cambio el resultado obtenido para el electrodo incubado con 5 x 10<sup>-4</sup> % de polímero fue de 32,90  $\mu\text{A}$ , es decir un 95 % con respecto a la corriente catalítica del electrodo *sin polímero* que fue de 34,73  $\mu\text{A}$ .

De estos resultados parece claro que la presencia del polímero mejora la reversibilidad electroquímica del mediador tionina soportando corrientes catalíticas tan altas como las que se conseguían con relaciones molares ANTA/DADOO 10:1. Una confirmación adicional del fenómeno de la adsorción electrostática de la tionina sobre el electrodo se obtuvo analizando el efecto del polímero polietilenimina sobre la dependencia de las corrientes anódicas y catódicas con la velocidad de barrido de tionina.

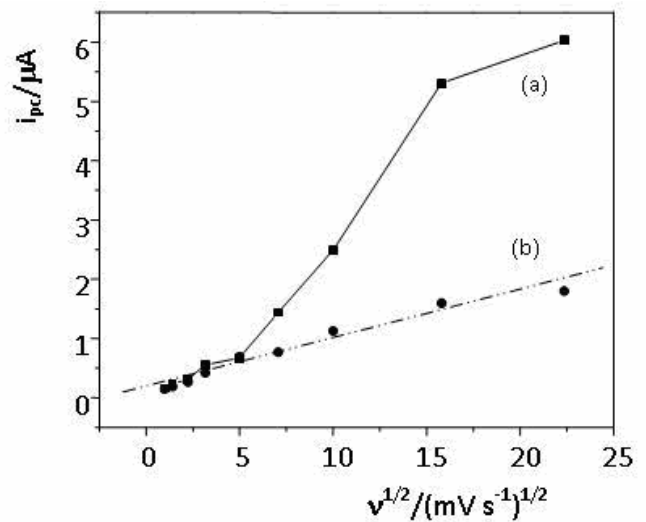
**Tabla 3.** Corrientes catalíticas obtenidas en electrodos de hilo de oro modificados con monocapas SAM-TOA-[ANTA/DADOO; 10:1]-Co(II) tras incubación en HRP-N<sub>His</sub> 7,7 µg mL<sup>-1</sup> a diferentes concentraciones de polietilenimina.

Concentración de polietilenimina (% p/v) x [10 <sup>-4</sup> ]	Corriente catalítica (µA)
0	34,73
1	24,80
5	32,90
50	9,80
500	7,30

Las figuras 8 y 9 presentan los resultados de la variación de las intensidades del pico catódico frente a la velocidad de barrido del mediador en una monocapa con ANTA:DADOO, 10:1 que muestran una dependencia lineal con la velocidad de barrido en ausencia de polímero (Fig. 8), sugerente de un proceso electroquímico de una especie adsorbida, mientras que en otro electrodo análogo pero incubado previamente en PEI, la dependencia de la intensidad es ahora lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Fig. 9), comportamiento típico de especies electroquímicamente reversibles en solución.



**Figura 8.** Relación entre velocidad de barrido (v) y corriente de pico catódica en electrodos de oro modificados con monocapa SAM-TOA-[ANTA:DADOO; 10:1]-Co(II) en: (a) Ausencia de polietilenimina. (b) Con polietilenimina 5 x 10<sup>-4</sup>%p/v. PBS a pH 7,0. Atmósfera de N<sub>2</sub>.



**Figura 9.** Relación entre velocidad de barrido (v<sup>1/2</sup>) y corriente de pico catódica en electrodos de oro modificados con monocapa SAM-TOA-[ANTA:DADOO; 10:1]-Co(II) en: (a) Ausencia de polietilenimina. (b) Con polietilenimina 5 x 10<sup>-4</sup>%p/v. PBS a pH 7,0. Atmósfera de N<sub>2</sub>.

Para estudios posteriores la relación molar entre ANTA/DADOO queda así establecida en 10:1 y la concentración del polímero en 5 x 10<sup>-4</sup> % p/v. Bajo estas condiciones, obtenemos una mejor reversibilidad del proceso (ΔE<sub>p</sub>=33 mV) y una respuesta catalítica alta (32,9 µA).

**Conclusiones**

A modo de recapitulación podemos concluir que se ha conseguido preparar electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de complejos de nitrilotriacético-cobalto con las siguientes características:

- (a) Son estables en la ventana de potenciales redox donde tiene lugar la catálisis de las peroxidasas mediada por tionina.
- (b) Mediante una dilución de las cadenas de ANTA con DADOO permitiendo una electroquímica reversible de la tionina y
- (c) Mediante una modificación de la superficie con el polímero polietilenimina se elimina la adsorción de la especie oxidada del mediador en el electrodo Au-SAM-TOA-[ANTA-Co<sup>2+</sup>-DADOO].

Se dispone por tanto de un soporte idóneo para investigar la incorporación específica y orientada de enzimas redox modificadas con colas de histidina para dar lugar a electrodos enzimáticos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al CDCHT-ULA (Proyecto FA-408-07-08-B) por el financiamiento de este trabajo. Igualmente agradecen al Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC (Madrid-España) y a la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela) por la colaboración prestada en la realización de este trabajo, así como a la Dra. Elena E. Ferapontova y a la Dra. Irina Gazaryan de la Moscow State University por la preparación y donación de la proteína HRP-N<sub>His</sub>.

### Referencias

1. Matheus P. Diseño y Preparación de Electrodo Enzimáticos Basados en Interacciones Específicas: Desarrollo de Estrategias para su Estabilización. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España (2003).
2. Pishko MV, Katakis I, Lindquist SE, Ye L, Gregg BA, Heller A. Direct Electrical Communication Between Graphite Electrodes and Surface Adsorbed Glucose Oxidase/Redox Polymer Complexes. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, **29**, 82-84 (1990).
3. Updike JW, Hicks JP. The Enzyme Electrode. **Nature**, **214**, 986-988 (1967).
4. Umaña M y Waller J. The Glucose Oxidase/Polypyrrole System. **Anal. Chem.**, **58**, 2979-2983 (1986).
5. Gorton L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues and cells. **Electroanalysis**, **7**, 23-45 (1995).
6. Alegret S. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. **Analyst**, **121**, 1751-1758 (1996).
7. Wang J, Park DS, Pamidi PV. Tailoring the Macroporosity y Performance of Sol-Gel Derived Carbon Composite Glucose Sensors. **J. Electroanal. Chem.**, **434**, 185-189 (1997).
8. Tatsuma T y Watanabe T. Enzyme Monolayer-and Bilayer-Modified Electrodes with Diaphorase and Dehydrogenases. **J. Electroanal. Chem.**, **310**, 149-157 (1991).
9. Madoz J, Kuznetsov BA, Medrano FJ, García JL, Fernández VM. Functionalization of Gold Surfaces for Specific and Reversible Attachment of a Fused  $\beta$ -Galactosidase and Choline-Receptor Protein. **J. Am. Chem. Soc.**, **119**, 1043-1051 (1997).
10. Ataka K, Giess F, Knoll W, Naumann R, Haber-Pohlmeier S, Björn R, Heberl J. Oriented Attachment and Membrane Reconstitution of His-Tagged Cytochrome *c* Oxidase to a Gold Electrode: In Situ Monitoring by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, **126**, 16199-16206 (2004).
11. Matheus P, Abad JM, Fernández VM. Modificación de Superficies de Oro para la Inmovilización Orientada de *peroxidasa de rábano* recombinante. **Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia**, **30**, 225-235 (2007).
12. Abad JM, Vélez M, Santamaría C, Guisán JM, Matheus PR, Vázquez L, Gazaryan I, Gorton L, Gibson T, Fernández VM. Immobilization of Peroxidase Glycoprotein on Gold Electrodes Modified with Mixed Epoxy-Boronic Acid Monolayers. **J. Am. Chem. Soc.**, **124**, 12845-12853 (2002).
13. Bergmeyer HU, Gawehn K, Grabl M. Enzyme als Biochemische Reagentien. In: Methoden der enzymatischen Analyse, (I) Verlag Chemie, Weinheim., 526-528 (1970).
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**, 248-254 (1976).
15. Grigorenko V, Chubar T, Kapeliuch Y, Borchers T, Spener F, Egorov A. New Approaches for Functional Expression of Recombinant *Horseradish peroxidase C* in *Escherichia coli*. **Biocatalysis and Biotransformation**, **17**, 359-379 (1999).
16. Egorov AM, Gazaryan IG, Kim BB, Doseeva VV, Kapeliuch JL, Vervovkin AN, Fechina VA. Horseradish peroxidase isozyme C. A comparative study of native and recombinant enzyme produce by *E. Coli* transformants. **Annals New York Academy of Sciences**, **721**, 73-82 (1994).
17. Matheus PR, Abad JM, Fernández L, Blandria OM, Fernández VM. Influencia del Estado de Oxidación del Ión Cobalto en la Estabilidad de Electrodo Modificados con Monocapas SAM-TOA-ANTA-Co<sup>nt</sup>-HRP-N<sub>His</sub>. **Avances en Química**, **3**, (2), 69-77 (2008).
18. Abad JM. La Microbalanza de Cristal de Cuarzo como Transductor en el Desarrollo de Biosensores. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España (2000).
19. Ruan CH, Yang F, Lei CH, Deng J. Thionine Covalently Tethered to Multilayer Horseradish peroxidase in a Self-assembled Monolayer as an Electron-Transfer Mediator. **Anal. Chem.**, **70**, 1721-1725 (1998).