



Influencia del Estado de Oxidación del Ión Cobalto en la Estabilidad de Electrodo Modificados con Monocapas SAM-TOA-ANTA-Coⁿ⁺-HRP-N_{His}.

Pedro R. Matheus^{*1}, José María Abad², Lenys Fernández³, Olga M. Belandria¹ y Víctor M. Fernández²

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. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.

(*) e-mail: pmateus@ula.ve

Recibido: 10/06/08

Revisado: 24/06/08

Aceptado: 09/07/2008

Resumen:

Se realizaron estudios con Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) para investigar la adsorción de la enzima HRP-N_{His} (*peroxidasa de rábano*), a la que se ha añadido una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal. La QCM operó en flujo a una velocidad de 0,025 mL min⁻¹ sobre un cristal cuyo electrodo de oro fue modificado con monocapas de SAM-TOA-ANTA-Co²⁺ y SAM-TOA-ANTA-Co³⁺, esta última obtenida a partir de la oxidación electroquímica de una monocapa SAM-TOA-ANTA-Co²⁺. Los resultados obtenidos sugieren que la unión de la HRP-N_{His} a la monocapa es muy similar para ambos estados de oxidación del ión cobalto; por el contrario, la desorción es dramáticamente diferente. Así, mientras que las uniones ligando-Co²⁺ son reversibles con lo cual la proteína anclada es fácilmente desplazable por moléculas de imidazol, este mismo tipo de complejo es inerte respecto al intercambio de ligandos en el estado de oxidación 3+ del ión cobalto.

Palabras clave: monocapas autoensambladas de tioles; estado de oxidación ión cobalto; microbalanza de cristal de cuarzo.

Abstract

Influence of state oxidation of cobalt ion in the stability electrodes modified with monolayers SAM-TOA-ANTA-Coⁿ⁺-HRP-N_{His}. Quartz Crystal Microbalance (QCM) was used to investigate the adsorption of the HRP-N_{His} enzyme (*horseradish peroxidase*), which was modified by the addition of a tail of six histidine on its extreme N-terminal. The QCM operating at flow of 0.025 mL min⁻¹ on a crystal whose gold electrode was modified with monolayers of SAM-TOA-ANTA-Co²⁺ and SAM-TOA-ANTA-Co³⁺. The oxidize form was obtained from the electrochemical oxidation of a monolayer of SAM-TOA-ANTA-Co²⁺. The results suggest that the HRP-N_{His} is attached to both monolayers in a similar way; on the contrary, the desorption of the attached protein is dramatically different. Thus, whereas the ligand-Co²⁺ bonds are reversible, which allows that the anchored protein is easily replaced by imidazol molecules. The 3+ oxidation state of the metal does not allow the interchange of protein by the imidazol molecules.

Keywords: thiol self-assembled monolayers; state of oxidation ion cobalt, quartz crystal microbalance.

Introducción

El método de síntesis *a la carta* de monocapas autoensambladas de tioles sobre soportes de oro se lleva a cabo en nuestro laboratorio mediante etapas sucesivas de química en fase sólida y ha demostrado ser un método fiable y versátil que además tiene lugar con excelentes rendimientos. 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. Entre los sistemas de afinidad preparados en nuestro laboratorio merecen destacarse los siguientes: i) monocapas que exponen al medio moléculas de colina con afinidad por β -galactosidasa fusionada con el motivo de unión a colina del enzima (acetil muramoyl)-L-alanina amidasa (C-LYTA)¹, ii) monocapas de nitrilotriacéticos con iones metálicos de la primera serie de transición, con afinidad por α -hélices con histidinas²⁻⁴, iii) monocapas con moléculas de fenilboronatos con afinidad por las cadenas glicídicas de glicoproteínas^{3,5}. Estos ejemplos, junto con otros muchos de la literatura⁶⁻⁸, ilustran la versatilidad de

las monocapas autoensambladas funcionalizadas en unión a la ingeniería genética de proteínas como plataforma para el diseño de arquitecturas supramoleculares funcionales.

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. Con estas herramientas hemos preparado superficies nanoestructuradas de la enzima *peroxidasa de rábano* (HRP). Esta investigación la realizamos utilizando un método de transducción piezoeléctrico como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). Los cambios de masa originados como consecuencia de la reacción de reconocimiento biológico pueden transformarse en señales eléctricas mediante transductores piezoeléctricos. Este sistema de transducción es muy utilizado en reacciones biológicas, en las que no se producen cambios significativos en las propiedades físico-químicas del sistema⁵.

La enzima utilizada en el presente estudio ha sido la 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 porfirínico⁴.

El objetivo de este trabajo es investigar la adsorción de la enzima HRP-N_{His} mediante estudios con QCM, funcionalizando al electrodo de oro que recubre al cristal de cuarzo resonante con monocapas autoensambladas de tioles^{3,4}. Además, se realizaron medidas de adsorción y desorción de la proteína, se estudió la reversibilidad de la unión Co(II)-proteína y la estabilidad de la unión Co(III)-proteína.

Parte experimental

Actividad enzimática y concentración de la enzima HRP-N_{His}

La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando el método descrito por Bergmeyer⁹. La concentración de la enzima se determinó por el método de Bradford¹⁰. La peroxidasa de rábano HRP-N_{His} 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^{11,12}. Las disoluciones de esta enzima fueron preparadas en tampón fosfato 50 mM (PBS) a pH

7,0 a concentraciones de 0,25 mg mL⁻¹ y se alicuotaron en volúmenes de 20 µL, siendo conservados en el frigorífico a 4 °C.

Limpieza de los electrodos.

Los cristales de cuarzo con superficie de oro se sumergieron en disolución piraña durante 5 minutos (3 partes de ácido sulfúrico concentrado y una parte de peróxido de hidrógeno al 30 % en relación volumen-volumen). La preparación se realizó en la campana extractora añadiendo lentamente el sulfúrico sobre el peróxido, por ser una reacción altamente peligrosa. Seguidamente se lavaron con agua bidestilada (18 MΩ), se enjuagaron con etanol-agua (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^{3,4}. Para las medidas de QCM se utilizó una celda electroquímica de vidrio de un sólo compartimiento acoplada a una sonda de teflón (TPS-550, Maxtek). La celda permite trabajar con volúmenes de 3 mL de solución o menores. Para las medidas cinéticas, se utilizó una celda de flujo Maxtek Inc. de 100 µL de volumen acoplada a la sonda de teflón, con conexiones de entrada y salida a una bomba peristáltica (Eyela MP-3). Como electrodo auxiliar se utilizó un hilo de platino con 99,99% de pureza y como electrodo de referencia uno de Ag/AgCl, 3M en KCl. El control de temperatura se efectuó introduciendo la celda en una camisa de latón conectada a un baño termostático Hetofrig a 25,00 ± 0,05°C.

El sistema está compuesto por un cristal de cuarzo de corte AT de 5 MHz de frecuencia de resonancia (Maxtek Inc.), de 25 mm de diámetro. El electrodo de oro pulido (electrodo de trabajo) está depositado sobre una capa de titanio, como adherente, y al hacer la instalación esta cara del cristal queda expuesta a la solución. El área geométrica del electrodo de trabajo fue de 1,370 cm² y el área piezoeléctrica fue de 0,317 cm². La sensibilidad teórica es de 5,8 ng Hz⁻¹. En la sonda está integrado el circuito de oscilación. La frecuencia del oscilador se mide mediante un medidor de frecuencia (PM-740, Maxtek) con la fuente de voltaje integrada. Los datos se registraron y procesaron mediante la conexión del sistema a un ordenador PC 486/DX2. Los experimentos en el caso del quelato metálico formado con Co(II) 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. En cuanto a la preparación de la monocapa con quelato de Co(III), el cobalto de la monocapa se ha oxidado previamente a Co^{3+} electroquímicamente¹⁻³.

Resultados y discusión

Caracterización electroquímica.

Es sabido que el ión Co^{2+} en disolución es muy estable frente a la oxidación, pero una vez que forma parte del complejo octaédrico con ANTA su oxidación a complejos octaédricos de Co^{3+} de bajo spin está muy facilitada. Esto es consecuencia de que la energía de estabilización de campo cristalino de Co(III) con una configuración d^6 es mas alta que la que corresponde al complejo Co(II) con una configuración d^7 . El ANTA tiene la estructura siguiente:

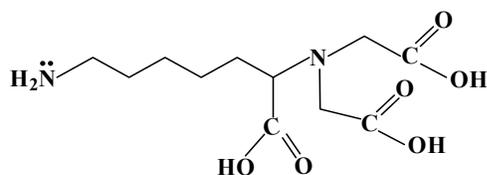


Figura 1. Estructura del ANTA.

Éste posee capacidad quelante por el extremo nitrilotriacético y un grupo amino capaz de unirse a la monocapa por el otro extremo. Para discutir la estabilidad de las monocapas formadas: SAM-TOA-ANTA-Co(II) y SAM-TOA-ANTA-Co(III) [SAM: Monocapa autoensamblada de tioles; TOA: Ácido ditióctico], podemos tomar como base la *teoría electrostática del campo cristalino* (TECC). Según esta teoría, los efectos del campo cristalino son producidos por las interacciones de los orbitales d de un metal de transición, en nuestro caso el cobalto, con los grupos ligantes que lo rodean; d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} (niveles triplemente degenerados, t_{2g}) y d_z^2 , $d_{x^2-y^2}$ (niveles doblemente degenerados, e_g). Para las monocapas formadas con complejos de Co^{2+} y complejos de Co^{3+} , el número de coordinación es 6 con geometría octaédrica para ambos casos¹³⁻¹⁸. Los diagramas de las figuras 2 y 3 representan la distribución de electrones correspondientes a los complejos de Co^{3+} y complejos de Co^{2+} respectivamente, de acuerdo con la TECC. El valor de Δ_o (estabilidad ganada) para el complejo con Co^{3+} se calcula de la manera siguiente:

$$3/5 \Delta_o + 2/5 \Delta_o = \Delta_o \Leftrightarrow 0,6 \Delta_o + 0,4 \Delta_o = \Delta_o \Rightarrow$$

$$(-0,6 \Delta_o \times 0 e^-) + (0,4 \Delta_o \times 6 e^-) \Rightarrow \Delta_o = 2,4$$

Para el caso del complejo con Co^{2+} :

$$(-0,6 \Delta_o \times 1 e^-) + (0,4 \Delta_o \times 6 e^-) \Rightarrow \Delta_o = 1,8$$

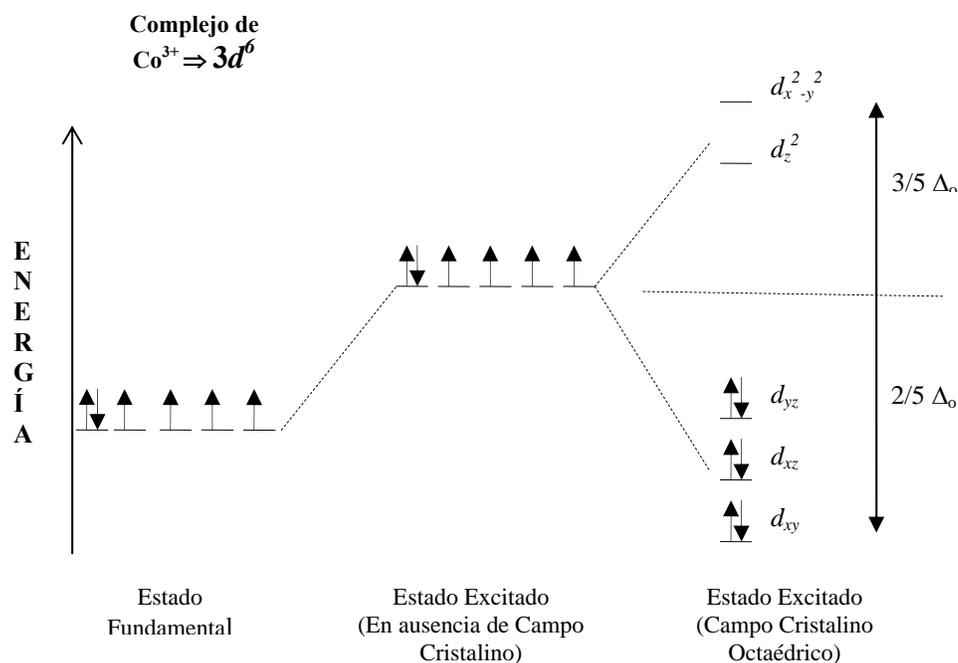


Figura 2. Diagrama de desdoblamiento de los niveles de energía para la configuración octaédrica del complejo de Co^{3+} .

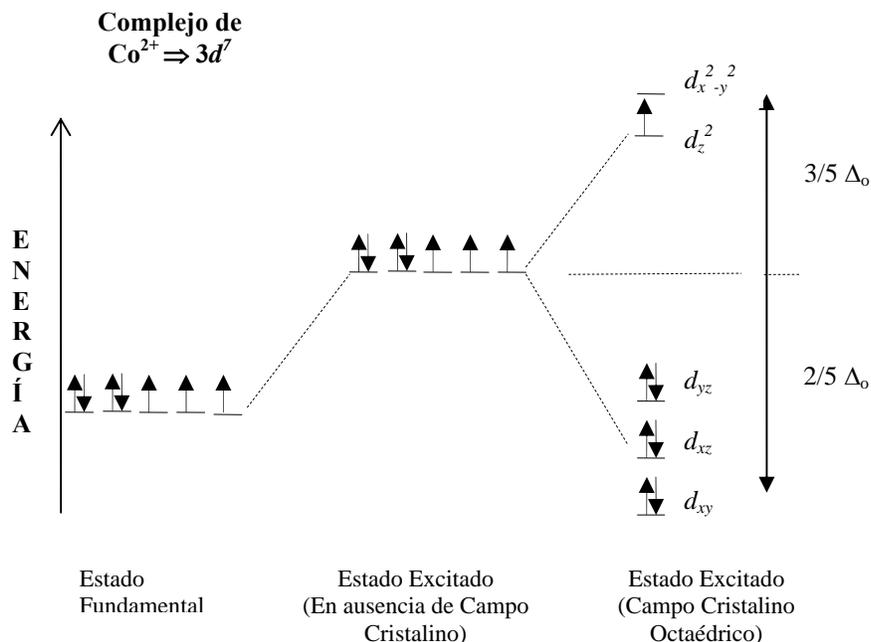


Figura 3. Diagrama de desdoblamiento de los niveles de energía para la configuración octaédrica del complejo de Co²⁺.

Al comparar los valores de Δ_o de ambos complejos notamos que para el caso del Co³⁺ el valor de Δ_o es superior al obtenido para el complejo de Co²⁺ ($2,4 > 1,8$). Estos valores también son reportados en la bibliografía¹⁵⁻¹⁸.

Por lo tanto, el complejo de Co³⁺ es diamagnético de campo fuerte o bajo spin (todos los electrones apareados y ocupando el orbital t_{2g}). Para el caso del complejo de Co²⁺, éste se comporta como ión paramagnético, también de campo fuerte o bajo spin¹³⁻¹⁸. A manera general se dice

que: “A mayor estado de oxidación del ión metálico, mayor será la separación por el campo cristalino”.

En los electrodos SAM-TOA-ANTA-Co²⁺, la incorporación del ión metálico a la monocapa pudo detectarse electroquímicamente mediante la onda de oxidación del ión Co²⁺ a Co³⁺ a 290 mV. La figura 4 muestra barridos lineales sucesivos de oxidación en el rango 0-500 mV vs Ag/AgCl, que indican la progresiva desaparición del pico de oxidación, la cual es indetectable en el tercer barrido.

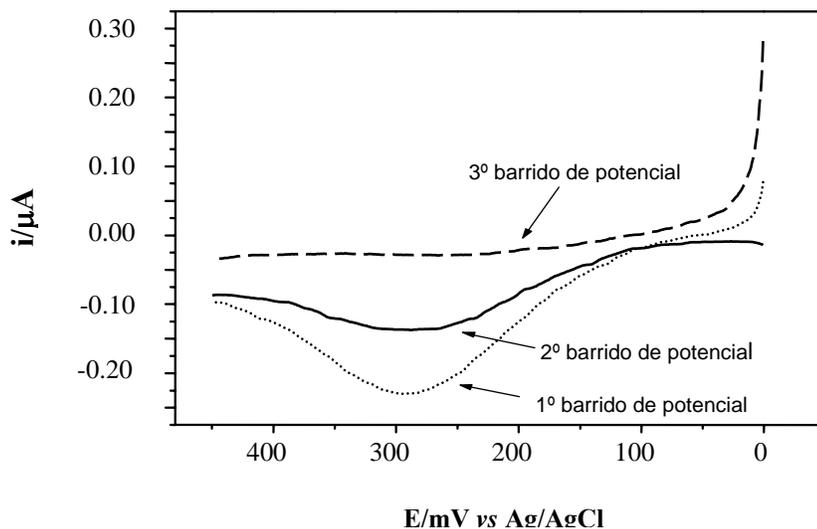


Figura 4. Barridos lineales sucesivos de oxidación de Co(II) a Co(III) en electrodos de oro modificados con monocapas SAM-TOA-ANTA-Co(II). PBS a pH 7,0. Atmósfera de N₂. Velocidad de barrido 1 mV s⁻¹.

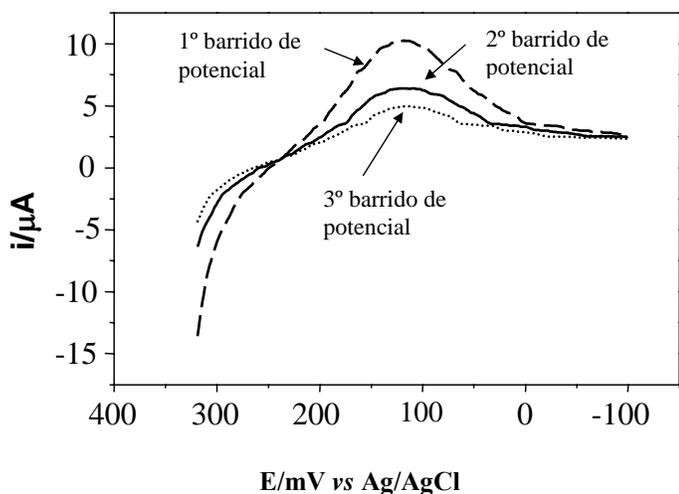


Figura 5. Barridos lineales sucesivos de reducción de Co(III) a Co(II) en electrodos de oro modificados con monocapas SAM-TOA-ANTA-Co(III) obtenidos mediante oxidación con H_2O_2 0,8 mM y posterior reducción electroquímica. Incubando en HRP- N_{His} $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de la reducción del Co(III). PBS a pH 7,0. Velocidad de barrido 1 mV s^{-1} . Atmósfera de N_2 .

Para investigar el proceso contrario, la reducción de Co^{3+} a Co^{2+} , los electrodos SAM-TOA-ANTA- Co^{2+} se oxidaron químicamente mediante incubación durante 20 minutos en una disolución 0,8 mM de H_2O_2 y posterior reducción electroquímica. La figura 5 muestra barridos lineales de reducción sucesivos donde se observa la onda de reducción del ión Co(III) a 120 mV, que tiende a desaparecer en barridos sucesivos.

Este conjunto de experimentos describen una ruta sintética para electrodos funcionalizados con complejos de cobalto, y son confirmatorios de la presencia de cobalto en la estructura de la monocapa e indican además que es posible cambiar el estado redox del ión cobalto incorporado a la monocapa modulando el potencial aplicado al electrodo.

Medidas de la proteína adsorbida.

Como se ha descrito anteriormente^{3,4}, el electrodo de oro que recubre al cristal de cuarzo resonante en la QCM, se puede funcionalizar con monocapas autoensambladas de SAM-TOA-ANTA- $\text{Co}(\text{II})$. Para investigar la adsorción de la enzima HRP- N_{His} sobre este tipo de electrodos, se llevaron a cabo experimentos con microbalanza de cristal de cuarzo operando en flujo a una velocidad de $0,025 \text{ mL min}^{-1}$.

La figura 6, muestra la estabilidad de la balanza (0 a 20 min.) cuando se pasa un flujo de tampón fosfato 50 mM pH 7,0 a 25°C y como comienza a variar la frecuencia de oscilación cuando la solución circulante contiene la

proteína HRP- N_{His} a una concentración de $26 \mu\text{g mL}^{-1}$. Al cabo de unos 50 minutos de fluir la solución de enzima se alcanza un plató en la variación de la frecuencia indicativo de haber alcanzado el equilibrio. La variación total de frecuencia observada es de 16 Hz que corresponde a una cantidad de masa adsorbida de $0,28 \mu\text{g cm}^{-2}$. Teniendo en cuenta el peso molecular del enzima de 44.000 daltons y el área efectiva del disco de oro, se mide un recubrimiento de proteína de $6,4 \times 10^{-12} \text{ moles cm}^{-2}$, que concuerda con una monocapa de ese peso molecular⁵.

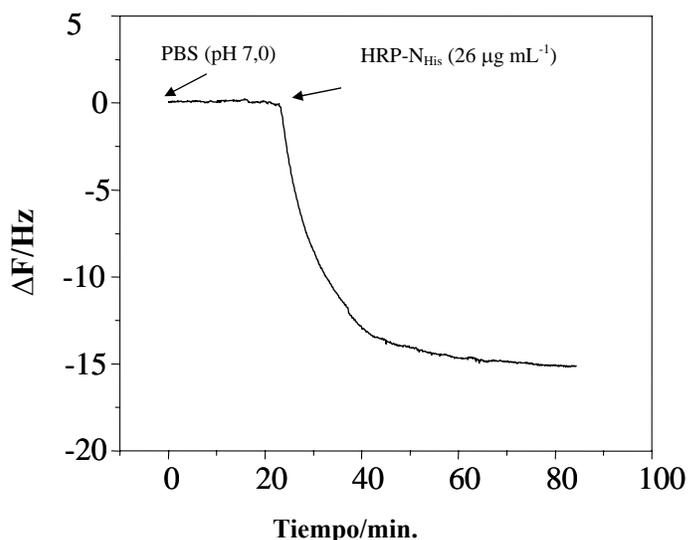


Figura 6. Experimento de QCM de unión de la proteína HRP- N_{His} $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ a un electrodo modificado con una monocapa SAM-TOA-ANTA- $\text{Co}(\text{II})$. PBS a pH 7,0. Temperatura 25°C .

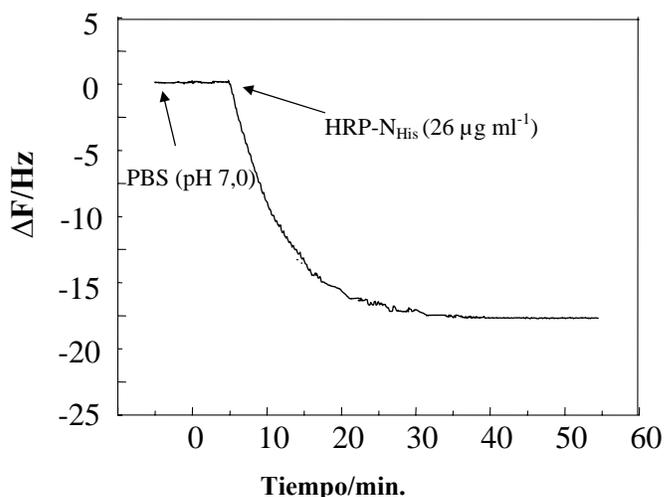


Figura 7. Experimento de QCM de unión de la proteína HRP- N_{His} a un electrodo modificado con una monocapa SAM-TOA-ANTA- $\text{Co}(\text{III})$. PBS a pH 7,0. Temperatura 25°C .

La figura 7 muestra un experimento similar pero en el que previamente el cobalto de la monocapa se ha oxidado electroquímicamente a Co^{3+} (ver fig. 4). Como puede verse el perfil de adsorción es muy similar al de la figura anterior con Co^{2+} en condiciones similares.

Medidas de adsorción y desorción de la proteína.

La figura 8 muestra la variación de frecuencia utilizando electrodos de oro modificados con monocapa SAM-TOA-ANTA- Co(II) y SAM-TOA-ANTA- Co(III) , cuando después de 100 minutos se adiciona imidazol a la solución. En presencia de imidazol cuando la monocapa contiene Co(II) se observa un aumento en el cambio de frecuencia al aumentar la concentración de imidazol, lo que se traduce en una disminución de la cantidad de material adsorbido sobre la superficie eléctrica, indicando que el imidazol revierte la adsorción de la enzima. Mientras que cuando la monocapa contiene Co(III) , en presencia de imidazol el cambio de frecuencia es despreciable, lo que demuestra la buena estabilidad de la unión de la enzima con la monocapa SAM-TOA-ANTA- Co(III) .

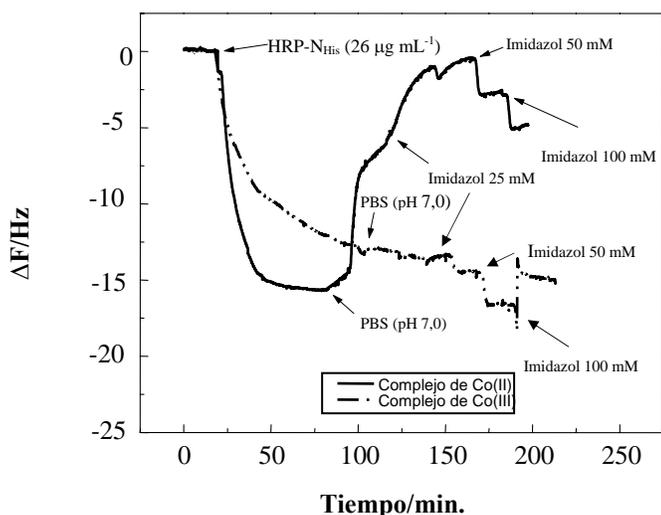


Figura 8. Experimento de QCM de unión de $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ a electrodos modificados con monocapas SAM-TOA-ANTA con complejos de Co(II) y complejos de Co(III) a concentración de proteína de $26 \mu\text{g mL}^{-1}$. Velocidad de flujo $25 \mu\text{L min}^{-1}$. Temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

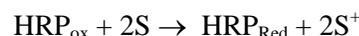
Reversibilidad de la unión Co(II) -proteína y estabilidad de la unión Co(III) -proteína.

La figura 9 muestra el comportamiento del sistema en flujo continuo cuando este contiene: $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ (25 a 50 min.), PBS (55 min.), imidazol (175 a 225 min.). A los 250 minutos se realiza la oxidación del cobalto con H_2O_2 $0,8 \text{ mM}$. Al aumentar la concentración de imidazol (puntos 3 y 4 de la curva) el aumento en la frecuencia se hace mayor,

lo que confirma que el imidazol tiene la tendencia a revertir la adsorción de la enzima sobre la monocapa. Una vez que se introduce $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ en el flujo (punto 1' en la curva), la frecuencia vuelve a disminuir indicando la renovación de la enzima en la monocapa. Cuando este último electrodo se oxidó con H_2O_2 $0,8 \text{ mM}$ (punto 2' de la curva) y se introdujo nuevamente imidazol en el torrente (puntos 3' y 4' de la curva), la frecuencia disminuyó, indicando la estabilidad del complejo de Co(III) en la monocapa frente a la presencia de imidazol.

Estudios de voltametría cíclica: medida de la actividad catalítica retenida.

La figura 10 muestra el comportamiento catalítico en la reducción de H_2O_2 de hilos de oro modificados con las monocapas SAM-TOA-ANTA- Co(II) y SAM-TOA-ANTA- Co(III) (el cual se obtuvo sometiendo a un electrodo modificado con SAM-TOA-ANTA- Co(II) a una etapa de oxidación electroquímica), previamente incubados en una disolución de $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se utilizó la tionina como sustrato donador de electrones (mediador redox soluble). En presencia de H_2O_2 en solución, sobre ambos electrodos se observa un comportamiento catalítico en la reducción de H_2O_2 , el cual se caracteriza por incremento en el pico de reducción y una completa desaparición de la corriente de oxidación correspondiente a la respuesta electroquímica de la tionina de acuerdo al siguiente mecanismo de reacción:



donde S y S^+ son el sustrato donador de electrones (tionina) y su producto de oxidación monoelectrónica respectivamente.

En la figura 10 se muestra que el valor de corriente catalítica obtenida sobre el electrodo modificado con SAM-TOA-ANTA- Co(II) tras incubación en $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de $25 \mu\text{A}$ [trazo (a)], mientras que sobre el electrodo modificado con SAM-TOA-ANTA- Co(III) tras incubación en $\text{HRP-N}_{\text{His}}$ $7,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ la corriente catalítica fue $19,8 \mu\text{A}$ [trazo (b)]. En la respuesta de un tercer electrodo modificado con SAM-TOA-ANTA- Co(II) , el cual previamente fue incubado en enzima y posteriormente en imidazol 100 mM [trazo (c)], se observa una corriente catalítica inferior al 10 % de la obtenida sobre los electrodos control (a y b). Estos resultados muestran la estabilidad de la unión $\text{HRP-N}_{\text{His}}\text{-Co(III)}$ [trazo (b)] en comparación con la que tiene el complejo $\text{HRP-N}_{\text{His}}\text{-Co(II)}$ [trazo (c)], frente a la sustitución de los ligandos histidinas por imidazoles en el tampón.

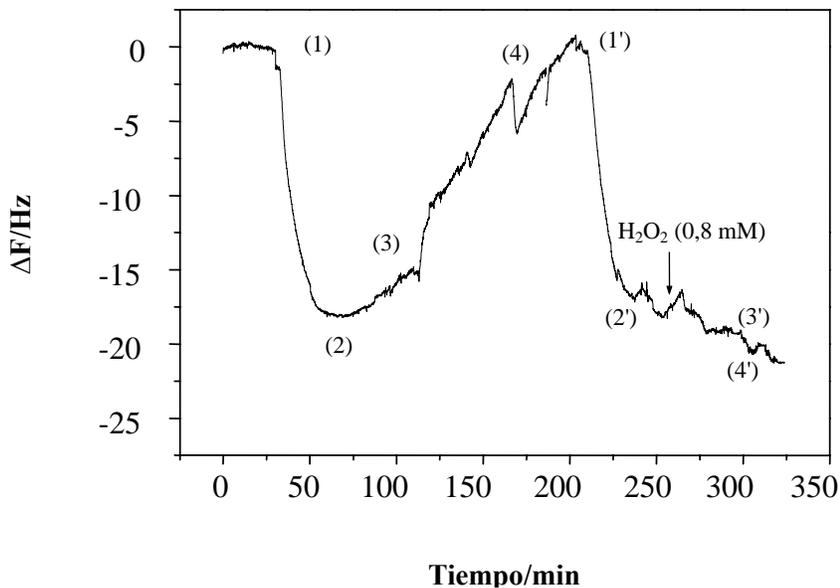


Figura 9. Experimento de QCM para estudiar la reversibilidad y la estabilidad de la unión complejo metálico-HRP-N_{His} en electrodos modificados con monocapas SAM-TOA-ANTA con complejos de Co(II) y Co(III). (1) y (1') Flujo de HRP-N_{His} a 26 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (2) y (2') Flujo de PBS a pH 7,0. (3) y (3') Flujo de imidazol 25 mM. (4) y (4') Flujo de imidazol 50 mM. Velocidad de flujo 25 $\mu\text{L min}^{-1}$. Temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$.

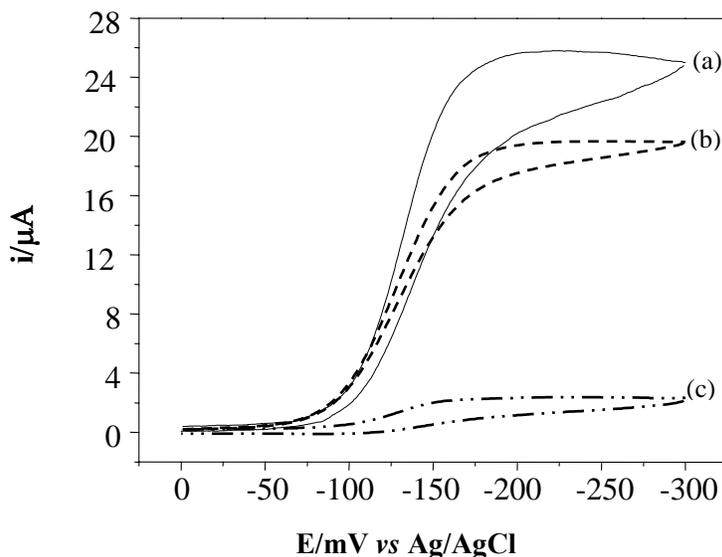


Figura 10. Voltamogramas cíclicos de electrodos de oro modificados con monocapas SAM-TOA-ANTA-Co(II) tras incubación en HRP-N_{His} 7,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (a) Sin incubación previa en imidazol. (b) Oxidando el Co(II) a Co(III) en forma electroquímica y posterior incubación en imidazol 100 mM por 20'. (c) Incubando en imidazol 100 mM durante 20' [sin oxidación del Co (II)]. H₂O₂ 0,8 mM. Tionina 10 μM . PBS a pH 7,0. Velocidad de barrido 5mV seg^{-1} . Atmósfera de N₂.

Los experimentos que hemos llevado a cabo nos indican que la unión a la monocapa de la HRP-N_{His} es muy similar para ambos estados de oxidación del ión cobalto, mientras las velocidades de desorción de la proteína unida son diferentes. En Co³⁺ ni siquiera en presencia de concentraciones 50 mM de imidazol se desorbe la

proteína, mientras que en Co²⁺, basta un lavado con tampón para que buena parte de la proteína se eluya.

El ión cobalto tiene tendencia a formar complejos octaédricos con ligandos multidentados. En particular el ANTA es un quelante tetradentado, a través del nitrógeno del grupo nitrilo y los tres carboxilatos¹⁴, que posee una

buena afinidad por el ión Co^{2+} . En los complejos ANTA- Co^{2+} y ANTA- Co^{3+} , cuatro de los seis sitios de coordinación del metal están ocupados por el ligando quedando dos vacantes de coordinación habitualmente ocupadas por moléculas de agua del medio o iones hidroxilo, que se intercambian fácilmente con nucleófilos fuertes, tales como el núcleo imidazólico del aminoácido histidina en el estado de valencia Co^{2+} . Esta facilidad de intercambio es la que permite que las histidinas de la proteína tengan acceso a los dos sitios de coordinación inicialmente ocupados por moléculas de H_2O , trayendo como consecuencia la formación de una unión estable debido a la ocupación de más de una vacante de coordinación.

La elección de los complejos Co-ANTA, para conseguir los fines perseguidos en este trabajo, ha venido dictada por la diferencia en la velocidad de intercambio de los ligandos en función del estado de oxidación del ión metálico. Así, mientras que las uniones ligando- Co^{2+} son reversibles con lo cual la proteína anclada es fácilmente desplazable por moléculas de imidazol, este mismo tipo de complejo es inerte respecto al intercambio de ligandos en el estado de valencia $3+$ del ión Cobalto. Es esta propiedad del complejo la que evita que la HRP- N_{His} se eluya en presencia de imidazol a menos que se lleve a cabo la reducción del ión metálico.

Conclusiones

Los experimentos mostrados en esta investigación indican que es posible controlar el estado redox de los iones cobalto unidos a monocapas SAM-TOA-ANTA- Co^{n+} a través del potencial aplicado al electrodo y por tanto, controlar el tiempo de residencia de la enzima sobre el electrodo. Hemos conseguido en este trabajo un interruptor reversible del proceso de inmovilización de proteínas portadoras de colas de histidinas. Este concepto podría implantarse en la preparación de arrays micro y nanométricos con vistas al desarrollo de sensores multianálisis donde el control de la densidad y orientación de las proteínas sensoras cobra una especial importancia debido a la miniaturización de los dispositivos.

Las interacciones específicas entre secuencias repetitivas de histidinas en la proteína y complejos octaédricos de iones cobalto con vacantes de coordinación da lugar a monocapas de enzimas modificadas genéticamente sobre electrodos de oro. Esta unión es revertida por moléculas de imidazol cuando el cobalto tiene estado de oxidación $2+$ mientras que resisten el desplazamiento por imidazol cuando el ión cobalto se oxida.

Agradecimientos

Los autores 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. Igualmente agradecen 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 modificada.

Referencias bibliográficas

1. Madoz, J., Kuznetsov, B.A.; Medrano, F.J.; García, J.L. y Fernández, V.M. Functionalization of Gold Surfaces for Specific and Reversible Attachment of a Fused β -Galactosidase and Choline-Receptor Protein. **J. Am. Chem. Soc.**, **119**, 1043-1051 (1997).
2. Madoz-Gúrpide, J.; Abad, J.M.; Fernández-Recio, J.; Vélez, M.; Vázquez, L.; Gómez-Moreno, C. y Fernández, V.M. Modulation of Electroenzymatic NADPH Oxidation Through Oriented Immobilization of Ferredoxin:NADP⁺ Reductase onto Modified Gold Electrodes. **J. Am. Chem. Soc.**, **122**, 9808-9817 (2000).
3. Matheus P. Diseño y Preparación de Electroodos Enzimáticos Basados en Interacciones Específicas: Desarrollo de Estrategias para su Estabilización. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España (2003).
4. Matheus, P., Abad, J. M y Fernández, V. M. Modificación de Superficies de Oro para la Inmovilización Orientada de *peroxidasa de rábano* recombinante. **Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia**, **30**, 225-235 (2007).
5. Abad, J.M.; Vélez, M.; Santamaría, C.; Guisán, J.M.; Matheus, P.R.; Vázquez, L.; Gazaryan, I.; Gorton, L.; Gibson, T. y Fernández, V.M. Immobilization of Peroxidase Glycoprotein on Gold Electrodes Modified with Mixed Epoxy-Boronic Acid Monolayers. **J. Am. Chem. Soc.**, **124**, 12845-12853 (2002).
6. Whitesides, G.M. y Gryzbowski, B. Self Assembled at all Scales. **Science**, **295**, 2418-2421 (2002).
7. Gilardi, G.; Fantuzzi, A. y Sadeghi, S.A. Engineering and Design in the Bioelectrochemistry of Metalloproteins. **Current Opinion in Structural Biology**, **11**, 491-499 (2001).
8. Lösche, M. Protein Monolayers at Interfaces. **Current Opinion in Solid State & Material Science**, **2**, 546-556 (1997).
9. Bergmeyer, H.U.; Gawehn, K. y Graßl, M. Enzyme als Biochemische Reagentien. In: Methoden der enzymatischen Analyse, (I) Verlag Chemie, Weinheim., 526-528 (1970).
10. Bradford, M. M. 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).

11. Grigorenko, V.; Chubar, T.; Kapeliuch, Y.; Borchers, T.; Spener, F. y Egorov, A. New Approaches for Functional Expression of Recombinant *Horseradish peroxidase C* in *ESCHERICHIA COLI*. **Biocatalysis and Biotransformation**, **17**, 359-379, (1999).
12. Egorov, A.M.; Gazaryan, I.G.; Kim, B.B.; Doseeva, V.V.; Kapeliuch, J.L.; Veryovkin, A.N. y Fechina, V.A. 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).
13. Lee, J.D. Concise Inorganic Chemistry. Blackwell Science ed., 5ª edición. Oxford, 792-795 (1996).
14. Hale, J. E. Irreversible, Oriented Immobilization of Antibodies to Cobalt-Iminodiacetate Resin for Use as Immunoaffinity Media. **Anal. Biochem.**, **231**, 46-49 (1995).
15. Cotton, F. A. y Wilkinson, G. Química Inorgánica Avanzada. Limusa-Noriega Editores. México, D. F., 774-782 (1999).
16. Cotton, F.A. y Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry. Wiley Ed. New York, 1284-1285 (1988).
17. Basolo, F. y Jonson, R., Química de los Compuestos de Coordinación. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, 38-51 (1978).
18. Moeller, T., Química Inorgánica. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, 497- 505 (1994).