



Trabajo Practico n°4

Electroquímica directa de proteínas y enzimas redox / Potenciometría.

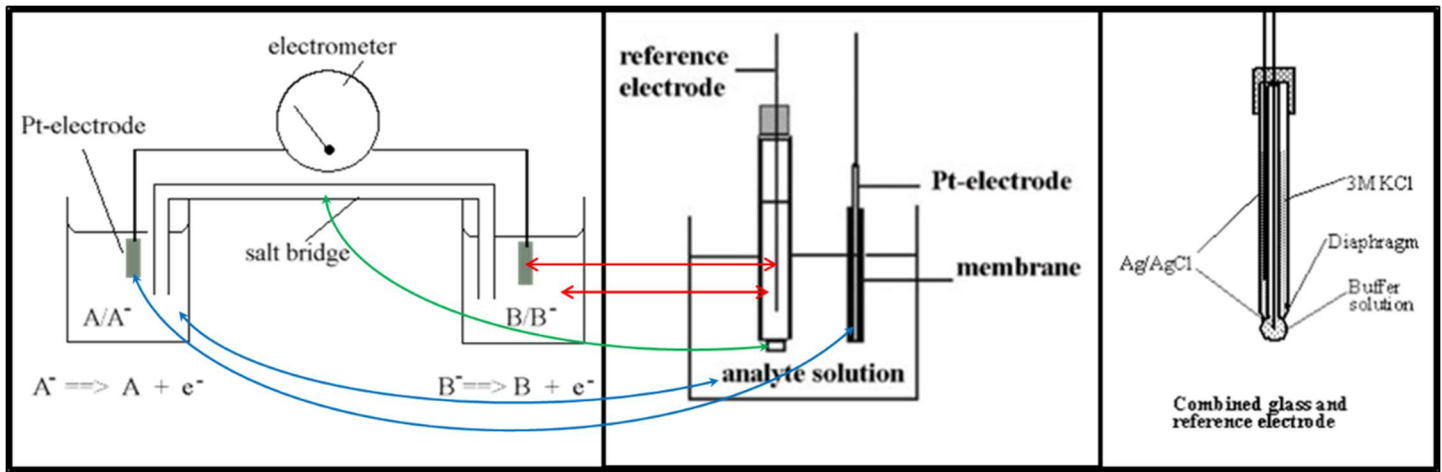
Introducción

Más del 30% de las metaloenzimas son oxidorreductasas, es decir, son enzimas que catalizan reacciones redox. Muchas de ellas llevan a cabo transferencia de electrones (ET, *electron transfer*) a través de distancias largas y además catalizan la transformación de un sustrato en su sitio activo. También realizan cambios conformacionales y/o bombeo de iones (H^+) a través de la membrana. Esto significa que el potencial electroquímico que controla los estados de oxidación y la velocidad de reacción debe ser un factor determinante y directo de la actividad de una oxidoreductasa. Por esto, los potenciales de reducción de los centros redox en metaloenzimas es una variable experimental clave a determinar, ya que ayuda a entender a nivel molecular procesos fisiológicos como la fotosíntesis, respiración aeróbica, procesos fermentativos, etc.

Para determinar potenciales de reducción y otras propiedades redox hay que recurrir a los **métodos electroanalíticos**, los cuales incluyen técnicas de Química Analítica. Estos métodos se usan para estudiar analitos redox midiendo sus propiedades en función de un voltaje (volts) aplicado, o midiendo la corriente (amperes) que se desarrolla cuando el analito reacciona en una celda electroquímica. En función de esto, estos métodos pueden sub-dividirse en:

- Potenciométricos: se mide la diferencia de potencial entre dos electrodos, cuando una reacción alcanzó el equilibrio \rightarrow corriente $I = 0$.
- Coulombimétricos: se mide cómo evoluciona la corriente en el tiempo manteniendo constante la diferencia de potencial aplicada, o viceversa, se aplica una corriente constante y se mide cómo evoluciona la diferencia de potencial.
- Voltamperométricos: se mide cómo cambia la corriente mientras se modifica el potencial de la celda.

En potenciometría, los dos electrodos usados para medir la DIFERENCIA DE POTENCIAL (o sea E_{Cell}) deben ser inertes para no interferir con la reacción que se está estudiando. Uno de los electrodos usados es un electrodo de referencia, el cual posee un POTENCIAL constante (e.g. SHE, NHE, Ag/AgCl, Hg/HgCl₂, etc.). El segundo electrodo es el indicador o de trabajo, y su POTENCIAL va a cambiar dependiendo de la concentración de un determinado analito, o presencia de especies redox. El electrodo potenciométrico más común es el electrodo de membrana de vidrio utilizado para medir pH.



En la figura de arriba (izquierda) se puede observar las dos semiceldas conectadas por un puente salino y ambos electrodos conectados a un potenciómetro de impedancia muy alta (para que no circule corriente). El electrodo indicador forma una semicelda electroquímica con el analito estudiado en solución, mientras que el electrodo de referencia forma la otra semicelda de potencial conocido. El potencial eléctrico total se calcula como:

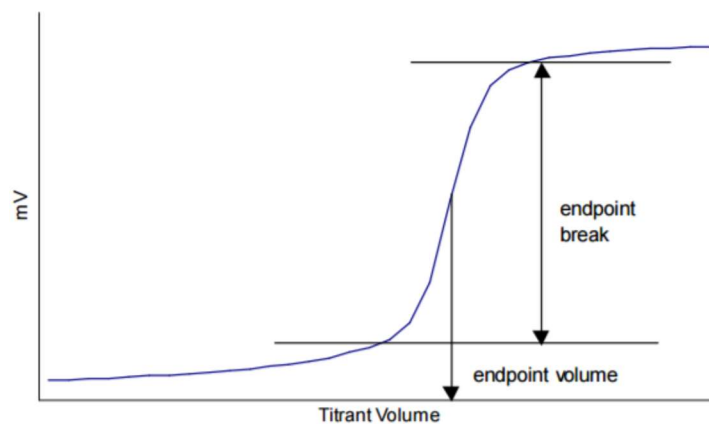
$$E_{\text{Cell}} = E_{\text{Indicador}} - E_{\text{Ref}} + E_{\text{Solución}} + E_{\text{Junction}}$$

E_{Cell} se mide con un potenciómetro, mientras que E_{Ref} es conocido. *e.g.* $E_{\text{Ag/AgCl}} = +205 \text{ mV vs. SHE}$, $T=298 \text{ K}$ y $[\text{Cl}^-]=3.5\text{M}$. Si $[\text{Cl}^-]=\text{saturado}$, entonces $E_{\text{Ag/AgCl}} = +195 \text{ vs. SHE}$. $E_{\text{Solución}}$ es la caída potencial en la solución de prueba entre los dos electrodos. Si la solución tiene alta conductividad (*e.g.* tiene sales disueltas) entonces no hay resistencia y $E_{\text{Solución}} \sim 0$. E_{Junction} es la diferencia de potencial que se puede generar entre ambos extremos del puente salino si este posee resistencia. Si este último conduce bien la corriente, entonces $E_{\text{Junction}} \sim 0$. De este modo:

$$E_{\text{Cell}} = E_{\text{Indicador}} - E_{\text{Ref}}$$

En la figura de arriba (centro), el puente salino es la punta del electrodo de referencia, y normalmente está compuesta por un vidrio especial (VycorTM glass) que conduce muy bien la corriente.

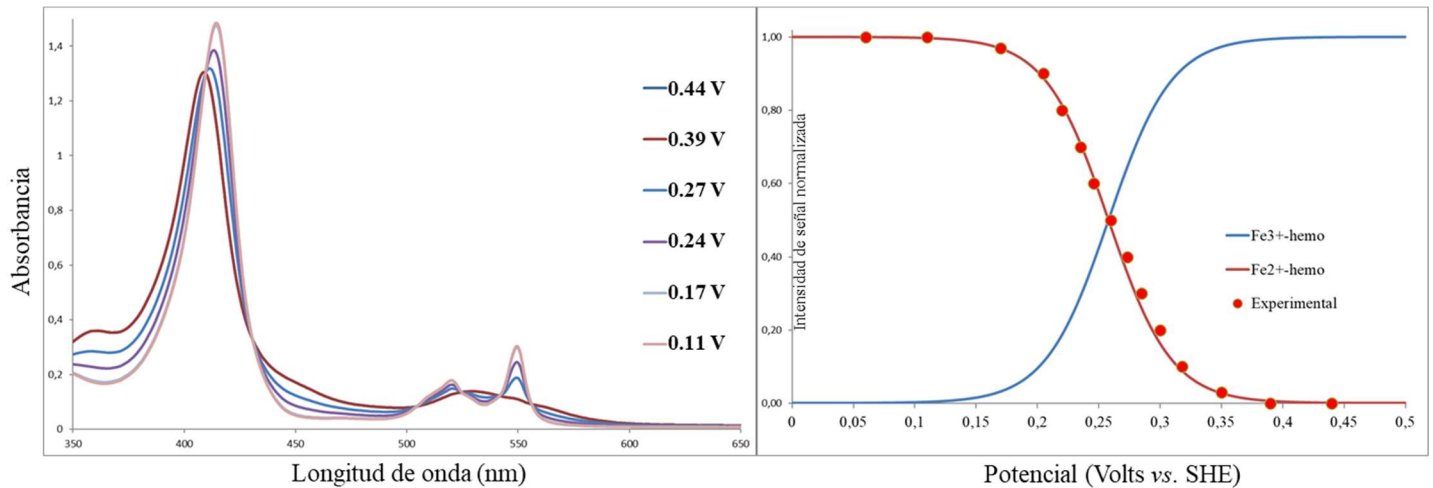
Durante una titulación potenciométrica, E_{Cell} se va registrando a intervalos a medida que se añade cantidades crecientes de un agente titulante (oxidante o reductor). Luego se puede graficar el E_{Cell} (o $E_{\text{Indicador}}$) vs. volumen (o moles) de agente titulante adicionado.



A partir del punto de inflexión de la curva de titulación, y conociendo la concentración del agente titulante y el potencial de reducción de ambas semireacciones, se puede determinar el número de equivalentes y la concentración del analito.

Las técnicas potenciométricas también pueden ser usadas para determinar el potencial de reducción de un compuesto o cofactor redox de una enzima, siempre que se pueda monitorear una señal (e.g. espectroscópica) específica de dicho cofactor. Esta técnica es ampliamente usada para estudiar oxidoreductasas en las cuáles se puede monitorear una propiedad espectroscópica.

En una **titulación espectro-potenciométrica** lo que se hace es sumergir ambos electrodos (Indicador y Referencia) en una solución de la proteína en estudio, y se va agregando un agente reductor u oxidante en cantidades controladas. Cada vez que se agrega el reactivo redox, se deja alcanzar el equilibrio ($I = 0$) y se determina el potencial de la solución y la señal espectroscópica (UV-Vis, EPR, NMR, IR, etc.) que posee la muestra. De esta forma se puede graficar una intensidad de una señal (que corresponde a un determinado estado de oxidación) en función del potencial de la solución. Por ejemplo para el citocromo c de corazón de caballo:



En la figura de arriba a la derecha se puede observar como a medida que el potencial de la solución es modificado desde +440 mV a +110 mV (vs. SHE) por el agregado de un agente reductor la banda Soret del estado oxidado disminuye a medida que la del estado reducido aumenta. También es visible como las bandas α y β aparecen a medida que el potencial disminuye. Si se hace una gráfica de la intensidad de la banda α vs. E_{Ind} , y se ajusta a una función obtenida de la ecuación de Nernst se puede obtener por simulación el potencial de reducción de un cofactor redox de una proteína, así como también el número de electrones involucrados en la reacción, a una temperatura determinada (ver *Diapositiva 21 de Teoría 8*).

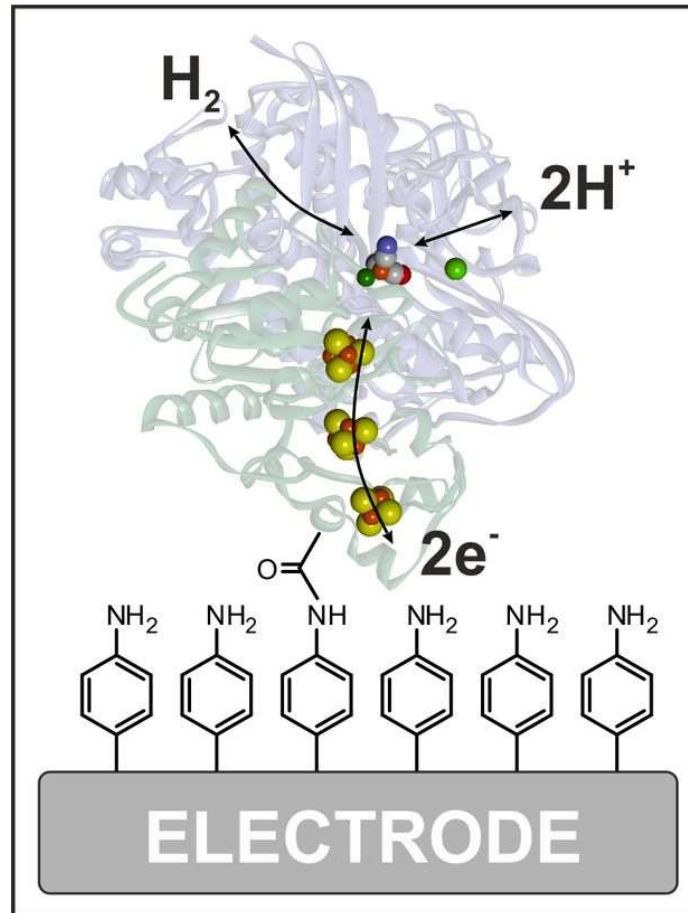
Electroquímica directa. Las técnicas de cinética enzimática de estado estacionario y/o de cinética rápida permiten determinar parámetros cinéticos (constantes de velocidad, afinidad, etc.). Sin embargo, en oxidoreductasas no se puede estudiar el efecto de cómo los potenciales de una solución afectan la cinética enzimática. No obstante, existen técnicas electroquímicas que sirven para estudiar oxidoreductasas y evaluar la actividad enzimática variando el voltaje o la corriente a la cual la oxidoreductasa cataliza una reacción. Al aplicar un potencial a un electrodo en donde hay una proteína redox adsorbida, lo que se produce es la transferencia de electrones entre esta proteína/enzima y el material conductor que funciona como electrodo. Entre las técnicas más usadas para estudiar proteínas redox se destacan la voltametría (CV, DPV, SWV) y la amperometría (crono-amperometría).

La transferencia electrónica desde un material conductor sólido directamente a una proteína redox fue descrita por primera vez en los '70. Esta técnica se conoce como electroquímica directa y sirve no sólo para determinar potenciales de reducción y la termodinámica de un sistema redox, sino también para entender la

cinética de las reacciones que ocurren antes y/o después de la transferencia electrónica (*e.g.* unión de sustrato, protonaciones).

Con electroquímica directa se pueden medir velocidades de reacción con elevada precisión temporal y con un preciso control del potencial aplicado (*i.e.* fuerza motora = *driving force*). Gracias a esto, el área de cinética enzimática de proteínas/enzimas redox puede ser estudiada a un nivel excepcional. De hecho usando electroquímica directa se puede estudiar todos los aspectos de la catálisis enzimática (de las oxidoreductasas!): transferencia electrónica interfacial e intramolecular, difusión de un sustrato a través de canales en la enzima, química redox del sitio activo de la enzima, efecto de inhibidores, procesos de activación/inactivación, entre otros.

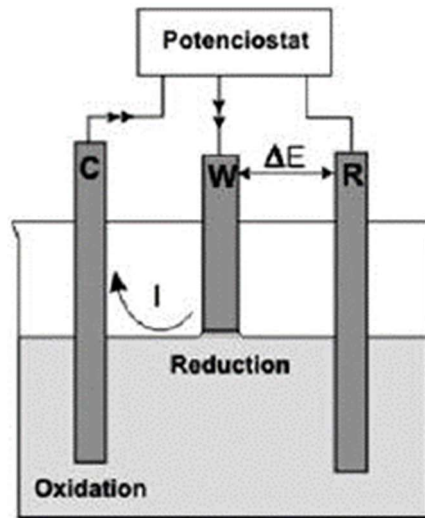
Sin embargo (siempre hay un pero...!), existe una condición para poder estudiar una enzima redox con electroquímica directa, y es que debe poseer un centro/cofactor redox cercano a la superficie de la proteína, y a su vez esta zona debe interactuar de forma estable con el material conductor usado como electrodo de trabajo. De este modo se puede establecer contacto con el material conductor usado como electrodo de trabajo y el primer centro redox, el cual a su vez está conectado naturalmente con los demás centros de la proteína. En otras palabras, esa “zona” de la proteína debe establecer interacciones con la superficie del electrodo de modo que pueda ocurrir transferencia electrónica entre la proteína y el material conductor.



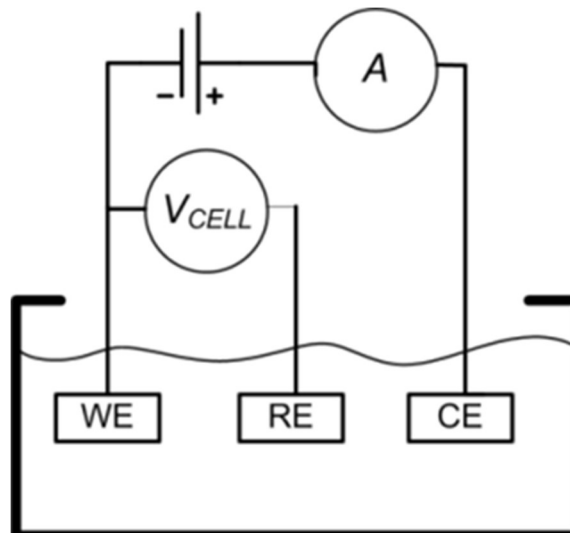
En la figura de arriba se puede ver un ejemplo donde la enzima Hidrogenasa ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_{2(\text{g})}$) está adsorbida a un electrodo de Pt previamente modificado con compuestos orgánicos para producir una unión estable. En este ejemplo, el electrodo de Pt dona electrones al primer centro Fe-S, el cual los transfiere al siguiente hasta que alcanza el sitio activo, donde 2H^+ son transformados en $\text{H}_{2(\text{g})}$. Cuando el electrodo de Pt quita electrones a la enzima, ocurre la reacción contraria ($\text{H}_{2(\text{g})} \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$).

El experimento de electroquímica directa se lleva a cabo en una celda que consta de 3 electrodos:

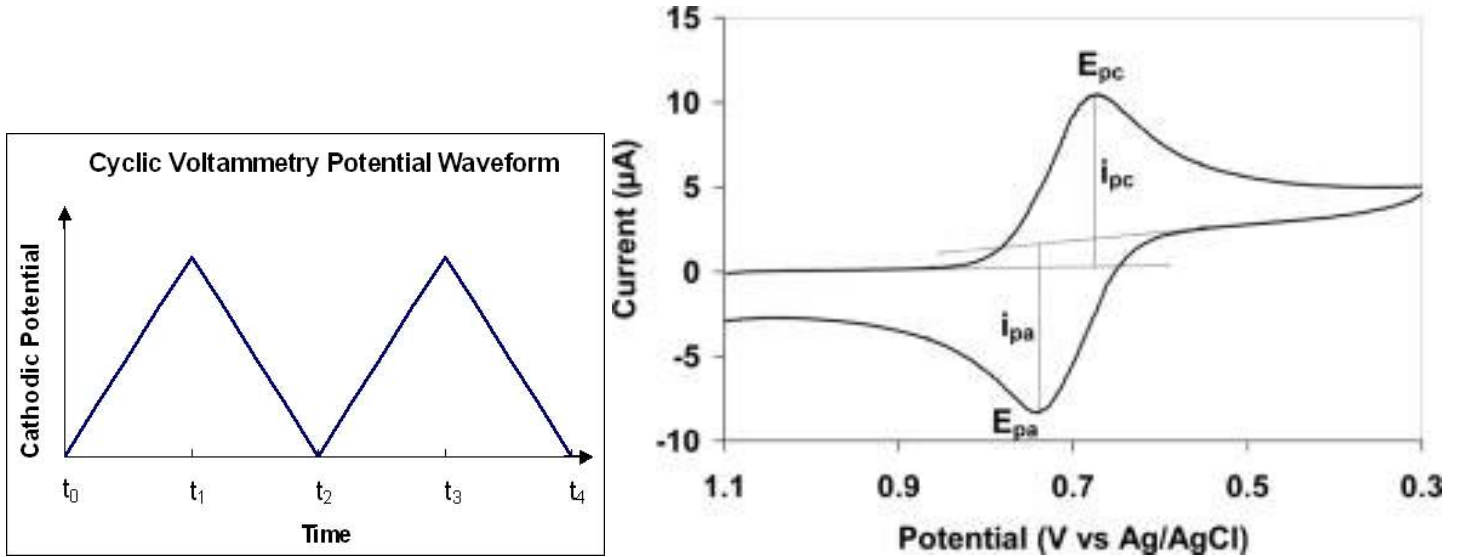
- Electrodo de Referencia: debe estar posicionado cerca de electrodo de trabajo. No debe circular corriente a través del mismo ya que afectaría el equilibrio Ag/AgCl , modificando potencial de la semicelda de referencia.
- Electrodo Auxiliar o Contra-electrodo: sirve para “cerrar el circuito”, para circular corriente en el electrodo de trabajo generada por el potencial aplicado durante el experimento.
- Electrodo de Trabajo: Está compuesto de un material conductor (grafito, oro, platino, plata, *composites*) que es capaz de ceder y quitar electrones a la proteína redox estudiada.



Los 3 electrodos mencionados están conectados a un aparato electrónico conocido como potenciostato. Este dispositivo es el que controla la diferencia de potencial aplicada (*así como otros parámetros*) y recopila la información (*corriente eléctrica*) de los eventos que ocurren en la superficie del electrodo de trabajo (oxidaciones o reducciones). La diferencia de potencial (ΔE) es controlada entre el electrodo de trabajo y el de referencia, mientras que la corriente (I) circula entre los electrodos de trabajo y el auxiliar, de modo que el funcionamiento de un potenciostato se puede esquematizar de la siguiente forma:

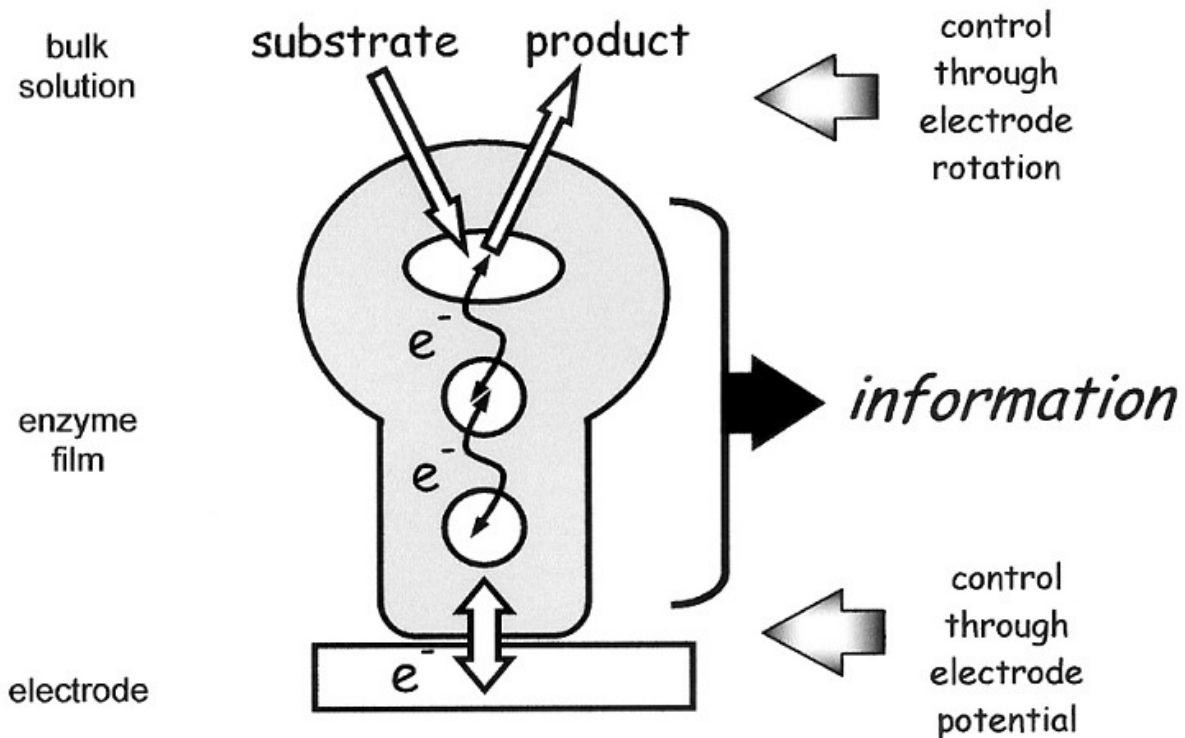


Una de las técnicas más usadas en electroquímica directa es la voltametría cíclica. En esta técnica, el potenciostato nos permite aplicar una diferencia de potencial que cambia linealmente en el tiempo desde un valor hasta otro, según la gráfica de la izquierda:



Cuando la proteína redox es capaz de recibir y dar electrones reversiblemente del electrodo de trabajo se obtiene un voltamograma como el de la figura de arriba a la derecha.

La utilidad de voltametría directa de proteínas es mayor aun cuando las moléculas que se investigan se pueden adsorber a electrodo de trabajo formando una monocapa de proteína. En este caso se realiza voltametría de película de proteína (protein film voltammetry - PFV).



En la figura de arriba se puede ver como el electrodo de trabajo actuaría como un donador/aceptor de electrones de una oxidoreductasa, reemplazando al par fisiológico de dicha enzima.

En el presente TP vamos a observar como un electrodo de trabajo compuesto de un disco de grafito pirolítico (PGE) es capaz de intercambiar electrones con diferentes proteínas redox (pseudoazurina, hhCytC, Cu-Nir). Además observaremos como se puede determinar las constantes catalíticas de una oxidoreductasa usando voltametría cíclica.

Objetivos:

- Obtener voltamogramas de la pseudoazurina y hhCytC.
- Extraer información del voltamograma (E_{m7} y n).
- Obtener las constantes catalíticas de la Cu-Nir para la reducción de nitrito en determinadas condiciones de fuerza iónica y pH.
- Comparar con la información que se obtiene por potenciometría. Realizar una simulación para determinar el potencial de reducción del par Fe(III)/Fe(II) del hhCytC y de la Pseudoazurina.

Metodología:

- 1- Obtención de voltamogramas y determinación de E_{m7} y n :
 - a. Colocar sobre un O-ring de goma una pieza de membrana de diálisis (*cutoff* 5kDa) y colocar 5 μ L de una solución de proteína provista por el docente sobre la membrana (en el centro).
 - b. Insertar el cuerpo del electrodo de trabajo para que entre en el O-ring, de forma que la solución de proteína quede atrapada entre la membrana y el material conductor.
 - c. Armar la celda con los 3 electrodos (RE, CE y WE) y encender el potencióstato.
 - d. Adquirir voltamogramas según indicaciones del docente.

- 2- Obtención de voltamogramas en condiciones catalíticas.
 - a. Preparar el electrodo de trabajo al igual que en el primer experimento, pero esta vez colocar una mezcla de proteínas (pseudozurina y Cu-Nir).
 - b. Adquirir voltamograma según indicación del docente.
 - c. Agregar concentraciones crecientes de sustrato (NaNO_2) y adquirir voltamogramas después de cada adición.
 - d. Graficar intensidad de corriente (a un determinado valor de potencial aplicado) vs. concentración de sustrato [nitrito].
 - e. Indicar que parámetros puede obtener a partir de esta gráfica.

- 3- Obtención de potenciales de reducción usando la ecuación de Nernst para ajustar datos experimentales de potenciometría.
 - a. Grafique los espectros enviados por el docente superponiéndolos.
 - b. Usando una planilla de cálculos tipo MS Excel u Origin, obtenga los espectros diferencia, restando a todos los espectros el espectro de la forma oxidada (+440 mV vs. SHE). Grafique estos de forma superpuesta.

- Identifique en esta gráfica resultante los máximos, mínimos y puntos isobstésicos.
- Usando las características del espectro diferencia, indique como varía la intensidad de la señal con respecto al potencial de la solución. Grafique Absorbancia (a una λ) vs. E.
- Ajuste a estos datos experimentales la ecuación de Nernst (ver diapositiva 21, teoría 8).
- Informe el E_{m7} que obtuvo para la titulación potenciométrica.

$$[Fe_{Hemo}^{3+}] = \frac{[Fe_{Hemo}^{Total}]}{1 + e^{\left(\frac{nF(E^o - E)}{RT}\right)}}$$

$$[Fe_{Hemo}^{2+}] = [Fe]_{Hemo}^{Total} - [Fe_{Hemo}^{3+}]$$

$$=1/(1+EXP(\$B\$22*\$B\$27*(\$B\$23-E4)))$$

$$=1-F4$$

