

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Química Física



**Acoplamiento de Procesos de Transferencia de Carga
en Sistemas Biomiméticos de Electrodo Proteico**

TESIS DOCTORAL

Inmaculada Márquez Escudero

Sevilla, 2019

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Química
por la Universidad de Sevilla

Fdo. Inmaculada Márquez Escudero

Directores

Fdo. Juan José Calvente Pacheco
Catedrático de Universidad
Departamento de Química Física
Universidad de Sevilla

Fdo. José Luis Olloqui Sariego
Profesor Contratado Doctor Interino
Departamento de Química Física
Universidad de Sevilla

JAIME OVIEDO LÓPEZ, Profesor Titular y Director del Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla:

INFORMA: Que el presente trabajo titulado *Acoplamiento de Procesos de Transferencia de Carga en Sistemas Biomiméticos de Electrodo Proteico*, presentado como Tesis para optar al grado de Doctor por D.^a Inmaculada Márquez Escudero, ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Y para que conste, firma el presente informe en Sevilla, a 21 de octubre de 2019.

Fdo. Jaime Oviedo López

JUAN JOSÉ CALVENTE PACHECO, Catedrático de Química Física de la Universidad de Sevilla,

JOSÉ LUIS OLLOQUI SARIEGO, Profesor Contratado Doctor Interino de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN: Que el presente trabajo titulado *Acoplamiento de Procesos de Transferencia de Carga en Sistemas Biomiméticos de Electrodo Proteico*, presentado como Tesis para optar al grado de Doctor por D.^a Inmaculada Márquez Escudero, ha sido realizado bajo su dirección y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Y para que conste, firman el presente informe en Sevilla, a 21 de octubre de 2019.

Fdo. Juan José Calvente Pacheco

Fdo. José Luis Olloqui Sariego

La investigación desarrollada en la presente memoria ha sido financiada por el Proyecto de Investigación CTQ2014-52641-P del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). El trabajo ha sido realizado en el Grupo de Investigación FQM-128 “Cinética Electrónica e Instrumentación” durante el disfrute de una ayuda para un contrato predoctoral F.P.I concedida por el MINECO (BES-2015-071247). Asimismo, el MINECO ha financiado la estancia breve de cuatro meses realizada en la Universidad de Malmö (Suecia), bajo la supervisión del Profesor Dr. Sergey Shleev.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de Tesis Juan José Calvente y José Luis Olloqui por todo el esfuerzo y dedicación que me han brindado y que han hecho posible mi formación durante el doctorado. A Juan José agradecerle la infinita paciencia que ha tenido conmigo y la continua disponibilidad, dejando de lado cualquier tarea para solucionar mis dudas. A José Luis agradecerle su implicación en mi trabajo desde el principio y toda la ayuda que me ha prestado. Ha sido una suerte formarme con personas con tanta pasión y dedicación por la ciencia.

Agradecer a todos los miembros del departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla, en especial al profesor Rafael Andreu por su ayuda y motivación durante la realización de la Tesis, al profesor Domingo González por su interés y ayuda durante mi primera toma de contacto con la docencia, y al profesor Emilio Roldán por animarme en su día a tomar este camino y proveernos de electrodos. También agradecer al profesor Francisco Sánchez Burgos sus clases ampliando nuestro conocimiento de la química física.

Por otro lado, dar las gracias al Prof. Sergey Sheev por acogerme en su grupo de investigación en la Universidad de Malmö, brindándome la oportunidad de conocer otra forma de hacer ciencia. Asimismo agradecer a mis compañeros de sala Mitra, Stefan, y Yuenchen, y en especial a mis compañeras de laboratorio Olga y Elena, sin las cuales mi estancia en Malmö no habría lo mismo. Tack så mycket!

A mis compañeros Lebrón, José María y Ostos agradecerle las charlas y todos los buenos ratos, preferiblemente los del “Sloopy” y no organizando un congreso (es broma, también tuvo su lado bueno). A los compañeros que nos reunimos en el seminario a la hora de comer: Javi, José, María Jesús, Elena, Eva, Carlos y Aila. También a los alumnos que por algún motivo han pasado por nuestro laboratorio, siempre se agradecen caras nuevas, y en especial a Begoña, por todos los ratitos de charla, el ánimo y algún que otro bocadillo cubano. Tampoco olvidarme de mis compañeros del periodo conjunto en Alicante del Máster de “Electroquímica. Ciencia y Tecnología”, donde comenzó este camino.

Agradecer a los miembros del grupo de la “Internacional”: Julia, Antonio, Lidia y Óscar, por todos los buenos ratos, y platos, compartidos. ¡Qué nunca se pierda esta costumbre! Dar las gracias también a todos mis amigos: Susana, Guille, Damián, Laura, Ismael, Bea, Manu, Lidia, Alejandro, Isa, Anna, Antonio, Alberto y Laura. Gracias por permanecer a mi lado a pesar de todo. También agradecer a los que dejé ir, me habéis hecho apreciar las cosas que realmente merecen la pena.

Gracias a mi familia, tíos y primos, por el apoyo y el interés constante. En especial, agradecer a mi abuela Encarna, la cual habría llegado más lejos que yo si hubiese tenido la posibilidad de aprender a leer, y, a mi abuela María del Carmen, que se fue hace dos años y quién, sin importar la hora a la que llegara del laboratorio, siempre se alegraba cuando entraba por la puerta de casa. Sé que te sigues alegrando por mí allí donde estés. Gracias también a mi prima Bea por su apoyo incondicional, eres la hermana que siempre quise tener. No puedo olvidarme de agradecer a mi familia política Mari Ángeles y Emilio la comprensión y el apoyo que me han brindado durante estos años.

Agradecimiento sería quedarme corta definiendo lo que siento hacia mis padres, siempre apoyándome en las decisiones que he tomado y animándome en los momentos difíciles. Es una suerte haberos tenido siempre a mi lado y que me hayáis inculcado la curiosidad por el mundo que me rodea. Sin vosotros, no habría recorrido este camino.

Por último, dar las gracias a Pedro, la constante en mi ecuación. Gracias por apoyarme a pesar de mis ausencias y respetar mis decisiones. Gracias por animarme en los momentos malos y celebrar conmigo los buenos. Gracias por hacerme ver las cosas importantes en la vida y enseñarme a gestionar mis agobios. Como diría Seguridad Social, *“las palabras se quedan cortas para decir todo lo que siento”*. Suerte que te tengo a mi lado.

“La paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos muy dulces”

Proverbio persa

ÍNDICE

Resumen	1
----------------------	---

Abstract	3
-----------------------	---

Capítulo 1: Introducción

1.1. Objetivos y organización de la Tesis.....	7
1.2. Metaloporfirinas.....	9
1.3. Hemina en disolución.....	11
1.4. Electroquímica de la hemina inmovilizada sobre electrodos.....	16
a) Electroquímica en medio acuoso.....	17
b) Electroquímica en dimetilsulfóxido.....	22
1.5. Acoplamiento de las transferencias electro-protónica en la hemina.....	23
1.6. Potencial redox de las hemoproteínas.....	30
1.7 Bibliografía.....	33

Capítulo 2: Procedimiento Experimental

2.1. Caracterización electroquímica	
2.1.1. Reactivos y preparación de disoluciones.....	43
2.1.2. Construcción y preparación del electrodo de trabajo.....	44
2.1.3. Medidas electroquímicas.....	45
2.2. Técnicas electroquímicas	
2.2.1. Voltametría cíclica (CV).....	46
2.2.2. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).....	49
2.3. Bibliografía.....	57

Capítulo 3: Acoplamiento de Procesos de Transferencia de Carga Interfacial de Metaloporfirinas de Hierro.

3.1. Antecedentes.....	61
3.2. Comportamiento voltamétrico general de la hemina adsorbida.....	65
3.3. Influencia del pH del medio en la respuesta voltamétrica de la hemina adsorbida.....	69
3.4. Cuantificación de la asociación de los aniones del medio con la hemina.....	81
3.5. Efecto de la hidrofobicidad del anillo en la asociación hierro-anión.....	93
3.6. Conclusiones.....	99
3.7 Bibliografía.....	101

Capítulo 4: Interacción de Metaloporfirinas de Hierro con Ácidos Orgánicos: Implicaciones en la Formación de la β -hematina.

4.1. Antecedentes.....	107
4.2. Interacción de hemoporfirinas con ácidos carboxílicos orgánicos.....	110
4.3. Implicaciones para la formación de la hemozoina (β -hematina).....	127
4.4. Conclusiones.....	136
4.5 Bibliografía.....	137

Capítulo 5: Efecto de la Hidrofobicidad en las Propiedades Redox de Metaloporfirinas de Hierro.

5.1. Antecedentes.....	143
5.2. Respuesta voltamétrica de la hemina en presencia de <i>n</i> -hexanol.....	145
5.3. Cuantificación de la adsorción del <i>n</i> -hexanol sobre grafito.....	148
5.4. Efecto de la longitud de cadena del alcohol.....	153
5.5. Efecto de la hidrofobicidad del anillo porfirínico.....	156

5.6. Conclusiones.....	160
5.7 Bibliografía.....	161

Conclusiones Generales.....	165
------------------------------------	------------

Conclusions.....	167
-------------------------	------------

Anexos

A.1. Voltametría para una transferencia electro-protónica acoplada.....	171
A.2. Voltametría para una transferencia electrónica acoplada a la unión con un ligando.....	175
A.3. Unión entre una especie inmovilizada y un ligando ionizable soluble.....	177
A.4. Voltametría de una transferencia electrónica acoplada a una transferencia electrónica y a la unión con un ligando.....	181

RESUMEN

Las enzimas redox han sido objeto de estudio durante las últimas décadas debido a su capacidad para catalizar numerosas reacciones químicas aplicables al campo de la transformación de energía y del medio ambiente. Para caracterizar la transferencia electrónica de sus sitios activos e identificar los factores moleculares que modulan sus propiedades redox, se han utilizado fundamentalmente técnicas electroquímicas, siendo la voltametría cíclica la más empleada. No obstante, la respuesta voltamétrica descrita en la bibliografía para las proteínas inmovilizadas sobre electrodos presenta un comportamiento no ideal, cuyo origen y naturaleza ha sido escasamente abordado desde un punto de vista fundamental. Para evaluar el posible papel que ejerce el grupo prostético en la no idealidad de la respuesta voltamétrica de las proteínas, una estrategia interesante es estudiar su respuesta electroquímica en ausencia de la envoltura peptídica.

En este contexto, se ha llevado a cabo un estudio de la respuesta voltamétrica de dos porfirinas de hierro (hemina y octaetilporfirina de hierro) adsorbidas sobre un electrodo de grafito en presencia de diferentes entornos químicos que mimetizan la envoltura peptídica de las proteínas, utilizando para ello ligandos de diferente acidez, hidrofobicidad y adsorptividad.

El estudio voltamétrico de las dos porfirinas de hierro en las disoluciones tampón más frecuentemente utilizadas (acetato y fosfato) ha puesto de manifiesto que su transferencia electro-protónica está acoplada con equilibrios de asociación entre el centro redox y las formas ionizadas del tampón. Dicha asociación está restringida a la forma acuohierro(III) de la metaloporfirina, por lo que su impacto en la respuesta electroquímica varía con el pH y la concentración de la disolución tampón, dando lugar a una amplia variedad de curvas de valoración voltamétricas. Se ha desarrollado una estrategia de dos etapas para cuantificar la constante de equilibrio intrínseca de asociación de dichas porfirinas con las formas aniónicas de ligandos ionizables, poniendo de manifiesto que *i*) el Fe(III) porfirínico presenta una mayor afinidad por el acetato que por el dihidrógenofosfato, y *ii*) la sustitución de los residuos β de la hemina (propiónicos,

vinilos y metilos) por grupos etilos posibilita la asociación del Fe(III) con el dianión monohidrógenofosfato.

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que la asociación entre la especie acuohierro(III) de las porfirinas de hierro y los aniones carboxilatos procedentes de ácidos orgánicos lineales aumenta con la longitud de la cadena alquílica, como consecuencia de la interacción entre la cadena hidrocarbonada del ácido y el anillo de porfirina. A partir de la dependencia lineal de la energía libre de asociación con la longitud de la cadena alquílica, se han cuantificado las contribuciones individuales los grupos carboxilato, metilo y metileno, aumentando dichas contribuciones en la secuencia metileno < metilo << carboxilato. Basados en estos resultados, se ha desarrollado un modelo teórico para cuantificar la dependencia de la formación de la β -hematina con el pH descrita en la bibliografía. Dicho modelo ha permitido determinar la constante de equilibrio para la formación del dímero cíclico de la hemina μ -propionato. La comparación de esta constante de equilibrio con la correspondiente a la asociación Fe(III)-propionato ha puesto de manifiesto que el bajo contenido de agua de las interfases acuo-orgánicas impulsa la formación de la hemozoina (pigmento de la malaria) en los medios fisiológicos.

Por último, el estudio electroquímico de las dos porfirinas de hierro en presencia de cantidades crecientes de *n*-hexanol ha puesto de manifiesto la existencia de dos poblaciones adsorbidas de dicho alcohol sobre el electrodo de grafito modificado con las porfirinas de hierro, que difieren en su energía de adsorción e interacción con la metaloporfirina. Una de las poblaciones está fuertemente adsorbida sobre la superficie de grafito y no modifica las propiedades redox de la porfirina de hierro, mientras que la otra se encuentra adsorbida menos fuertemente sobre la porfirina de hierro y estabiliza su forma reducida. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que la energía libre de adsorción de la segunda población varía linealmente con la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol, lo que ha permitido cuantificar la contribución del grupo metileno a dicha energía de adsorción, obteniéndose un valor similar a los descritos para la transferencia de dicho grupo desde un medio acuoso a uno hidrofóbico.

ABSTRACT

During the last decades, redox enzymes have been extensively studied for energy transformation and environmental applications due to their ability to catalyze a large number of chemical reactions. The use of electrochemical techniques, and particularly cyclic voltammetry, is a powerful tool to characterize the electron transfer of the active site of immobilized redox proteins and to identify the molecular factors that modulate their redox properties. However, the voltammetric response of immobilized redox proteins reported in literature commonly displays a non-ideal behavior, which has been scarcely investigated from a fundamental point of view. The study of the electron transfer of isolated prosthetic groups of redox proteins appears as a promising strategy to unravel its role on the non-idealities found on protein electrochemistry.

Herein, the electrochemistry of two iron porphyrin (hemin and iron octaethylporphyrin) immobilized onto a pyrolytic graphite electrode has been investigated in different chemical environments that mimic the protein scaffold by using ligands with distinct acidity, hydrophobicity and adsorptivity.

In the most commonly used buffer solutions (acetate and phosphate), the proton-coupled electron transfer of the two iron porphyrins has been found to be accompanied by the binding of the iron(III)-center with the ionized forms of the buffer. This binding is shown to be restricted to the aquo-Fe(III) form of the iron porphyrin, so that its extent varies with both the solution pH and the buffer concentration, giving rise to intricate titration curves. A two-step strategy has been developed to quantify the intrinsic binding equilibrium constant, which shows that heme-Fe(III) has a greater affinity for acetate than for dihydrogen phosphate. Replacement of the two propionic acid residues of the hemin by ethyl groups facilitates the binding of Fe(III) with the monohydrogen phosphate anion.

It has been found that the binding of heme aquo-Fe(III) with linear organic carboxylates increases with the alkyl chain length, due to the interaction of the hydrocarbon chain of the acid with the porphyrin ring. Individual contributions of the

carboxylate, methyl and methylene groups to the heme-carboxylate binding has been determined from the linear dependence of the binding free energy with the alkyl chain length, increasing in the sequence methylene < methyl << carboxylate. On the basis of these results, a theoretical model has been developed to account for the pH dependence of β -hematin formation reported in literature, which has allowed us to determine the dimerization equilibrium constant for the formation of the cyclic μ -propionate hemin dimer. Comparison of the estimated dimerization equilibrium constant value with that of the Fe(III)-propionate binding reveals the pivotal role of a low water content to drive the formation of hemozoin (the malaria pigment) in physiological media.

Finally, the electrochemical study of the two iron porphyrins in the presence of increasing amounts of *n*-hexanol has shown the existence of two adsorbed populations of *n*-hexanol at the metalloporphyrin-modified graphite electrode, differing in their adsorption energy and interaction with the metalloporphyrin. The more strongly adsorbed population does not affect the redox potential of the iron porphyrins, and is ascribed to *n*-hexanol molecules adsorbed directly onto the graphite surface; whereas the less strongly adsorbed population stabilizes the reduced form of the iron porphyrins, and is ascribed to *n*-hexanol molecules adsorbed onto the metalloporphyrin molecule. The contribution of the methylene group to this stabilization has been quantified from the linear dependence of the adsorption free energy with the hydrocarbon chain length, and is consistent with the values reported for the transfer to the methylene group from aqueous to hydrophobic media.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Objetivos y organización de la Tesis

Las proteínas y enzimas redox han sido objeto de estudio durante las últimas décadas debido a su funcionalidad específica y capacidad para catalizar numerosas reacciones químicas que pueden ser aplicadas en el campo de la energía y de la medicina.¹⁻³ Estas proteínas son excelentes catalizadores debido a su optimización durante millones de años por la evolución, por lo que existe un gran interés en el funcionamiento de estos sistemas biológicos de alta eficiencia.⁴ El uso de técnicas electroquímicas posibilita el estudio de las propiedades redox de las proteínas y enzimas. Particularmente útil es la técnica de voltametría cíclica ya que permite cuantificar los parámetros termodinámicos y cinéticos de las transferencias electrónicas interfaciales mediante una variación de la escala de tiempo experimental a través de la velocidad de barrido. Cuando la proteína se encuentra inmovilizada sobre la superficie de un electrodo, la cuantificación de su respuesta voltamétrica se simplifica debido a la eliminación de la contribución del transporte de materia. Su empleo está tan extendido en el campo de las proteínas redox que ha dado lugar al término *protein film voltammetry*.⁵

A pesar de su aparente sencillez, la respuesta voltamétrica de un gran número de proteínas se desvía del comportamiento esperado para una población homogénea de centros redox aislados. Estas no idealidades se reflejan en *i*) una disminución de la carga redox faradaica con el aumento de la velocidad de barrido del potencial (electrorreactividad parcial);⁶ *ii*) un ensanchamiento de la onda voltamétrica en condiciones de equilibrio;⁷ *iii*) una separación finita y constante entre los potenciales de pico anódico y catódico a baja velocidad de barrido (quasi-reversibilidad inusual);⁸ y *iv*) un desplazamiento asimétrico de los potenciales de pico anódico y catódico con la velocidad de barrido (asimetría cinética).⁹ Esta respuesta voltamétrica no ideal, pero habitual ha sido escasamente investigada desde un punto de vista fundamental, existiendo todavía diversos aspectos sobre su origen y naturaleza no resueltos. Una estrategia interesante para abordar estas cuestiones a nivel fundamental consiste en estudiar la transferencia electrónica entre el grupo prostético, desprovisto de su envoltura peptídica, y el electrodo, con el fin de dilucidar su papel en la no-idealidad de la respuesta electroquímica de las correspondientes proteínas.¹⁰⁻¹⁸

En este contexto, el objetivo general de la presente tesis doctoral es dilucidar si las no idealidades de la respuesta electroquímica de las hemoproteínas se deben al comportamiento intrínseco de su grupo prostético (hemina) o a procesos adicionales asociados con su envoltura peptídica. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de la respuesta electroquímica de dos porfirinas de hierro adsorbidas sobre un electrodo de grafito, en presencia de diferentes entornos químicos, que mimetizan específicamente diferentes aspectos de la envoltura peptídica. Para la consecución del objetivo general, se replantearon los siguientes objetivos específicos que han estructurado el contenido de la tesis:

- Identificación y cuantificación de posibles procesos adicionales que acompañan a la transferencia electro-protónica de la hemina en las disoluciones tampón frecuentemente empleadas, con el fin de identificar los factores que conducen a la diversidad de curvas de valoración descritas en la bibliografía (Capítulo 3).
- Evaluación de la posible interacción de la hemina con ácidos orgánicos de diferente hidrofobicidad, que mimetizan el entorno ionizable de la envoltura peptídica, con el fin de *i)* cuantificar su contribución al potencial redox del grupo hemo, y *ii)* aprovechar esta información para interpretar la dependencia con el pH de la formación de la β -hematina, que es el análogo sintético del pigmento de la malaria (Capítulo 4).
- Evaluación de la posible interacción de la hemina con alcoholes alifáticos adsorbidos, que mimetizan el entorno hidrofóbico de la envoltura peptídica, con el fin de cuantificar la contribución de la hidrofobicidad al potencial redox del grupo hemo (Capítulo 5).
- Evaluación del papel que ejercen los residuos propiónicos del anillo porfirínico de la hemina en sus propiedades redox, ácido/base y coordinativas, con el fin de valorar su posible impacto en la funcionalidad de las hemoproteínas. Para la consecución de este objetivo, en los capítulos mencionados anteriormente (3-5) se han realizado los correspondientes estudios con la octaetilporfirina de hierro, cuyos residuos β son grupos etilo.

1.2. Metaloporfirinas

Las proteínas redox presentan uno o varios centros activos donde se llevan a cabo las reacciones de transferencia electrónica relacionadas con multitud de procesos celulares como la fotosíntesis o la respiración.¹⁹ Uno de los centros redox más abundantes en la naturaleza es la hemina, que constituye el grupo prostético de un gran número de hemoproteínas. La hemina es un complejo formado por un átomo de hierro central coordinado a un anillo de protoporfirina IX, que contiene dos grupos propiónicos, dos vinilos y cuatro metilos como sustituyentes β .

La hemina pertenece al grupo de las metaloporfirinas, que son macrociclos formados por cuatro anillos pirrólicos unidos entre sí por grupos metinos y un átomo metálico central, coordinado a los nitrógenos pirrólicos. Una característica diferencial de las metaloporfirinas es la naturaleza de los grupos sustituyentes localizados en las posiciones β y meso del anillo porfirínico (Figura 1.1). El centro metálico de las metaloporfirinas juega un papel fundamental en procesos de transferencia electrónica, catalíticos y de recolección de luz, cuya regulación está controlada por la coordinación axial del cofactor metálico con determinados aductos. Además, las metaloporfirinas presentan una gran flexibilidad, de forma que son capaces de reorganizar sus sustituyentes y/o deformar su estructura para adaptar su conformación al medio en el que se encuentran.²⁰ Este comportamiento ha posibilitado la modulación de sus propiedades químicas, mecánicas y optoelectrónicas mediante un cambio del átomo metálico central o la sustitución de los residuos β y meso del anillo porfirínico, dando lugar a un amplio abanico de metaloporfirinas.²¹

En general, las metaloporfirinas se adsorben sobre las superficies adoptando una orientación paralela al sustrato, actuando éste como un ligando extendido que puede modificar la coordinación axial del centro metálico (*efecto trans*)²² o viceversa (*efecto trans superficial*).²³ Asimismo, la inclusión de un ligando *cis* en una metaloporfirina adsorbida da lugar a una redistribución de cargas entre el macrociclo y la superficie permitiendo la formación de estructuras supramoleculares (*efecto cis*).²⁴

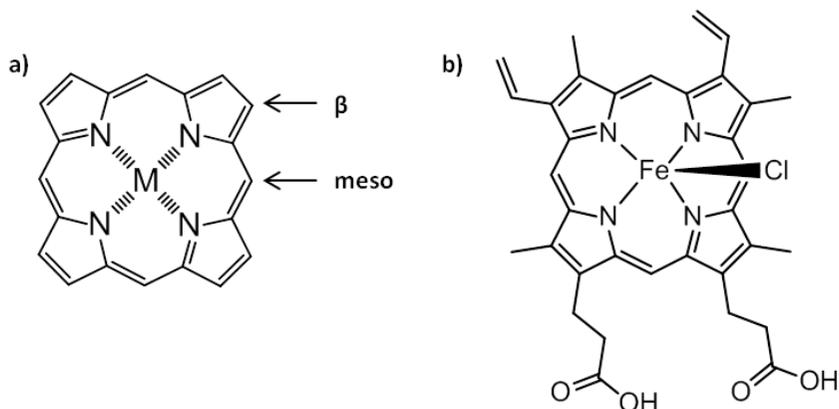


Figura 1.1. Estructura de a) una metaloporfirina y b) la hemina.

La formación de monocapas de metaloporfirinas sobre una superficie depende de la naturaleza de la interfase.²¹ Así, en condiciones de vacío, el resultado del balance entre las interacciones adsorbato-adsorbato y adsorbato-superficie deriva en una estructura altamente ordenada, mientras que en las interfases sólido-disolución (Figura 1.2), la estructura está condicionada por:

- i) Interacciones intermoleculares entre las moléculas de metaloporfirinas adsorbidas, que determinan el tipo de crecimiento superficial de la capa adsorbida (cristal bidimensional, islas de multicapas, fases segregadas en sistemas multicomponentes).
- ii) Interacciones adsorbato-superficie, que favorecen estructuras definidas por los sitios reactivos de la superficie.
- iii) Interacciones adsorbato-disolvente, que son las responsables de la presencia de moléculas de disolvente intercaladas en la estructura adsorbida.
- iv) Interacciones disolvente-superficie, que impiden la formación de una monocapa del adsorbato cuando son del mismo orden de magnitud que las interacciones adsorbato-superficie.

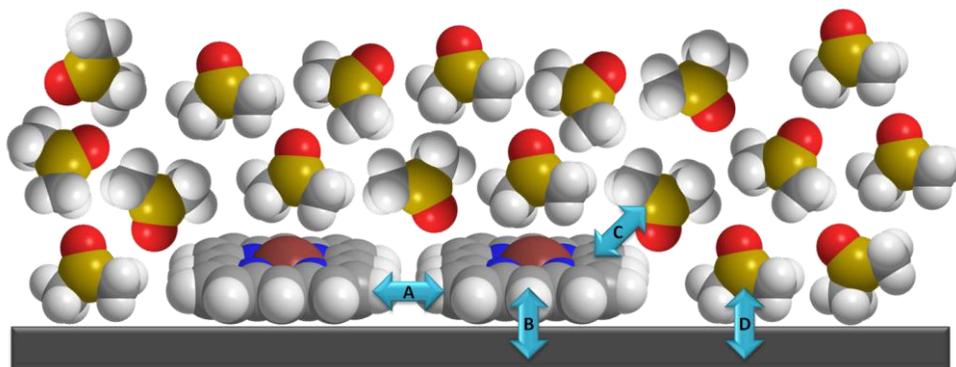


Figura 1.2. Interfase superficie-disolución para un sistema formado por monocapas de metaloporfirinas donde A representa interacción intermolecular; B, interacción adsorbato-superficie; C, interacción adsorbato-disolvente; y D, interacción disolvente-superficie.

La contribución relativa de las distintas interacciones condiciona la estructura superficial de la capa adsorbida, existiendo la posibilidad de polimorfismo sobre algunas superficies. En estos casos, la estructura superficial se puede modular mediante la variación de la concentración, la temperatura o el tipo de disolvente, estando dicha estructura condicionada por la especiación de las metaloporfirinas en disolución.²⁵

1.3. Hemina en disolución

El comportamiento de la hemina (estructura A en Figura 1.3) en disolución se viene estudiando desde hace varias décadas,²⁶⁻²⁹ ya que su especiación depende del disolvente y del pH del medio, observándose el comportamiento más sencillo en medios orgánicos.³⁰ Así por ejemplo, en dimetilsulfóxido (DMSO) la hemina se encuentra como especie monomérica en la que el ión cloruro se ha intercambiado por una molécula de disolvente (estructura B en Figura 1.3),³¹ mientras que en dimetilformamida (DMF) el hierro (III) permanece coordinado al ión cloruro. La hemina también se encuentra como monómero en otros disolventes como dietilenglicol, etanol, acetonitrilo, 2-propanol o tert-butanol,²⁹ pero con una solubilidad tan baja que sus disoluciones en estos disolvente se preparan habitualmente a partir de la correspondiente disolución en DMSO.³²

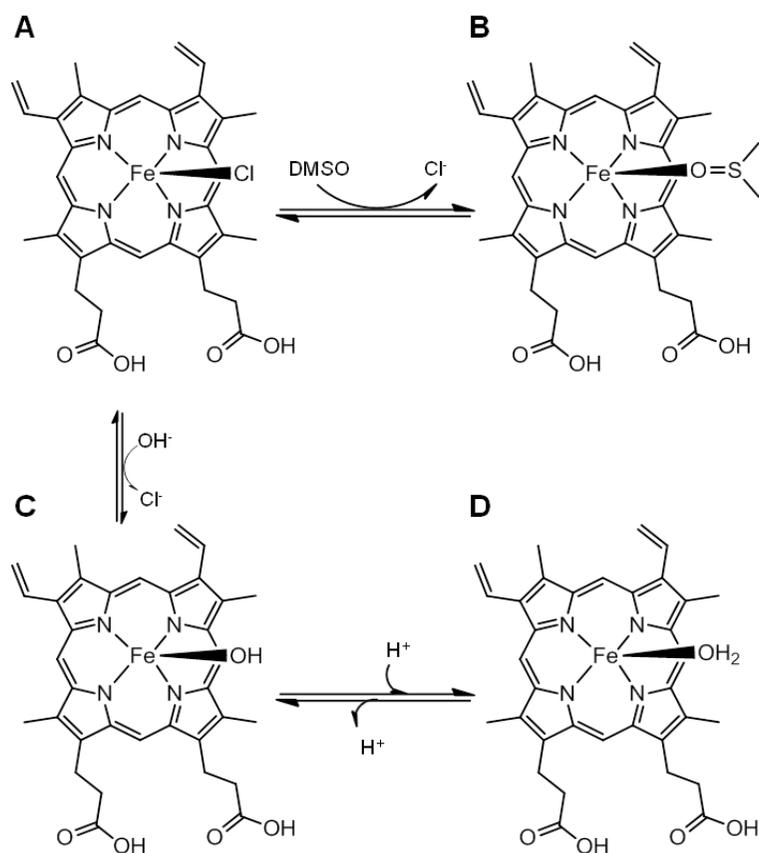


Figura 1.3. Equilibrio de intercambio del ión cloruro coordinado al hierro (III) en la hemina (Estructura A) por una molécula de DMSO (Estructura B) o por un ión hidroxilo para formar la hematina en forma de hidroxocomplejo (Fe(III)PPIX·OH, Estructura C), el cual a su vez puede tomar un protón formando el aquocomplejo (Fe(III)PPIX·H₂O, Estructura D).

Igual que ocurre con algunos disolventes orgánicos, las disoluciones acuosas de hemina preparadas a partir de la correspondiente disolución en DMSO preservan su estado monomérico si el porcentaje de DMSO es mayor del 40%. En estas condiciones, el ión cloruro coordinado al hierro de la hemina (estructura A en Figura 1.3) se intercambia con una molécula de agua o un ión hidroxilo (según el pH de la disolución), dando lugar a la acuo/hidroxihematina (estructuras C y D, Figura 1.3),³³ donde la molécula de agua coordinada al hierro (III) tiene un $pK_a = 6.5$.³⁴

En el estado monomérico de la hemina, el centro metálico Fe(III) presenta alto spin con cinco electrones desapareados y un radio de 0.064 nm que le impide al Fe(III) ubicarse en la cavidad de la porfirina, de forma que este sobresale del plano entre 0.05 y 0.06 nm. Como resultado de este efecto, el Fe(III) presenta un número de coordinación 5 dando lugar a una geometría tetragonal-piramidal³⁵ (estructura I, Figura 1.4).

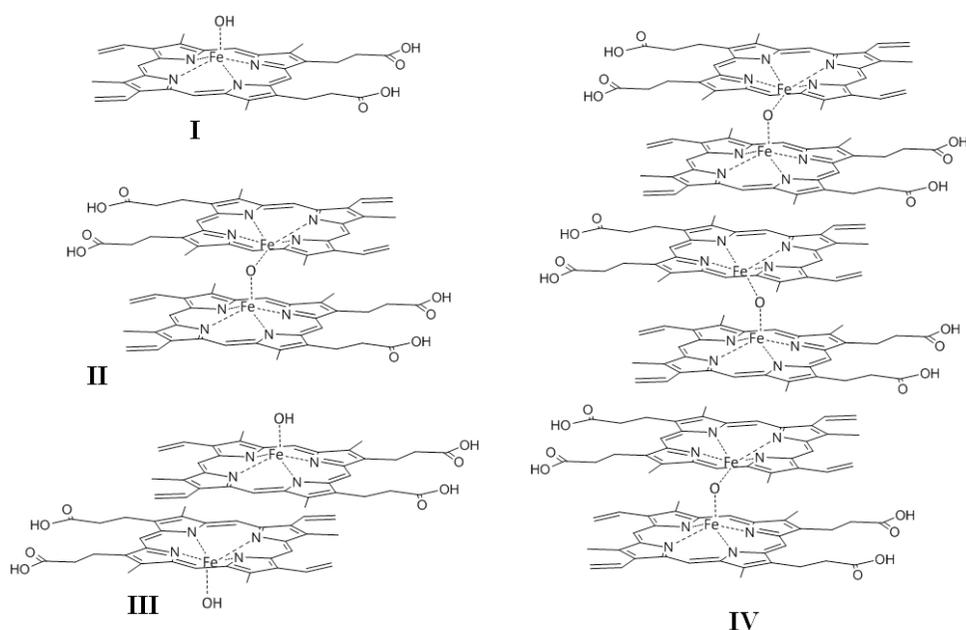


Figura 1.4. Estructuras de las diferentes especies de hemina presentes en disolución acuosa o mezclas acuosa-orgánica.³⁰

En las disoluciones acuosas de pH básico, la hemina tiende a formar agregados mientras que por debajo de pH 5.9 precipita dando lugar a una estructura dimérica de tipo μ -oxo.²⁷ Dicha estructura está formada por dos anillos hemo, cuyos átomos de hierro se encuentran enlazados a través de un átomo de oxígeno puente (estructura II, Figura 1.4). Durante varias décadas, se consideró que la estructura de los agregados en disolución coincidía con la estructura del precipitado a pH ácido.³⁶⁻³⁸ Sin embargo, los estudios realizados por *De Villiers et al.*,²⁹ con las técnicas de espectroscopia de absorción UV-visible y resonancia magnética nuclear, aportaron evidencias de la formación de un dímero π - π en disolución, donde los grupos vinílicos de una molécula de hemina

interaccionan con el anillo porfirínico de la otra molécula presente en el dímero (estructura III, Figura 1.4).

En un trabajo posterior, *Egan et al.*³⁰ propusieron un esquema más completo de la especiación de la hemina en disolución, distinguiendo distintas estructuras en función del tipo de disolvente, el pH y las concentraciones de hemina y de electrolito (Figura 1.4). Cuando la concentración de hemina en la disolución es baja o el porcentaje de disolvente orgánico es alto, predomina la forma monomérica (Estructura I, Figura 1.4). A medida que el medio se hace más acuoso y existe suficiente cantidad de hemina, el dímero π - π (Estructura III) comienza a predominar independientemente del pH. Sin embargo, en mezclas de un medio acuoso con disolventes apróticos como dimetilsulfóxido, piridina o acetona, se favorece la formación del dímero μ -oxo (Estructura II). Concentraciones altas de electrolito favorecen la agregación de estos dímeros mediante interacciones π - π (Estructura IV, Figura 1.4). En la Figura 1.5 se muestra un esquema que relaciona los diferentes equilibrios estructurales que presenta la hemina en disolución dependiendo de las condiciones del medio.

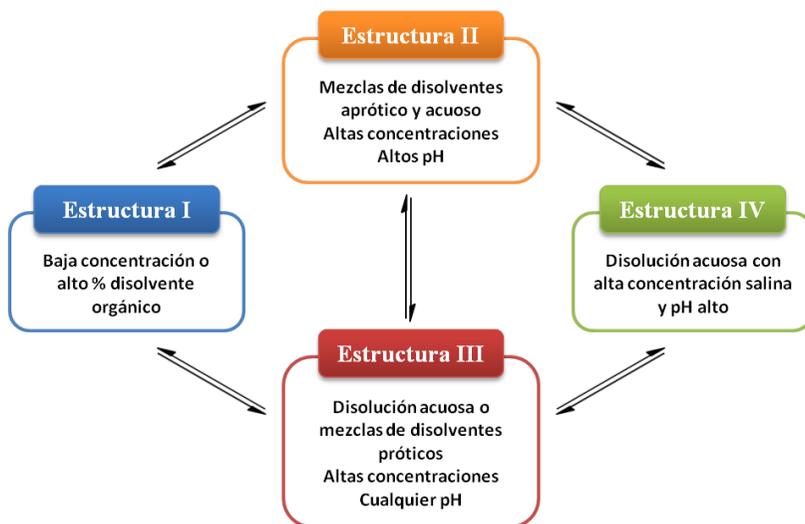


Figura 1.5. Equilibrios entre las diferentes estructuras de la hemina propuestas por *Egan et al.*³⁰ dependiendo de las condiciones del medio.

Además de las estructuras anteriores, también se ha descrito la formación de otro tipo de agregado de la hemina cuando una disolución ácida de ella se calienta durante un periodo largo de tiempo.³⁹ Este agregado cristalino, denominado β -hematina, está constituido por una repetición espacial de dímeros μ -propionato de la hemina, que se unen a través de interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno entre los grupos propiónicos no ionizados (Figura 1.6).

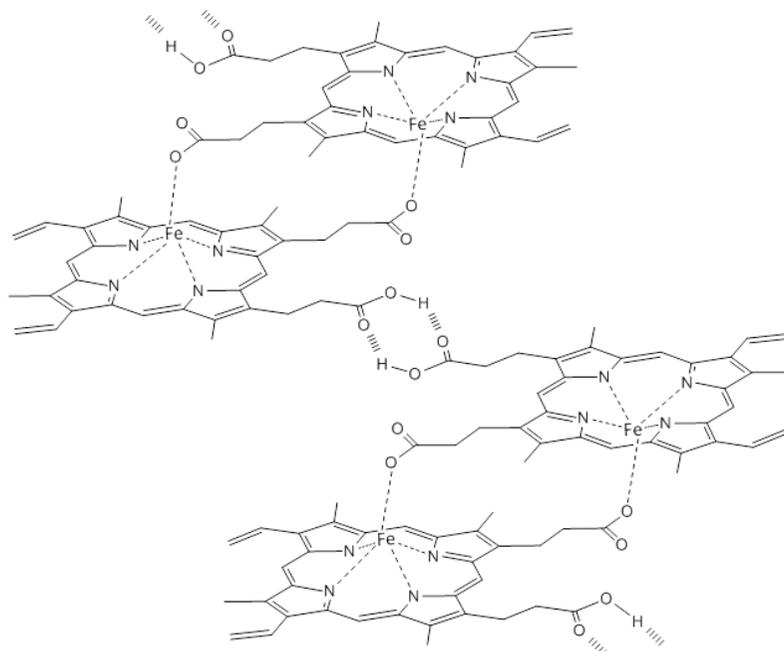


Figura 1.6. Estructura del cristal de hemozoina propuesta por *Pagola et al.*⁴¹ donde las líneas discontinuas representan la interacción del centro metálico con los ligandos y las líneas de barras representan los enlaces de hidrógeno entre grupos propiónicos de anillos de porfirina vecinos.

Cada unidad dimérica de la β -hematina está formada por dos moléculas de hemina unidas a través de dos interacciones entre el hierro(III) de un anillo y el grupo propionato del otro anillo.⁴⁰ Este agregado cristalino es química y estructuralmente idéntico a la hemozoina, comúnmente conocida como pigmento de la malaria,⁴¹ que se produce en vacuolas digestivas de los hematófagos cuando digieren la hemoglobina presente en los glóbulos rojos, liberando hemina libre. Su formación constituye un mecanismo de desintoxicación que han desarrollado los parásitos hematófagos, como

Plasmodium falciparum, para evitar la acumulación de hemina libre, que es tóxica.⁴² Un gran número de fármacos antimalaria basan su actividad terapéutica en la inhibición de la formación de la hemozoina.⁴³ Así por ejemplo, la cloroquina promueve la formación del dímero μ -oxo, mientras que la quinina se asocia con la hemina favoreciendo su forma monomérica.⁴⁴ Dado que algunos hematófagos están desarrollando cierta resistencia a estos medicamentos, el estudio del mecanismo de formación de la hemozoina es fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos antimalaria.⁴⁵

1.4. Electroquímica de la hemina inmovilizada sobre electrodos

Como se ha descrito anteriormente, la hemina presenta una baja solubilidad en medio acuoso dando lugar a la formación de agregados que dificultan su estudio electroquímico en disolución.⁴⁶ Una estrategia muy útil para resolver este problema consiste en su inmovilización sobre la superficie de un electrodo, como se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos donde se ha estudiado su transferencia electrónica, tanto desde el punto de vista fundamental como aplicado. De hecho, la hemina inmovilizada sobre diferentes soportes electródicos presenta un alto potencial en el campo de la electrocatálisis, donde se ha utilizado para reducir electroquímicamente diferentes sustancias como óxido nítrico a hidroxilamina,⁴⁷ peróxido de hidrógeno a agua,^{48,49} dióxido de carbono a monóxido de carbono^{50,51} y oxígeno a agua⁵² convirtiéndola en un electrocatalizador prometedor para el desarrollo de sensores y celdas de combustibles.⁵³

Para la inmovilización de la hemina se han utilizado diferentes procedimientos, entre los que se incluyen:

- i) Adsorción física sobre materiales hidrofóbicos, como grafito, aprovechando la hidrofobicidad del anillo porfirínico.⁵⁴
- ii) Unión covalente sobre una monocapa autoensamblada de moléculas portadoras de un grupo terminal capaz de formar un enlace covalente con la hemina. La estrategia más utilizada se basa en la formación de un enlace amida entre los grupo carboxílicos de la hemina y los grupos amino

terminales de una monocapa autoensamblada de tioles depositada sobre un electrodo de oro.⁵⁵

- iii) Inserción en matrices poliméricas⁵⁶ o pasta de carbón⁵⁷ con baja tasa de desorción cuando se ponen en contacto la disolución.

Los trabajos publicados en la bibliografía han puesto de manifiesto una variedad de comportamientos electroquímicos de la hemina inmovilizada, dependiendo del protocolo de inmovilización y de la composición de la disolución donde se realiza su caracterización electroquímica.

a) Electroquímica en medio acuoso

La respuesta voltamétrica típica de la hemina fisisorbida sobre un electrodo de grafito pirolítico registrada en medio acuoso se caracteriza por una onda voltamétrica (Figura 1.7) correspondiente a la conversión Fe(III)/Fe(II), cuyo potencial de pico medio a pH 7 se encuentra en torno a -0.35 V vs. Ag/AgCl/NaCl sat aunque este valor puede variar ligeramente dependiendo de la naturaleza y concentración del electrolito utilizado.^{47,58-61}

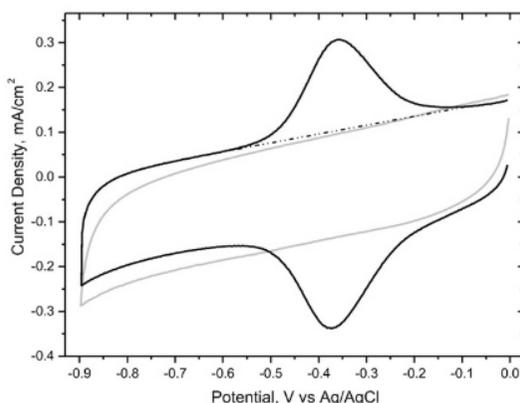


Figura 1.7. Voltagramas cíclicos de un electrodo de grafito pirolítico registrados en ausencia (línea gris) y presencia de hemina fisisorbida (línea negra) a 0.5 V s^{-1} en una disolución 0.5 M de buffer fosfato sódico a pH 7.⁶¹

A pesar de su sencillez, varios trabajos han puesto de manifiesto que los parámetros voltamétricos de la hemina inmovilizada sobre grafito, cuando la transferencia electrónica opera bajo control termodinámico, se desvían del comportamiento esperado para una población homogénea de centros redox aislados.^{59,60} Estas desviaciones incluyen: *i*) una asimetría en los valores de las intensidades de pico anódico y catódico, en condiciones donde se espera que sean iguales, *ii*) una separación finita de los potenciales de pico anódico y catódico, en condiciones donde deberían coincidir, y *iii*) una anchura de pico mayor de la esperada. Este comportamiento anómalo sugiere la existencia de procesos adicionales acoplados a la transferencia electrónica interfacial y/o la presencia de múltiples estados adsorbidos para la hemina con diferentes potenciales redox.

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en la conversión redox Fe(III)/Fe(II) de la hemina en un amplio intervalo de pH, también se ha puesto de manifiesto la existencia de otras conversiones redox en medios alcalinos. Así por ejemplo, *De Groot y Kooper*⁶² han descrito que la conversión redox Fe(IV)/Fe(III) de la hemina opera en el intervalo de potenciales de 1.0 a 0.6 V (vs. Ag/AgCl/NaCl sat) cuando el pH de la disolución varía de 7 a 12, y que la conversión Fe(II)/Fe(I) opera a -1.5 V (vs. Ag/AgCl/NaCl sat) para valores de pH superiores a 12.

En general, la respuesta electroquímica de la hemina inmovilizada sobre otros materiales de carbono, como grafito recubierto de nanotubos de carbono,⁴⁸ fieltro de carbono activado con grupos aminos⁶³ o carbono vítreo,⁶⁴ es similar a la descrita para el grafito pirolítico, aunque en algunos casos existen diferencias significativas en el valor de su potencial redox (Tabla 1). Debido a su buena conductividad eléctrica y alta estabilidad química, estos materiales se han empleado para el desarrollo de biosensores basados en las propiedades redox y electrocatalíticas de la hemina.

Además de los materiales de carbono, también se han utilizado electrodos de oro para la caracterización electroquímica de la hemina en el estado inmovilizado. En estos casos, los protocolos de inmovilización más utilizados han sido la unión covalente o la fisisorción electrostática sobre monocapas autoensambladas de tioles funcionalizados con

grupos terminales específicos. Estos grupos actúan como puntos de anclaje, condicionando la orientación de la hemina. Así, Wang *et al.*⁵⁵ han desarrollado dos protocolos de inmovilización para modular la orientación de la hemina. En uno de ellos, el electrodo de oro se modifica con una monocapa autoensamblada formada por moléculas de histidina unidas covalentemente a moléculas de 6-amino-1-hexanotiol. En estas monocapas, la hemina se inmoviliza a través de la interacción coordinativa de los nitrógenos imidazólicos de la histidina con el átomo de hierro del anillo porfirínico, adoptando una orientación paralela a la superficie de la monocapa. En el otro protocolo, el electrodo se modifica con una monocapa mixta de 6-amino-1-hexanotiol y octadecanotiol, y la hemina se inmoviliza covalentemente mediante la formación de enlaces amida entre sus grupos carboxílicos y los grupos aminos de la monocapa. En esta configuración, el anillo porfirínico se orienta perpendicularmente a la superficie de la monocapa, donde la presencia de octadecanotiol asegura su verticalidad. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una mejora de la velocidad de la transferencia electrónica de la hemina cuando se inmoviliza sobre la histidina, sin que se produzcan cambios significativos en el valor de su potencial redox, que es similar al obtenido en el electrodo de grafito pirolítico (Tabla 1).

En un trabajo reciente, Ulstrup *et al.*⁶⁵ han estudiado la respuesta electroquímica de la hemina adsorbida sobre un electrodo de oro monocristalino Au(111), poniendo de manifiesto la existencia de dos ondas voltamétricas, que han atribuido a dos poblaciones adsorbidas de hemina que difieren en el estado de spin del hierro (Figura 1.8). Curiosamente, el potencial redox de la población minoritaria es similar al único que se observa con un electrodo de grafito, mientras que el de la población mayoritaria es más positivo.

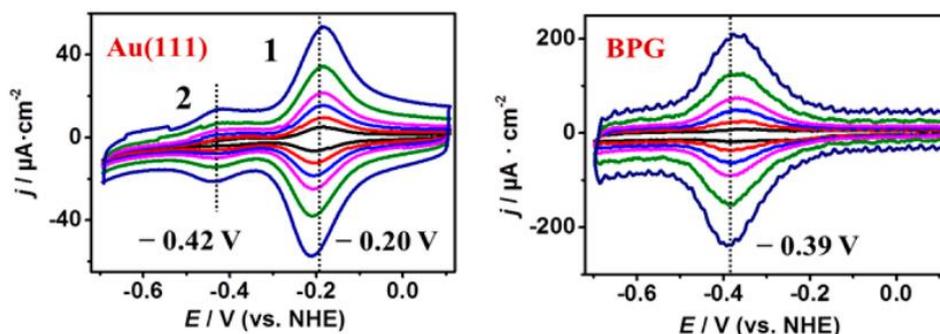


Figura 1.8. Voltagramas cíclicos registrados a diferentes velocidades de barrido para un electrodo de oro monocristalino (111) (izquierda) y de grafito pirolítico (derecha)⁶⁵ en presencia de una disolución 10 μM hemina 5 mM NaClO_4 a pH 11.7.

Otra alternativa para la inmovilización de la hemina es su inclusión en una pasta de carbón o en matrices poliméricas insolubles en agua que pueden incorporar adicionalmente partículas conductoras (Tabla 1). *Turdean et al.*⁵⁶ estudiaron la respuesta electroquímica de la hemina inmovilizada en una matriz de Nafion® y nanotubos de carbono (CNTs), poniendo de manifiesto que su potencial redox se desplaza hacia valores más negativos con respecto a los obtenidos con los electrodos de grafito, que refleja un aumento de la estabilidad de la forma oxidada de la hemina. Por otro lado, *Zheng et al.*⁵⁷ estudiaron la respuesta voltamétrica de la hemina inmovilizada en un electrodo de pasta de carbón, poniendo de manifiesto que su potencial redox es similar al obtenido con los electrodos de grafito, pero su transferencia electrónica está controlada por el transporte de carga a través de la pasta.

La inmovilización de la hemina en matrices poliméricas da lugar a estructuras heterogéneas, con zonas donde la hemina se encuentra alejada de la superficie del electrodo, siendo ineficientes para su transferencia electrónica. La electropolimerización representa una alternativa más eficiente, ya que permite depositar sobre el electrodo una capa homogénea de la hemina.⁶⁶ Este procedimiento, descrito por *Macor y Spiro*,⁶⁷ da lugar a una película eléctricamente conductora de la hemina cuando se aplica un potencial de 0.4 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{NaCl}$ sat) a un electrodo de grafito que está en contacto con una disolución acuosa de hemina y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$.⁶⁸ Su respuesta electroquímica se caracteriza por

una onda voltamétrica con el mismo potencial medio que la obtenida para la hemina inmovilizada sobre grafito. No obstante, este procedimiento es muy sensible al potencial aplicado, ya que la electrodeposición a 1.0 V (vs. Ag/AgCl/NaCl sat) produce un polímero aislante debido a la degradación oxidativa del anillo porfirínico.⁶⁹

La cantidad de hemina inmovilizada sobre los diferentes electrodos es muy variable, y depende en gran medida del protocolo de inmovilización (Tabla 1). *Koplin y Swofford*⁷⁰ determinaron una concentración superficial máxima de la hemina adsorbida sobre un electrodo de mercurio igual a $7.5 \cdot 10^{-11}$ mol cm⁻², que corresponde con el valor esperado para una orientación de la hemina paralela a la superficie del electrodo (2.38 nm² por molécula). Este valor fue utilizado por muchos autores como referencia para determinar si la cantidad de hemina adsorbida sobre electrodos sólidos es inferior o superior a una monocapa.^{54,68,71} Sin embargo, casi dos décadas más tarde, el trabajo de *Tao et al.*⁷² mostró evidencias de que la hemina se adsorbe formando una monocapa compacta con una concentración superficial máxima de $1.1 \cdot 10^{-10}$ mol cm⁻², que corresponde a una orientación inclinada, con un ángulo de 70-80° entre el plano del anillo y la normal de la superficie.⁷³

Tabla 1. Parámetros característicos de la transferencia electrónica de la hemina inmovilizada.

Electrodo	Inmovilización	Electrolito	Γ^a (pmol cm ⁻²)	$E_{p,m}^b$ (V)	k_s^c (s ⁻¹)
PG ⁴⁷	Fisorción	0.5 M BFS	150	-0.376	4900
GC/SWCNTs ⁴⁸	Fisorción	0.1 M BFS	-	-0.300	-
PG ⁵⁴	Fisorción	0.2 M BFS	450	-0.350	15
Au/His ⁵⁵	Coordinación N-Fe	25 mM HEPES	250	-0.350	-
Au/AHT ⁵⁵	Covalente	25 mM HEPES	22	-0.350	-
Au/AHT:ODT ⁵⁵	Covalente	25 mM HEPES	4.5	-0.350	-
SG/SWCNTs@nafion ⁵⁶	Encapsulamiento	0.1 M BFS	8220	-0.500	4.9
CP ⁵⁷	Encapsulamiento	0.1 M BFS	-	-0.390	-
PG ⁵⁸	Fisorción	10 mM Tris cloruro	1100	-0.346	-
SG ⁵⁹	Fisorción	0.1 M BFS	76500	-0.330	-
GC ⁶⁰	Fisorción	0.1 M BFS	915	-0.350	-
GC/Dim ⁶⁰	Fisorción	0.1 M BFS	800	-0.349	0.6

Electrodo	Inmovilización	Electrolito	Γ^a ($\mu\text{mol cm}^{-2}$)	$E_{p,m}^b$ (V)	k_s^c (s^{-1})
GC/Den ⁶⁰	Fisorción	0.1 M BFS	2300	-0.271	0.3
GC ⁶¹	Fisorción	0.5 M BFS	1700	-0.370	-
PG ⁶²	Fisorción	0.1 M BFS	-	-0.350	-
PG/DDAB ⁶²	Fisorción	0.1 M BFS	-	-0.150	-
AGF ⁶³	Covalente	0.2 M BFS	-	-0.202	3.4
HOPG ^{68,69}	Electro- polimerización	0.1 M Na ₂ B ₄ O ₇	~20000	-0.356	-
DME ⁷⁰	Fisorción	60% EtOH:H ₂ O	76	-0.173	-
BPG ⁷¹	Fisorción	50 mM BFS	83	-0.364	160
HOPG ⁷³	Fisorción	0.1 M Na ₂ B ₄ O ₇	77	-0.330	-
CF ⁷⁴	Fisorción	0.1 M BFS/BCS	30	-0.345	8.6
Au/L-cys ⁷⁵	Fisorción	0.1 M BFS	-	-0.070	0.65
GC/CNF ⁷⁶	Fisorción	0.1 M BFS	14000	-0.429	10
GC/SWCNTs ⁷⁶	Fisorción	0.1 M BFS	7800	-0.430	0.004
GC/ERGO-AuNPs ⁷⁷	Fisorción	0.1 M BFS	102000	-0.350	-
Au/Cyst ⁷⁸	Covalente	0.1 M NaClO ₄ / DMSO	10	-0.156	-
GC ⁷⁹	Fisorción	0.2 M BFS	150	-0.283	-

^aEstimado de la carga bajo el pico voltamétrico

^bPotencial referido al electrodo de Ag/AgCl/NaCl sat para pH 7.0

^cDeterminado a partir de la variación de la separación de pico anódico y catódico con la velocidad de barrido

PG, grafito pirolítico; GC, grafito vítreo; SWCNTs, nanotubos de carbono de una lámina; Au, oro; His, histidina; AHT, 6-amino-1-hexanotiol; ODT, octadecanotiol; SG, grafito espectral; CP, polvo de carbón; Dim, dímero G-0 de N-(2,4,6-triamino-1,3,5-triazina)melanina; Den, dendrímero G-2 de N-(2,4,6-triamino-1,3,5-triazina)melanina; DDAB, bromuro de didodecildimetilamonio; AGF, fieltro de grafito aminado; HOPG, grafito pirolítico altamente orientado; DME, electrodo de gota de mercurio; BPG, grafito pirolítico basal; CF, fieltro de carbono; L-cys, L-cisteína; CNF, nanofibras de carbono; ERGO, óxido de grafeno electroquímicamente reducido; AuNPs, nanopartículas de oro; Cyst, cisteína; BFS, búfer fosfato sódico; HEPES, ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico; Tris cloruro, cloruro de tris(hidroxiethyl)aminometano; EtOH, etanol; BCS, buffer citrato sódico; DMSO, dimetilsulfóxido.

b) Electroquímica en DMSO

Como se ha descrito anteriormente, la respuesta electroquímica de la hemina en disolución acuosa presenta una onda voltamétrica correspondiente a la conversión redox FePP(III)/FePP(II) que tiene lugar en el átomo de hierro central. Sin embargo, *Tieman et al.*⁸⁰ han descrito la presencia de dos ondas voltamétricas en dimetilsulfóxido. Una a -0.12 V (vs. Ag/AgCl/NaCl sat), que atribuyeron a la conversión redox

FePP(III)/FePP(II), y otra a -1.25 V (vs. Ag/AgCl/NaCl sat), que atribuyeron a la conversión redox FePP(II)/FePP(I). Estos autores consideraron que la estabilización de la especie Fe(I) se debía a la coordinación del átomo de hierro con el dimetilsulfóxido.

1.5. Acoplamiento de las transferencias eletro-protónicas en la hemina

Muchas reacciones de transferencia electrónica que operan en las proteínas van acompañadas de intercambios protónicos entre el grupo ácido/base de la proteínas y especies dadoras/aceptoras de protones presentes en la disolución. Estos procesos, denominados PCET (por las siglas en inglés proton-coupled electron transfer) están presentes en muchos sistemas biológicos, como por ejemplo la reducción de O_2 a H_2O llevada a cabo por el citocromo *c* oxidasa acoplada a una bomba de protones transmembrana presente en la mitocondria. En dicho proceso están implicados 4 H^+ y 4 e^- de forma que por cada electrón que toma el centro activo de la enzima, un protón pasa a través de la membrana, siendo este proceso crítico en la cadena transportadora de electrones y protones. Sin embargo, en muchos casos, estos procesos no se aprecian e incluso se desconocen. Actualmente existe un gran interés en el estudio de los procesos PCET, dada su ubicuidad en los sistemas químicos y biológicos.⁸¹

Ksenzhek y *Petrova*⁸² fueron los primeros en estudiar la dependencia del potencial de reducción de la hemina adsorbida en un electrodo con el pH. La curva de valoración que obtuvieron presenta cuatro tramos con diferentes pendientes (Figura 1.9), que reflejan el acoplamiento de la transferencia electrónica con procesos de protonación/desprotonación, en los que se intercambian un número variable de protones.

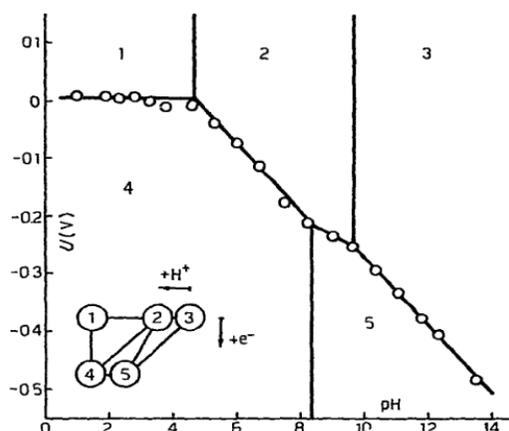
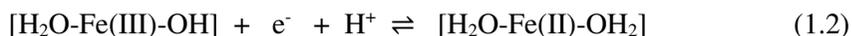


Figura 1.9. Dependencia del potencial medio con el pH de la hemina sobre grafito obtenida por *Ksenzhek y Petrova*.⁸²

El primer tramo ($\text{pH} < 4.65$), donde el potencial medio es independiente del pH, se atribuyó a la conversión Fe(III)/Fe(II) de la hemina manteniendo las dos moléculas agua coordinadas al hierro en su estado neutro:



El segundo tramo ($4.65 < \text{pH} < 8.35$), con una pendiente de ~ -59 mV por unidad de pH, se atribuyó a la conversión redox entre el acuohidroxido complejo de la hemina oxidada y bi(acuo) complejo de la hemina reducida con el consiguiente intercambio de un protón:



El tercer tramo ($8.35 < \text{pH} < 9.65$), con una pendiente más pequeña que el tramo anterior, se atribuyó al acoplamiento de la transferencia electrónica del acuo(hidroxido) complejo de la hemina oxidada con su dimerización, y protonación del ligando hidroxilo:



Para el último tramo ($\text{pH} > 9.65$), con una pendiente de $\sim -59 \text{ mV}$ por unidad de pH , se atribuyó a la transferencia $2e^-/2\text{H}^+$ del tris(hidroxi) complejo de la hemina dimérica oxidada:



Posteriormente, *Shigehara y Anson*⁸³ presentaron una curva de valoración que difiere de la anteriormente descrita en la extensión de los cuatro tramos. (Figura 1.10, panel izquierdo).

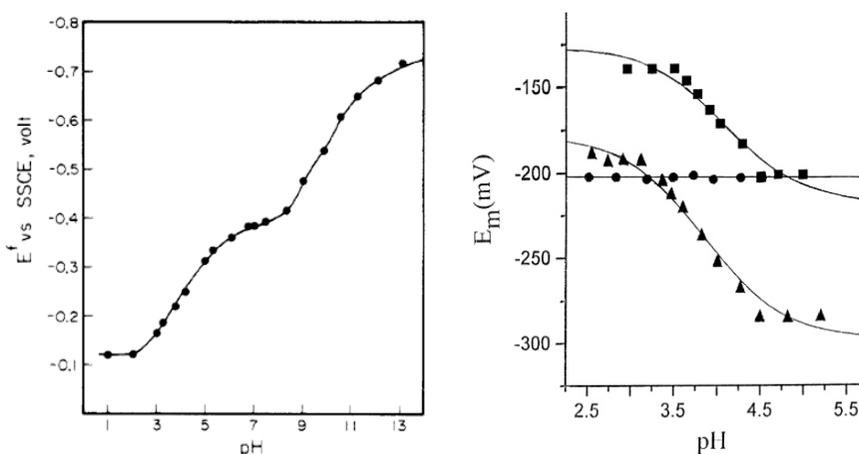
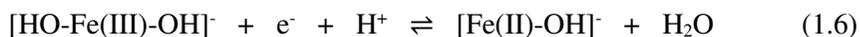


Figura 1.10. Curvas de valoración de la hemina adsorbida sobre grafito pirolítico obtenidas por *Shigehara y Anson*⁸³ (panel izquierdo) y adsorbida sobre grafito vítreo en presencia de disoluciones de SDS (\blacktriangle), TX-100 (\blacksquare) y CTAB (\bullet) obtenidas por *Das y Medhi*⁸⁴ (panel derecho).

En los intervalos de pH de $2.5 < \text{pH} < 5.5$ y $8.5 < \text{pH} < 13$, el potencial medio varía linealmente con el pH con una pendiente de -60 mV pH^{-1} , que atribuyeron a las siguientes transferencias de $1e^-/1\text{H}^+$:



para pH entre 2.5 y 5.5, y



para pH por encima de 8.5. Mientras que en rango de pH comprendido entre $5.5 < \text{pH} < 8.5$, el potencial medio es independiente del pH, indicando que tiene lugar una transferencia electrónica simple sin cambio en el estado ácido/base de la hemina.

Una década más tarde, *Das y Medhi*⁸⁴ estudiaron la dependencia del potencial de reducción de la hemina con el pH en presencia de disoluciones de tensioactivos, observándose una dependencia del potencial medio con el pH cuando el medio contiene SDS o TX-100 (Figura 1.10, panel derecho), y una invariabilidad del mismo en presencia de CTAB. Estos autores propusieron que la transferencia protónica acoplada a la transferencia electrónica se debe a uno de los grupos propiónicos del anillo porfirínico, que al interaccionar con la molécula de CTAB y formar un par iónico pierde su capacidad de protonación. Los valores de pK_a correspondientes a las reacciones (1.7) y (1.8), determinados en presencia de SDS son 3.2 y 4.5 para las especies oxidada y reducida, respectivamente; mientras que en presencia de TX-100 los correspondientes valores son 3.5 y 4.4.



Con el objetivo de dilucidar los grupos ionizables están involucrados en el proceso de transferencia electrónica de la hemina, *Pilloud et al.*⁸⁵ estudiaron el efecto del pH en la respuesta voltamétrica de la hemina (FePP) y de su derivado doblemente esterificado (FePPDME), en el estado inmovilizado sobre una monocapa autoensamblada de dimercaptoalcano (Figura 1.11). La similitud de las curvas de valoración obtenidas para estas dos porfirinas, puso de manifiesto que las moléculas de agua coordinadas al átomo de hierro son las responsables del intercambio protónico acoplado a la transferencia electrónica. Estos autores propusieron los siguientes equilibrios ácido/base:



Cuyos valores de pK_a se muestran en la Tabla 2

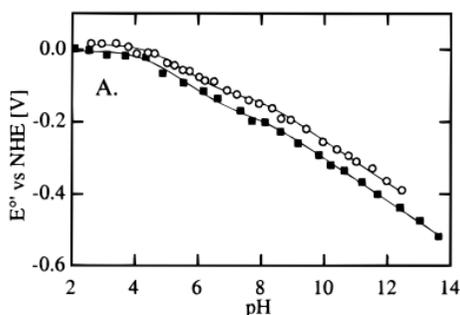


Figura 1.11. Dependencia del potencial medio con el pH de FePP (■) y FePPDME (○) adsorbidos sobre oro modificado con una monocapa autoensamblada de mercaptoalcanos.⁸⁵

*De Groot y Koper*⁶² estudiaron la respuesta voltamétrica en función del pH para diferentes protoporfirinas IX (Fe, Mn, Co, Cr) sobre un electrodo de grafito pirolítico (Figura 1.12(a)). Las curvas de valoración de las diferentes metaloporfirinas mostraron un comportamiento similar en la zona ácida, con un $pK_a \approx 4$ para su forma oxidada, que atribuyen a la ionización de la molécula de agua que coordina al centro metálico, de acuerdo con estudios previos.^{83,85} Basados en estos resultados, estos autores propusieron un diagrama de Pourboix para los diferentes estados redox y de protonación de la hemina inmovilizada sobre grafito, mostrado la Figura 1.12(b).

Como resumen, la Tabla 2 muestra los valores de los pK_a descritos en la bibliografía para los estados oxidado y reducido de diferentes porfirinas de hierro inmovilizadas sobre electrodos, observándose una dispersión significativa que refleja la diversidad de factores que controlan sus propiedades ácido/base. Es previsible que la contribución relativa de estos factores varíe con las distintas condiciones experimentales, contribuyendo así a su dispersión.

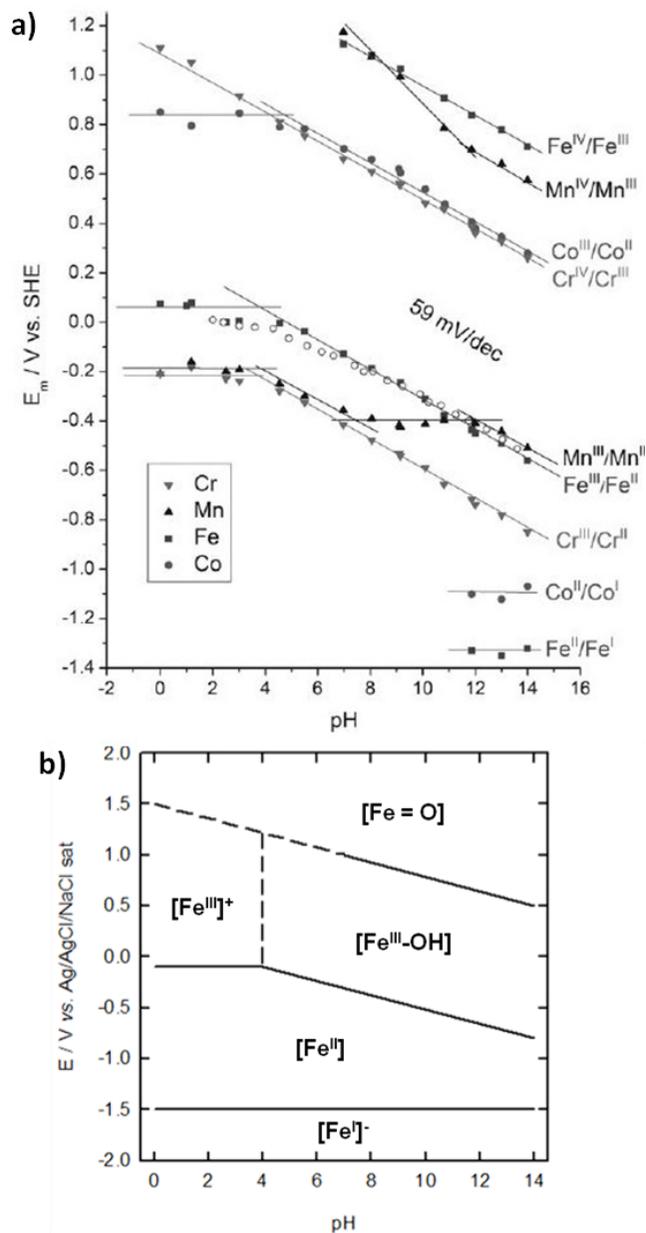


Figura 1.12. a) Dependencia del potencial medio con el pH para protoporfirinas IX de Cr(∇), Mn(\blacktriangle), Fe(\blacksquare) y Co(\bullet) adsorbidas sobre grafito pirolítico y para protoporfirina IX de Fe(\circ) inmovilizada sobre oro modificado con una monocapa autoensamblada de mercaptoalcanos. b) Diagrama de Pourboix propuesto para las diferentes especies de protoporfirina IX de hierro (hemina) inmovilizada sobre grafito.⁶²

Tabla 2. Valores de pK_a de los grupos ionizables indicados de protoporfirinas de hierro (Fe(III)PPIX) y derivados descritos en la bibliografía.

Protoporfirina	Electrolito	$pK_a(ox)$	$pK_a(red)$	Grupo ionizable
Fe(III)PPIX en disolución ³⁴	BFS/EtOH	6.5	-	H ₂ O axial
		~13	-	H ₂ O axial adicional
Fe(III)PPIX en disolución	HEPES	7.3	-	H ₂ O axial
[Fe(III)PPIX] ₂ en disolución ²⁹	HEPES	6.2	-	H ₂ O axial
		8.5	-	H ₂ O axial adicional
Fe(III)OEtPP en disolución ⁸⁶	SDS	4.8	-	H ₂ O axial (exterior)*
		5.6	-	H ₂ O axial (interior)*
[Fe(III)(2-TPyP)] ⁺ en disolución ⁸⁷	BFS	5-6	-	H ₂ O axial
		11	-	H ₂ O axial adicional
[Fe(III)(TMPyP)] ₂ O en disolución ⁴⁹	BRB	8.5	-	H ₂ O axial
Fe(III)PPIX sobre Au/SAM ⁸⁸	BFS	3.5	7.7	H ₂ O axial
Fe(III)PPIX sobre Au/SAM ⁸⁵	BFS	4.2	7.2	H ₂ O axial
		8.0	>14	H ₂ O axial adicional
		4.4	6.8	H ₂ O axial
Fe(III)PPIX·DME sobre Au/SAM ⁸⁵	BFS	7.9	>14	
Fe(III)PPIX sobre GP ⁶²	BFS	4.0	-	H ₂ O axial
Fe(III)(TMPyP) sobre GC ⁴⁹	BRB	5.0	7.0	H ₂ O axial
Fe(III)PPIX·MME en disolución ⁸⁹	MeIm	21.1	-	Grupo propiónico
Fe(III)PPIX sobre GCD ⁸⁴	SDS	3.2	4.5	Grupo propiónico
	TX-100	3.5	4.4	Grupo propiónico
Cálculos DFT ⁴⁰	Fe(III)PPIX	-	4.3	Grupo propiónico 1
		-	5.5	Grupo propiónico 2
	Fe(III)PPIX·(OH)	-	4.2	Grupo propiónico 1
		-	6.4	Grupo propiónico 2
	Fe(III)PPIX·(H ₂ O)	-	4.3	Grupo propiónico 1
		-	5.6	Grupo propiónico 2
	Fe(III)PPIX·(H ₂ O) ^a	-	7.7	H ₂ O axial
	Fe(III)PPIX·(H ₂ O) ^b	-	8.3	H ₂ O axial

*exterior, valor para la ionización fuera de una micela de SDS; interior, valor dentro de la micela.

^aProtoporfirina con los grupos propiónicos protonados;

^bProtoporfirina con los grupos propiónicos desprotonados.

Fe(III)OEtPP, octaetilporfirina de hierro(III); [Fe(III)(2-TPyP)]⁺, meso-tetrakis(2-piridil)porfirina de hierro(III); Fe(III)(TMPyP), meso-tetrakis(N-metil-4-piridil)porfirina de hierro; Fe(III)PPIX·DME, protoporfirina IX dimetiléster de hierro(III); Fe(III)PPIX·MME, protoporfirina IX monometilester de hierro(III); Au/SAM, monocapa autoensamblada sobre oro; GC, carbono vítreo; GP, grafito pirolítico; GCD, disco de grafito vítreo; BFS, buffer fosfato sódico, EtOH, etanol; HEPES, ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetasulfónico; SDS, dodecilsulfato sódico; TX-100, triton X-100; BRB, Buffer Britton-Robinson; MeIm, N-metilimidazol.

1.6. Potencial redox de las hemoproteínas

Las hemoproteínas se han formado a partir de diferentes tipos de grupos hemo (protoporfirinas de hierro), que se diferencian en la naturaleza de los sustituyentes β del anillo porfirínico. La dispersión de los valores de sus potenciales redox, que se extiende hasta un intervalo de 1 V, refleja la diversidad de factores que contribuyen a la estabilidad relativa de los estados férrico y ferroso del centro metálico. Estos factores incluyen:^{90,91}

- a) *La tipología del grupo hemo*, donde se ha observado que los citocromos con el hemo *c* presentan valores más extremos (bajos o altos) del potencial redox que los citocromos portadores del hemo *b*, sin que todavía se haya establecido una relación causativa. En este contexto, *Zhuang et al.*⁹² han puesto de manifiesto que la acetilación de la hemina produce un aumento de su potencial redox de ~ 160 mV.
- b) *Los ligandos axiales* que coordinan al centro metálico, donde se ha puesto de manifiesto que de los dos ligandos axiales más comunes en los citocromos (histidina y metionina), la metionina aumenta el potencial redox del grupo hemo entre 100 y 200 mV con respecto a la histidina, debido a su mayor afinidad por el estado ferroso del centro metálico axial.^{93,94} Asimismo, se ha puesto de manifiesto que la coordinación axial de hemocomplejos con ácidos carboxílicos y alcoholes produce un aumento lineal de su potencial redox con el pK_a del ligando.⁹⁵
- c) *Las interacciones con la segunda esfera de coordinación*, que afectan a la unión de los ligandos axiales con el centro metálico, mediante una modificación de las propiedades electrónicas de dichos ligandos. Así por ejemplo, *Bowman et al.*⁹⁶ han puesto de manifiesto que el fortalecimiento del puente de hidrógeno entre la histidina axial y un grupo carbonilo de la envoltura peptídica mutada produce una disminución del potencial redox de ~ 100 mV.
- d) *La accesibilidad del disolvente al grupo hemo*, que está limitada por la baja constante dieléctrica de las proteínas. En general, la hidrofobicidad de la envoltura peptídica se traduce en un aumento del potencial redox de las hemoproteínas de hasta 240 mV, debido a la desestabilización de su estado férrico con respecto al ferroso.^{97,98}

-
- e) *Las interacciones electrostáticas con las cargas locales*, que afectan a la estabilidad de los estados de oxidación del centro metálico. Así por ejemplo, la mutación de una tirosina por una lisina en el citocromo *c* produce un aumento de su potencial, debido a la neutralización de las cargas negativas de los residuos propiónicos del anillo porfirínico por las cargas positivas de las lisinas, que desestabilizan el estado férrico del grupo hemo.⁹⁹
- f) *La distorsión del grupo hemo*, que afecta a su estructura electrónica debido a una menor deslocalización de los electrones π .¹⁰⁰ *Olea et al.*¹⁰¹ han puesto de manifiesto que una disminución de la planaridad del cofactor hemo provoca un incremento del potencial redox de la hemoproteína H-NOX (abreviatura de heme nitric-oxide/oxygen binding protein).

Además de los factores anteriores, cuando las hemoproteínas se encuentran en el estado inmovilizado, sus potenciales redox pueden variar con la tipología de la superficie y el protocolo de inmovilización (Figura 1.13), debido a la presencia de interacciones específicas entre la proteína y los componentes de la superficie, que pueden inducir orientaciones preferenciales o cambios conformacionales de las proteínas.^{47,102–115}

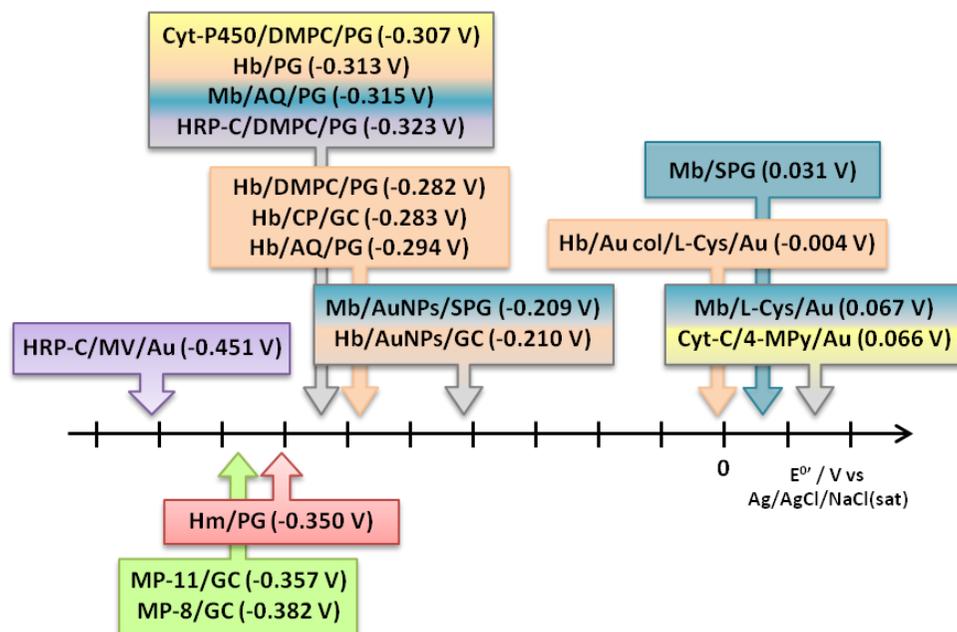


Figura 1.13. Potenciales redox de hemoproteínas inmovilizadas en diferentes superficies electródicas. Cyt, citocromo; Hb, hemoglobina; HRP, peroxidasa del rábano; Mb, mioglobina; MP-8, microperoxidasa 8; MP-11, microperoxidasa 11. Electrodo: Au, oro; GC, carbón grafito; PG, grafito pirolítico; SPG, grafito espectroscópico. 4-MPy, monocapa de 4-mercaptopiridina; AQ, película polimérica comercial; AuNPs, nanopartículas de oro; Au col, oro coloidal; CP, polvo de carbono; DMPC, monocapa de dimiristoil fosfatidilcolina; L-Cys, monocapa de cisteína; MV, monocapa de metil-viologeno.

1.7. Bibliografía

- (1) Ma, X.; Hortelão, A. C.; Patiño, T.; Sánchez, S. *ACS Nano* **2016**, *10*, 9111–9122.
- (2) Yarman, A.; Jetzschmann, K.; Neumann, B.; Zhang, X.; Wollenberger, U.; Cordin, A.; Haupt, K.; Scheller, F. *Chemosensors* **2017**, *5*, 11–26.
- (3) Farhadi, S. A.; Bracho-Sanchez, E. R.; Freeman, S. L.; Keselowsky, B. G.; Hudalla, G. A. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 649–656.
- (4) Saboe, P. O.; Conte, E.; Farrell, M.; Bazan, G. C.; Kumar, M. *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 14–42.
- (5) Jeuken, L. J. C. C. *Biophotoelectrochemistry: From Bioelectrochemistry to Biophotovoltaics*; Jeuken, L. J. C., Ed.; Springer International Publishing, 2016.
- (6) Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Shushanyan, M.; Van Eldik, R. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 692–706.
- (7) Hirst, J.; Armstrong, F. A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5062–5071.
- (8) Armstrong, F. A.; Camba, R.; Heering, H. A.; Hirst, J.; Jeuken, L. J. C.; Jones, A. K.; Léger, C.; McEvoy, J. P. *Faraday Discuss.* **2000**, *116*, 191–203.
- (9) Jeuken, L. J. C.; Wisson, L. J.; Armstrong, F. A. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *331*, 216–223.
- (10) Zhou, H.; Zhang, Z.; Yu, P.; Su, L.; Ohsaka, T.; Mao, L. *Langmuir* **2010**, *26*, 6028–6032.
- (11) Cappillino, P. J.; Miecznikowski, J. R.; Tyler, L. A.; Tarves, P. C.; McNally, J. S.; Lo, W.; Kasibhatla, B. S. T.; Krzyaniak, M. D.; McCracken, J.; Wang, F. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 5662–5677.
- (12) Goran, J. M.; Stevenson, K. J. *Langmuir* **2013**, *29*, 13605–13613.
- (13) Sosna, M.; Fapyane, D.; Ferapontova, E. E. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *728*, 18–

- 25.
- (14) Han, H.; Huang, Q.; Liu, H.; Zhang, J. *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 3925–3931.
- (15) Emahi, I.; Mitchell, M. P.; Baum, D. A. *J. Electrochem. Soc.* **2017**, *164*, H3097–H3102.
- (16) Cordes, M.; Giese, B. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 892–901.
- (17) Waldeck, D. H.; Khoshtariya, D. *Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine II*; Eliaz, N., Ed.; Modern Aspects of Electrochemistry; Springer US: Boston, MA, 2012; Vol. 53.
- (18) Amdursky, N.; Marchak, D.; Sepunaru, L.; Pecht, I.; Sheves, M.; Cahen, D. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 7142–7161.
- (19) Banerjee, R. In *Redox Biochemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2007; pp 1–9.
- (20) Auwärter, W.; Ćejija, D.; Klappenberger, F.; Barth, J. V. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 105–120.
- (21) Hipps, K. W.; Mazur, U. *Langmuir* **2018**, *34*, 3–17.
- (22) Barth, J. V. *Surf. Sci.* **2009**, *603*, 1533–1541.
- (23) Hieringer, W.; Flechtner, K.; Kretschmann, A.; Seufert, K.; Auwärter, W.; Barth, J. V.; Görling, A.; Steinrück, H. P.; Gottfried, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6206–6222.
- (24) Knaak, T.; Gopakumar, T. G.; Schwager, B.; Tucek, F.; Robles, R.; Lorente, N.; Berndt, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 7544–7550.
- (25) Mazur, U.; Hipps, K. W. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4737–4749.
- (26) Bednarski, T. M.; Jordan, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1552–1558.
-

-
- (27) Medhi, O. K.; Silver, J. *Inorganica Chim. Acta* **1988**, *153*, 133–134.
- (28) Silver, J.; Lukas, B. *Inorganica Chim. Acta* **1983**, *80*, 107–113.
- (29) De Villiers, K. A.; Kaschula, C. H.; Egan, T. J.; Marques, H. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 101–117.
- (30) Asher, C.; De Villiers, K. A.; Egan, T. J. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 7994–8003.
- (31) Collier, G. S.; Pratt, J. M.; De Wet, C. R.; Tshabalala, C. F. *Biochem. J.* **1979**, *179*, 281–289.
- (32) Adams, P. A.; Baldwin, D. A.; Hepner, C. E.; Pratt, J. M. *Bioinorg. Chem.* **1978**, *9*, 479–494.
- (33) Morrison, B.; Williams, F. *J. Biol. Chem.* **1941**, *137*, 461–473.
- (34) Davies, T. H. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1973**, *329*, 108–117.
- (35) Frydman, B.; de Frydman, R. B. In *Bioquímica General*; El ateneo, 1983; pp 265–282.
- (36) Blauer, G.; Zvilichovsky, B. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *127*, 749–755.
- (37) Kauffman, S. A.; Group, N. P. *Nature* **1969**, *223*, 960–961.
- (38) O’Keeffe, D. H.; Barlow, C. H.; Smythe, G. A.; Fuchsman, W. H.; Moss, T. H.; Lilienthal, H. R.; Caughey, W. S. *Bioinorg. Chem.* **1975**, *5*, 125–147.
- (39) Egan, T. J.; Mavuso, W. W.; Ncokazi, K. K. *Biochemistry* **2001**, *40*, 204–213.
- (40) Durrant, M. C. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 9754–9765.
- (41) Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K. *Nature* **2000**, *404*, 307–310.
- (42) Egan, T. J. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *157*, 127–136.
-

- (43) Coronado, L. M.; Nadovich, C. T.; Spadafora, C. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2032–2041.
- (44) Casabianca, L. B.; An, D.; Natarajan, J. K.; Alumasa, J. N.; Roepe, P. D.; Wolf, C.; Dios, A. C. de. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 6077–6081.
- (45) Kumar, S.; Bhardwaj, T. R.; Prasad, D. N.; Singh, R. K. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *104*, 8–27.
- (46) Huihong, L.; Baoxian, Y.; Xingyao, Z. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* **1998**, *3*, 473–475.
- (47) De Groot, M. T.; Merckx, M.; Wonders, A. H.; Koper, M. T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7579–7586.
- (48) Liu, J.; Qiu, J.; Sun, K.; Chen, J.; Miao, Y. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 462–469.
- (49) Costentin, C.; Dridi, H.; Savéant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13535–13544.
- (50) Gao, Y.; Chen, J. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *583*, 286–291.
- (51) Costentin, C.; Robert, M.; Savéant, J. M. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2996–3006.
- (52) Liang, Z. X.; Song, H. Y.; Liao, S. J. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 2604–2610.
- (53) Zhang, P.; Hu, J.; Liu, B.; Yang, J.; Hou, H. *Chemosphere* **2019**, *219*, 617.
- (54) Chen, J.; Wollenberger, U.; Lisdat, F.; Ge, B.; Scheller, F. W. *Sensors Actuators, B Chem.* **2000**, *70*, 115–120.
- (55) Wang, G. X.; Zhou, Y.; Wang, M.; Bao, W.J.; Wang, K.; Xia, X. H. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 689–692.
- (56) Turdean, G. L.; Popescu, I. C.; Curulli, A.; Palleschi, G. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 6435–6441.
- (57) Zheng, N.; Zeng, Y.; Osborne, P. G.; Li, Y.; Chang, W.; Wang, Z. *J. Appl.*
-

-
- Electrochem.* **2002**, *32*, 129–133.
- (58) Bianco, P.; Haladjian, J.; Draoui, K. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *279*, 305–314.
- (59) Mares, G. M.; Turdean, G. L.; Popescu, I. C. *Stud. UBB Chem.* **2013**, *2/2013*, 105–114.
- (60) Deac, A. R.; Morar, C.; Turdean, G. L.; Darabantu, M.; Gál, E.; Bende, A.; Muresan, L. M. *J. Solid State Electrochem.* **2016**, *20*, 3071–3081.
- (61) Kannan, B.; Kumsa, D.; Jebaraj, A. J.; Méndez-Albores, A.; Georgescu, N. S.; Scherson, D. *J. Electroanal. Chem.* **2017**, *793*, 250–256.
- (62) De Groot, M. T.; Koper, M. T. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 1023–1031.
- (63) Ma, Q.; Liu, T.; Tang, T.; Yin, H.; Ai, S. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 8278–8284.
- (64) Brown, A. P.; Koval, C.; Anson, F. C. *J. Electroanal. Chem.* **1976**, *72*, 379–387.
- (65) Zhang, L.; Kepp, K. P.; Ulstrup, J.; Zhang, J. *Langmuir* **2018**, *34*, 3610–3618.
- (66) Bennett, J. A.; Miller, D. P.; Simpson, S. M.; Rodriguez, M.; Zurek, E. *Langmuir* **2018**, *34*, 11335–11346.
- (67) Macor, K. A.; Spiro, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *14*, 5601–5607.
- (68) Snyder, S. R.; White, H. S. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 5626–5632.
- (69) Macor, K. A.; Spiro, T. G. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *163*, 223–236.
- (70) Kolpin, C. F.; Swofford, H. S. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 916–920.
- (71) Sagara, T.; Takagi, S.; Niki, K. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *349*, 159–171.
- (72) Tao, N. J.; Cardenas, G.; Cunha, F.; Shi, Z. *Langmuir* **1995**, *11*, 4445–4448.
- (73) Sagara, T.; Fukuda, M.; Nakashima, N. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 521–527.
-

- (74) Hasebe, Y.; Wang, Y. *J. Environ. Sci. (China)* **2013**, *25*, 1055–1062.
- (75) Chimie, R. R. De; Mares, G. M.; Ǻ, A. N.; Turdean, G. L.; Ionel, C. *Rev. Roum. Chim.* **2014**, *59*, 613–621.
- (76) Valentini, F.; Cristofanelli, L.; Carbone, M.; Palleschi, G. *Electrochim. Acta* **2012**, *63*, 37–46.
- (77) Wang, B.; Kang, K.; Ji, X.; Liu, Y.; Li, X.; Wang, N.; Ren, J. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**, *13*, 8481–8495.
- (78) Lötzbeyer, T.; Schuhmann, W.; Schmidt, H.-L. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *395*, 341–344.
- (79) Li, W.; Aoki, K. J.; Chen, J.; Nishiumi, T. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *743*, 134–138.
- (80) Tieman, R. S.; Coury, L. A.; Kirchhoff, J. R.; Heineman, W. R. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *281*, 133–145.
- (81) Warren, J. J.; Mayer, J. M. *Biochemistry* **2015**, *54*, 1863–1878.
- (82) Ksenzhek, O. S.; Petrova, S. A. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1978**, *5*, 661–670.
- (83) Shigehara, K.; Anson, F. C. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2776–2783.
- (84) Das, D. K.; Medhi, O. K. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *70*, 83–90.
- (85) Pilloud, D. L.; Chen, X.; Dutton, P. L.; Moser, C. C. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2868–2877.
- (86) Group, C. P.; Road, H. B. *Dalton Trans.* **1991**, 2091–2096.
- (87) Tovmasyan, A.; Weitner, T.; Sheng, H.; Lu, M.; Rajic, Z.; Warner, D. S.; Spasojevic, I.; Reboucas, J. S.; Benov, L.; Batinic-Haberle, I. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5677–5691.
-

-
- (88) Mukherjee, S.; Bandyopadhyay, S.; Chatterjee, S.; Dey, A. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12304–12307.
- (89) Warren, J. J.; Mayer, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8544–8551.
- (90) Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Petrik, I.; Tian, S.; Lu, Y.; Liu, J.; Bhagi, A.; Chakraborty, S. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4366–4469.
- (91) Hosseinzadeh, P.; Lu, Y. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2016**, 1857, 557–581.
- (92) Zhuang, J.; Amoroso, J. H.; Kinloch, R.; Dawson, J. H.; Baldwin, M. J.; Gibney, B. R. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 4685–4694.
- (93) Miller, G. T.; Zhang, B.; Hardman, J. K.; Timkovich, R. *Biochemistry* **2000**, 39, 9010–9017.
- (94) Hay, S.; Wydrzynski, T. *Biochemistry* **2005**, 44, 431–439.
- (95) Richard, M. J.; Shaffer, C. D.; Evilia, R. F. *Electrochim. Acta* **1982**, 27, 979–983.
- (96) Bowman, S. E. J.; Bren, K. L. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 7890–7897.
- (97) Tezcan, F. A.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 13383–13388.
- (98) Zheng, Z.; Gunner, M. R. *Proteins* **2009**, 75, 719–734.
- (99) Lett, C. M.; Guillemette, J. G. *Biochem. J.* **2002**, 362, 281–287.
- (100) Senge, M. O. *Chem. Commun.* **2006**, No. 3, 243–256.
- (101) Olea Jr., C.; Kuriyan, J.; Marletta, M. A.; Olea, C.; Kuriyan, J.; Marletta, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12794–12795.
- (102) Yang, J.; Hu, N. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1999**, 48, 117–127.
- (103) Dimcheva, N. D.; Horozova, E. G.; Dodevska, T. M. *Bulg. Chem. Commun.* **2011**,
-

43, 17–22.

- (104) Gu, H. Y.; Yu, A. M.; Chen, H. Y. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *516*, 119–126.
- (105) Paulo, T. D. F.; Diógenes, I. C. N.; Abruña, H. D. *Langmuir* **2011**, *27*, 2052–2057.
- (106) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Sola, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *339*, 283–290.
- (107) Yang, J.; Hu, N. F.; Rusling, J. F.; Hu, Y. J.; Zhou, Y. L.; Zeng, Y. H.; Hu, N. F. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *463*, 53–62.
- (108) Razumas, V. J.; Gudavičius, A. V.; Kulys, J. J. *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *151*, 311–315.
- (109) Santucci, R.; Reinhard, H.; Brunori, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8536–8537.
- (110) Marques, H. M. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1597–1599.
- (111) Han, X.; Cheng, W.; Zhang, Z.; Dong, S.; Wang, E. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2002**, *1556*, 273–277.
- (112) Zhang, Z.; Nassar, A.-E. F.; Lu, Z.; Schenkmanb, J. B.; Ruslinga, J. F. *J. Chem. Soc., Faraday Trans* **1997**, *93*, 1769–1774.
- (113) Ma, H.; Hu, N.; Rusling, J. F. *Langmuir* **2000**, *16*, 4969–4975.
- (114) Zhang, Z.; Chouchane, S.; Magliozzo, R. S.; Rusling, J. F. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 163–170.
- (115) Ma, G. X.; Lu, T. H.; Xia, Y. Y. *Bioelectrochemistry* **2007**, *71*, 180–185.

Capítulo 2

Procedimiento Experimental

2.1. Caracterización electroquímica

2.1.1. Reactivos y preparación de disoluciones

Las porfirinas utilizadas en el presente trabajo han sido hemina (de origen bovino, Sigma-Aldrich, 90%), hematina (de origen porcino, Sigma-Aldrich) y cloruro de 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaetil-21H,23H-porfina de hierro (III) (Sigma-Aldrich). Las disoluciones de estas porfirinas se prepararon utilizando dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, $\leq 0.02\%$ de agua) como disolvente

Todas las disoluciones de trabajo, se han preparado con agua ultrapura (resistividad 18 M Ω cm) obtenida a partir de un dispositivo Milli-Q® de la casa comercial Merck. Las disoluciones tampón electrolíticas empleadas en este trabajo se han preparado a partir de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, 85%), fosfato de sodio monobásico dihidrato (Fluka, 99%), fosfato de sodio dibásico anhidro (Fluka, 99.5%), ácido acético (Sigma-Aldrich, 99.8%) y acetato sódico (Sigma-Aldrich, 99%). Las disoluciones fuertemente ácidas o básicas se han preparado mediante adición de ácido clorhídrico (Merck, 35%) e hidróxido sódico (Fluka, 98%), respectivamente. La fuerza iónica de las disoluciones tampón se ha fijado con cloruro sódico (Fluka, 99.5%).

Los ácidos orgánicos utilizados en la presente Tesis han sido ácido fórmico (Panreac, 85%), ácido acético (Sigma-Aldrich, 99.8%), ácido propiónico (Panreac, 98%) y ácido butírico (Merck, 99%).

Los alcoholes utilizados en la presente Tesis han sido etanol absoluto para análisis (Merck), 1-propanol (Sigma-Aldrich, 99%), 1-butanol (Sigma-Aldrich, 99.9%), 1-pentanol (Sigma-Aldrich, 99%), 1-hexanol anhidro (Sigma-Aldrich, 99%) y 1-heptanol (Sigma-Aldrich, 98%).

2.1.2. Construcción y preparación del electrodo de trabajo

El electrodo de trabajo utilizado para las medidas electroquímicas ha sido un electrodo de fabricación casera de grafito pirolítico altamente orientado (Figura 2.1). El cuerpo del electrodo está formado por una barra de Nylon de 10 cm de largo y 1.5 cm de diámetro, que contiene en su interior una barra de cobre de 1 mm de diámetro, y un conector en la parte superior. La punta del electrodo que contiene el material electrodico está formada por una barra de polímero PEEKTM inerte al medio de 3 cm de largo y 1.5 cm de diámetro. Por un extremo de la punta se mecaniza un orificio circular donde se embute, a presión, un cilindro de 0.5 cm de largo de grafito pirolítico altamente orientado, de modo que expone el borde de los planos de grafito con un área geométrica circular de 0.07 cm². Por el otro extremo de la punta se coloca un vástago de cobre adherido al cilindro de grafito por una resina epoxi conductora de plata.



Figura 2.1. Imagen del electrodo de grafito pirolítico altamente orientado de fabricación casera utilizado en la presente Tesis.

Para la preparación de una superficie electrodica nueva, el electrodo de grafito se pule con papel de lija de agua abrasivo CarbiMetTM Grit 600 (de BUEHLER) en una pulidora de agua Metaserv 2000 Grinder/Polisher de la misma marca a 50 r.p.m. durante unos segundos, se lava vigorosamente con agua Millipore y se seca. La inmovilización de la porfirina sobre la superficie del grafito se lleva a cabo por fisisorción, depositando una gota de 10 μ L de una disolución 10 μ M de hemina en DMSO durante 5 minutos. A continuación, se lava el electrodo con DMSO, etanol al 96% y agua ultrapura.

2.1.3. Medidas electroquímicas

Las medidas se han realizado con un potenciostato Autolab PGSTAT30 Eco Chemie BV, controlado con un ordenador personal equipado con el software “General Purpose Electrochemical System (GPES v. 4.8)” para la técnica de voltametría cíclica y “Frequency Response Analyser (FRA v. 4.8)” para la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, en una celda electroquímica de vidrio convencional (de Metrohm) de tres electrodos, equipada con una entrada de gas y con una camisa para termostatar la disolución electrolítica (Figura 2.2). Los electrodos empleados en las medidas electroquímicas han sido un electrodo de grafito pirolítico, un electrodo de referencia Ag/AgCl/NaCl(sat) y un electrodo auxiliar de barra de platino. Para registrar el pH de la disolución durante las medidas electroquímicas, se incluye en la celda electroquímica un electrodo de vidrio combinado conectado a un pH-metro Orion Star A111.

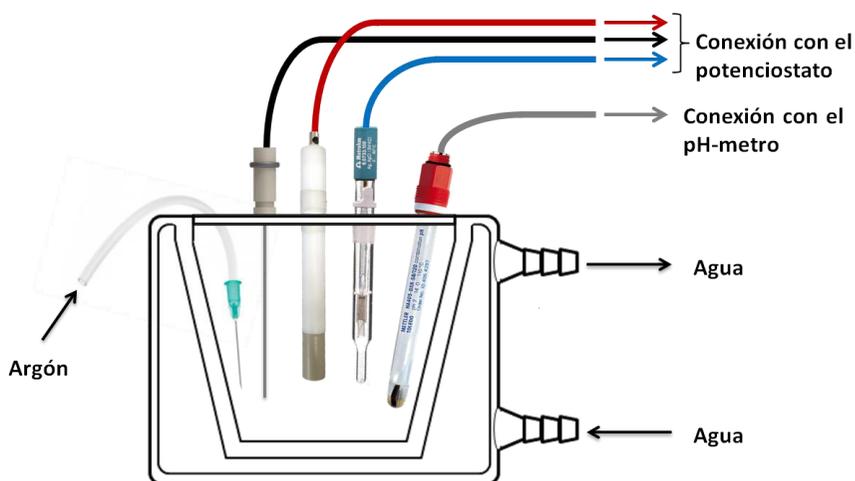


Figura 2.2. Esquema de la celda electroquímica utilizada. Elementos dentro de la celda de izquierda a derecha: capilar de entrada de gas inerte, electrodo auxiliar de barra de platino, electrodo de trabajo de grafito pirolítico, electrodo de referencia Ag/AgCl/NaCl sat y electrodo de vidrio combinado para la medida de pH.

Antes de realizar las medidas electroquímicas, la disolución de trabajo (25 mL) se termostatiza a 25°C y se desoxigena haciendo pasar por ella una corriente de argón durante 30 min.

2.2. Técnicas electroquímicas

2.2.1. Voltametría cíclica (CV)

La voltametría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más usadas para obtener información cuantitativa sobre reacciones electroquímicas. Esto se debe a que proporciona una gran cantidad de información de manera rápida sobre la termodinámica y cinética de la reacción de transferencia electrónica heterogénea y sobre reacciones químicas o procesos de adsorción que se encuentren acoplados. Esta técnica consiste en registrar la variación de la corriente eléctrica al aplicar, al electrodo de trabajo, un barrido lineal de potencial de manera cíclica, desde un valor de potencial (E_i) hasta otro (E_f) a una velocidad de barrido de potencial constante (v) (Figura 2.3(a)). De este modo, el potencial (E) en función del tiempo (t) viene dado por $E = E_i - vt$ en el barrido catódico, y $E = E_i + vt$ en el barrido anódico. La velocidad de barrido se puede variar haciendo que el ciclo se realice en una escala de tiempo mayor o menor. Durante el barrido de potencial, la intensidad de corriente que fluye por el sistema queda registrada en una gráfica que se denomina voltagrama cíclico. La Figura 2.3(b) muestra el voltagrama cíclico obtenido para una pareja redox reversible durante un ciclo de potencial, donde la forma oxidada se encuentra presente inicialmente.

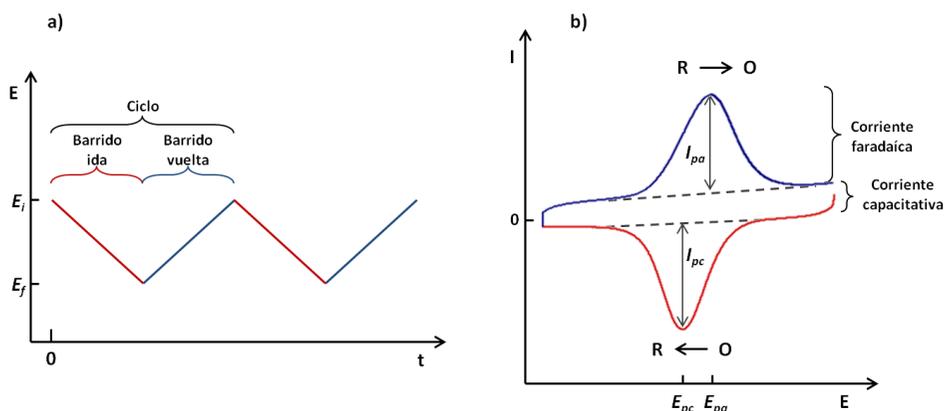


Figura 2.3. (a) Esquema potencial-tiempo para un barrido de potencial en un experimento de voltametría cíclica. (b) Voltagrama cíclico típico para un proceso redox reversible $O + ne^- \rightleftharpoons R$.

El voltograma se caracteriza por una onda voltamétrica formada por un pico catódico (en el barrido de ida) y un pico anódico (en el barrido de vuelta) que corresponde a las reacciones heterogéneas de reducción y oxidación, respectivamente. Además, el voltograma registra dos tipos de corrientes, una de tipo faradaica (pico voltamétrico) la cual involucra el proceso redox de transferencia de carga, y una corriente capacitativa o no faradaica, como consecuencia de la carga acumulada en la doble capa electrificada. De esta forma, para el análisis de los picos voltamétricos se elimina la contribución de la corriente capacitativa mediante una corrección de línea base sobre el pico.

Del análisis de los picos voltamétricos corregidos se obtienen parámetros electroquímicos característicos tales como el potencial de pico catódico y anódico (E_{pc} y E_{pa}), la separación entre ambos (ΔE_p), la anchura a mitad de la altura del pico (FWHM), la carga eléctrica transferida en el proceso electroquímico (Q), obtenida por integración del área del pico voltamétrico, el potencial estándar de la conversión redox de la especie electroactiva ($E_{1/2}$), el cual se obtiene a partir de la semisuma de los potenciales de pico anódico y catódico, y las intensidades de pico catódico y anódico (I_{pc} e I_{pa}).

Todos estos parámetros electroquímicos proporcionan información cualitativa y cuantitativa de la termodinámica y la cinética del proceso electroquímico. Así, para un proceso de transferencia electrónica rápida reversible, la intensidad del pico catódico y anódico son iguales ($I_{pc} = I_{pa}$) y los valores de E_{pc} y E_{pa} no varían con la velocidad de barrido de potencial. Mientras que para un proceso lento, típico de sistemas irreversibles, de forma cualitativa se observan picos voltamétricos de baja intensidad y una gran separación entre los picos catódico y anódico. Por otro lado, se pueden identificar de manera cualitativa otros procesos químicos acoplados a la transferencia electrónica, de forma que la pérdida de asimetría entre los picos anódico y catódico al aumentar la velocidad de barrido son característicos de procesos redox con etapas químicas acopladas, o picos voltamétricos cuyas intensidades aumentan a medida que se realizan los ciclos de barrido de potencial son indicadores de un proceso de adsorción.¹

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado en profundidad la respuesta voltamétrica de la hemina inmovilizada sobre un electrodo de grafito pirolítico. La respuesta voltamétrica para especies electroactivas confinadas en superficies electrónicas muestra unas características diferentes a aquellas obtenidas para especies electroactivas en disolución. Así, la relación entre la intensidad de corriente y el potencial aplicado para una respuesta voltamétrica ideal de una especie redox confinada en la superficie viene dada por la ecuación:²

$$i = \frac{n^2 F^2 \nu A \Gamma}{RT} \frac{\exp\left(\frac{nF}{RT}(E - E^0)\right)}{\left\{1 + \exp\left(\frac{nF}{RT}(E - E^0)\right)\right\}^2} \quad (2.1)$$

donde n es el número de electrones intercambiado por cada molécula en el proceso redox, F (96485 C mol⁻¹) la constante de Faraday, R (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹) la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta, ν la velocidad de barrido, A el área de la superficie del electrodo expuesta a la disolución, E^0 el potencial estándar formal de la conversión redox de la especie electroactiva y Γ la concentración superficial de la especie electroactiva. La Figura 2.4 muestra el voltagrama teórico (corregido de la componente capacitativa) para una especie electroactiva utilizando los siguientes valores de los parámetros característicos del sistema experimental $n = 1$, $E^0 = 0$ V, $\Gamma = 10^{-10}$ mol cm⁻², $T = 298$ K, $A = 0.314$ cm², y $\nu = 0.1$ V s⁻¹. Como se puede observar, el voltagrama ideal para una transferencia electrónica reversible de una especie redox confinada se caracteriza por picos voltamétricos simétricos ($I_{pc} = I_{pa}$) con una separación entre ambos de $\Delta E_p = 0$ y una anchura a mitad de altura del pico FWHM = 90.6/n mV para una temperatura de 25°C.

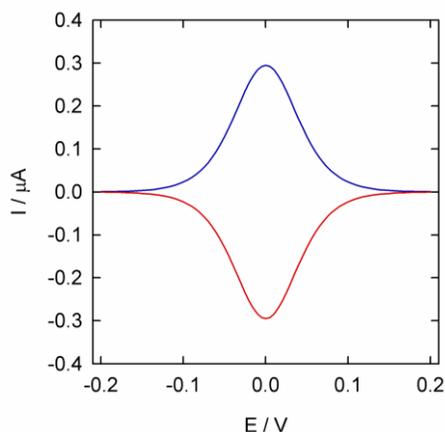


Figura 2.4. Voltograma cíclico teórico para una especie redox confinada en la superficie.

2.2.2. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

En técnicas como la voltametría cíclica, el barrido de potencial lleva al sistema a una situación lejos del equilibrio, lo que se traduce en una respuesta transitoria. Por el contrario, la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, conocida como EIS por sus siglas en inglés, es una técnica que nos permite estudiar un sistema a partir de la respuesta que se obtiene al aplicar sobre éste un pulso de potencial de baja amplitud en corriente alterna de manera periódica hasta llegar al estado estacionario.

Esta técnica presenta ventajas como i) medidas de alta precisión ya que la respuesta debe ser estacionaria, ii) medidas cerca del estado de equilibrio, lo que no requiere un conocimiento detallado del comportamiento de la curva $i-E$ en amplios rangos de sobrepotencial, y iii) medidas en un rango de tiempo amplio. Es por ello que la impedancia nos permite desacoplar el efecto del potencial y de la escala de tiempo, separando de forma más rigurosa las componentes faradaica y no faradaica. El análisis de la respuesta del sistema nos da información sobre la interfase electrodo-disolución, su estructura y las reacciones que tienen lugar en ella. A pesar de ser muy sensible, es una técnica complementaria, ya que para resolver los procesos interfaciales que tienen lugar es necesario el uso de otras técnicas.²

La técnica de impedancia electroquímica (EIS) consiste en la aplicación de una perturbación senoidal de potencial eléctrico de frecuencia variable al sistema estudiado y el registro de la respuesta en corriente dentro de una celda electroquímica. La impedancia es una medida de la oposición que presenta un circuito eléctrico al paso de la corriente cuando se aplica una diferencia de potencial en circuitos de corriente alterna.

Para comprender la teoría que soporta la técnica de EIS, es necesario describir la corriente y el potencial como vectores giratorios, los cuales pueden ser representados por las siguientes expresiones:

$$E(t) = E_{ac} \text{sen}(\omega t) \quad (2.2)$$

$$I(t) = I_{ac} \text{sen}(\omega t + \varphi) \quad (2.3)$$

donde $E(t)$ e $I(t)$ son los valores instantáneos de potencial e intensidad de corriente, E_{ac} e I_{ac} la amplitud máxima y ω es la frecuencia angular ($\omega = 2\pi f$). En el caso de la corriente, φ es el ángulo que separa a los vectores giratorios, dando lugar a señales sinusoidales de misma frecuencia pero fase diferente (Figura 2.5).

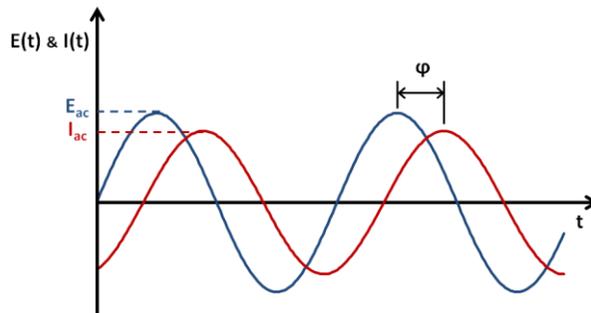


Figura 2.5. Representación gráfica de $E(t)$ e $I(t)$ en función del tiempo.

En este caso, la resistencia del sistema es una magnitud compleja que se denomina impedancia (Z), de tal manera que la relación entre la corriente y el potencial viene dada por una expresión análoga a la ley de ohm en circuitos de corriente continua:

$$E(t) = Z \cdot I(t) \quad (2.4)$$

Por tanto la impedancia vendrá dada por la expresión:

$$Z = Z_{ac} \frac{\text{sen}(\omega t)}{\text{sen}(\omega t + \varphi)} \quad (2.5)$$

donde Z_{ac} es la impedancia máxima.

Para un sistema concreto, la impedancia se expresa como combinación de las impedancias de los elementos que forman el circuito equivalente, ya sea en serie, en paralelo o una combinación de ambos. Si los elementos se encuentran en serie, la corriente que fluye por ambos es la misma y la diferencia de potencial total será la suma de cada una de ellos, por lo que la impedancia total será suma de la impedancia de cada elemento (Figura 2.6(a)). Si por el contrario, los elementos se encuentran en paralelo, la corriente que fluye por el sistema es suma de la corriente de ambos y la diferencia de potencial de cada elemento será la misma que la total, por lo que la impedancia total será el inverso de la suma de los inversos (Figura 2.6(b)).³

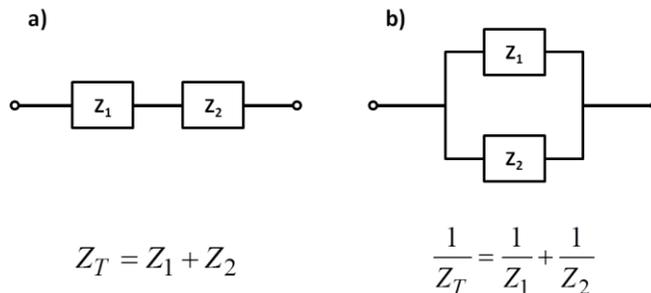


Figura 2.6. (a) Esquema y ecuación de la impedancia para un circuito con dos elementos en serie, y (b) con dos elementos en paralelo.

Al ser la impedancia un número complejo, se puede representar tanto en coordenadas cartesianas como polares. La relación entre la forma polar y la forma cartesiana viene dada por las siguientes expresiones:⁴

$$Z = Z_r + jZ_i = |Z|(\cos \varphi + j\text{sen} \varphi) \quad (2.6)$$

$$|Z| = \sqrt{Z_r^2 + Z_i^2} \quad (2.7)$$

$$\varphi = \arctg\left(\frac{Z_i}{Z_r}\right) \quad (2.8)$$

donde Z_r y Z_i son las componentes real e imaginaria, respectivamente, de la impedancia y j el número imaginario ($j = \sqrt{-1}$).

Existen dos formas de representar gráficamente los resultados de impedancia obtenidos de un ensayo de EIS: i) Diagrama de Nyquist, donde se representa la parte imaginaria de la impedancia multiplicada por -1 (Z_i), frente a la parte real (Z_r) y ii) Diagrama de Bode, donde se representan el logaritmo del módulo de la impedancia ($\log |Z|$) y el desfase (φ) en función del logaritmo de la frecuencia ($\log f$) (Figura 2.7).

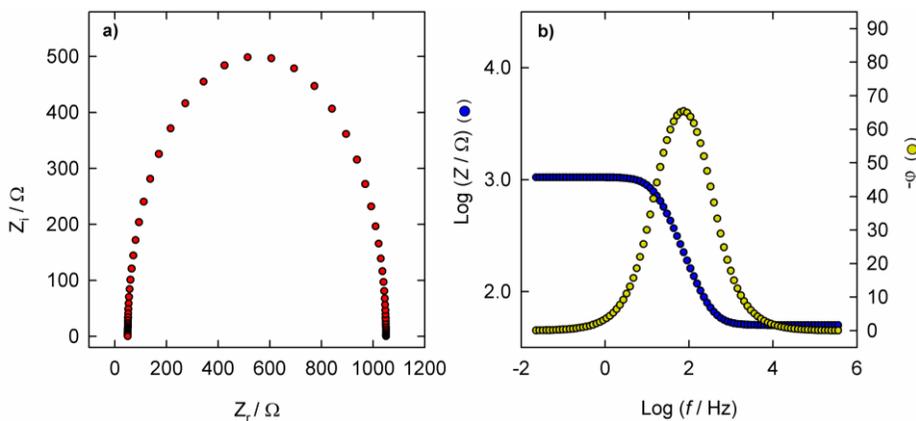


Figura 2.7. (a) Diagramas de Nyquist, y (b) de Bode obtenidos para un circuito R(R'C).

Los espectros obtenidos mediante esta técnica suelen ser analizados por comparación con la respuesta que se obtendría para un circuito eléctrico formado por combinación de distintos componentes, tales como resistencias (R), condensadores (C), inductores (L) o elementos de fase constante (Q). A estos circuitos se les denomina “circuitos eléctricos equivalentes”.⁵ La expresión de la impedancia para los elementos más utilizados en los circuitos equivalentes se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Expresión de la impedancia de los distintos componentes de los circuitos equivalentes.

Elemento	Símbolo	Z
Resistencia		R
Condensador		$\frac{1}{j\omega C}$
Inductor		$j\omega L$
Elemento de fase constante		$\frac{1}{(j\omega)^\alpha Q}$

En sistemas electroquímicos, los modelos para describir la impedancia pueden ser desarrollados a partir de hipótesis basadas en las reacciones químicas, los procesos de transferencia de carga y los fenómenos físicos que afectan a la interfase de nuestro sistema. Por ejemplo, en el caso de una reacción simple en un electrodo uniformemente accesible la impedancia será suma de la impedancia debida a la disolución y de la impedancia interfacial. Para un electrolito, la impedancia es la resistencia del mismo, R_s . En el caso de la interfase, la impedancia será resultado de la doble capa que se comporta como un condensador de carga, C_{dl} , en paralelo con proceso faradaico que tenga lugar, el cual puede ser representado por una resistencia de transferencia de carga, R_{ct} (Figura 2.8). Haciendo uso del formalismo de los circuitos eléctricos, la impedancia quedaría expresada como³:

$$Z = R_s + \frac{1}{j\omega C_{dl} + \frac{1}{R_{ct}}} \quad (2.9)$$

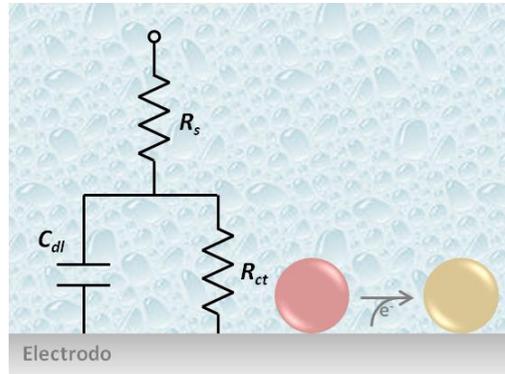


Figura 2.8. Circuito eléctrico equivalente para una reacción simple en un electrodo uniformemente accesible.

El uso de esta técnica en la presente Tesis Doctoral ha permitido evaluar el comportamiento dieléctrico de la interfase grafito-hemina inmovilizada/disolución en diferentes escenarios. Sin embargo, el estudio de la interfase se ha centrado en la zona de potencial donde no tiene lugar el proceso de transferencia electrónica, por lo que el circuito eléctrico equivalente de la Figura 2.8 se reduce en nuestro sistema a un circuito donde la resistencia de la disolución se encuentra en serie con la capacidad de la doble capa eléctrica. Sin embargo, la heterogeneidad que presenta la superficie del electrodo en este sistema da lugar a la presencia de procesos más lentos con una distribución de tiempos de relajación haciendo que el comportamiento de la componente capacitativa se desvíe del esperado para un condensador ideal. Habitualmente, este comportamiento se describe haciendo uso de un elemento de fase constante, Q^6 (Figura 2.9).

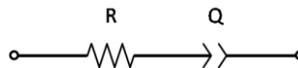


Figura 2.9. Circuito eléctrico equivalente para una resistencia en serie con un elemento de fase constante.

De esta forma, la impedancia para nuestro circuito se describe como:

$$Z = R_s + \frac{1}{(j\omega)^\alpha Q} \quad (2.10)$$

donde Q es el elemento de fase constante que depende de la capacidad de la doble capa y α un parámetro que varía entre 0 y 1 y cuantifica la desviación del elemento de fase constante con respecto a un condensador puro ($\alpha = 1$).

A partir de la expresión de j en forma polar, $j = \cos(\pi/2) + j\text{sen}(\pi/2)$, y la fórmula de Moivre, $(\cos(x) + j\text{sen}(x))^n = \cos(nx) + j\text{sen}(nx)$, podemos separar las componentes real e imaginaria de la impedancia de la expresión (2.10):

$$Z_r = R_s + \frac{\cos\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right)}{\omega^\alpha Q} \quad (2.11)$$

$$Z_i = -\frac{\text{sen}\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right)}{\omega^\alpha Q} \quad (2.12)$$

Sustituyendo estas expresiones en las ecuaciones (2.7) y (2.8), se obtienen las expresiones para el ángulo de fase (φ) y el módulo de la impedancia ($\log |Z|$), los cuales se representan frente al logaritmo de la frecuencia ($\log f$) dando lugar a los diagramas de Bode que describen nuestro sistema.

La Figura 2.10 muestra las predicciones teóricas de la impedancia representada en forma de diagramas de Bode para un circuito equivalente RQ. La variación del ángulo de fase con el logaritmo de la frecuencia presenta forma sigmoïdal, desplazándose la curva hacia valores de frecuencias más bajas cuando los valores de la resistencia y/o la capacidad aumentan. Por otro lado, el logaritmo del módulo de la impedancia sigue una tendencia con el logaritmo de la frecuencia de tipo lineal con un valor límite horizontal, de forma que un aumento de la resistencia desplaza el valor límite hacia valores mayores del logaritmo de $|Z|$ mientras que un aumento de la capacidad desplaza el segmento lineal hacia frecuencias más bajas sin modificar su pendiente.

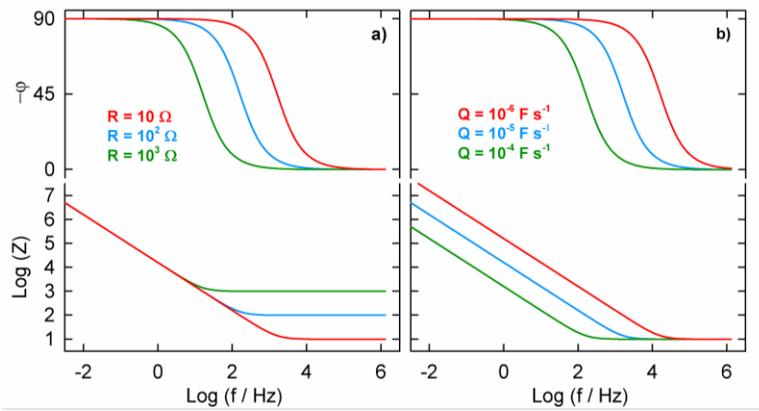


Figura 2.10. (a) Influencia de R_s con $C_{dl} = 10^{-5} \text{ F s}^{-1}$ y (b) C_{dl} con $R_s = 10 \Omega$ sobre la variación del ángulo de fase y el módulo de la impedancia con la frecuencia para las predicciones en el diagrama de Bode para un circuito equivalente RC.

2.3. Bibliografía

- (1) Wang, J. In *Analytical electrochemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp 29–66.
- (2) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. In *Electrochemical methods: fundamentals and applications*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, NY, USA, 2001; pp 368–416.
- (3) Orazem, M. E.; Tribollet, B. In *Electrochemical Impedance Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2008; pp 153–162.
- (4) Macdonald, J. R.; Johnson, W. B. In *Impedance Spectroscopy. Theory, experiment and applications.*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2005; pp 1–26.
- (5) Lasia, A. In *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*; Springer-Verlag: New York, NY, USA, 2014; pp 7–66.
- (6) Jorcin, J.-B.; Orazem, M. E.; Pébère, N.; Tribollet, B. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 1473–1479.

Capítulo 3

**Acoplamiento de Procesos de Transferencia de Carga
Interfacial de Metaloporfirinas de Hierro**

3.7. Bibliografía

- (1) Warren, J. J.; Mayer, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8544–8551.
- (2) Warren, J. J.; Mayer, J. M. *Biochemistry* **2015**, *54*, 1863–1878.
- (3) Hosseini, A.; Barile, C. J.; Devadoss, A.; Eberspacher, T. A.; Decreau, R. A.; Collman, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11100–11102.
- (4) De Groot, M. T.; Merkx, M.; Wonders, A. H.; Koper, M. T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7579–7586.
- (5) Costentin, C.; Dridi, H.; Savéant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13535–13544.
- (6) Costentin, C.; Robert, M.; Savéant, J. M. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2996–3006.
- (7) Amreen, K.; Senthil Kumar, A.; Mani, V.; Huang, S.-T. *ACS Omega* **2018**, *3*, 5435–5444.
- (8) Das, D. K.; Medhi, O. K. *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *70*, 83–90.
- (9) Cerda, J. F.; Malloy, M. C.; Werkheiser, B. O.; Stockhausen, A. T.; Gallagher, M. F.; Lawler, A. C. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 182–188.
- (10) Zhang, L.; Kepp, K. P.; Ulstrup, J.; Zhang, J. *Langmuir* **2018**, *34*, 3610–3618.
- (11) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Cowan, J. A.; Ranieri, A.; Sola, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5315–5324.
- (12) Zheng, Z.; Gunner, M. R. *Proteins* **2009**, *75*, 719–734.
- (13) Hosseinzadeh, P.; Lu, Y. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2016**, *1857*, 557–581.
- (14) Nye, D. B.; Preimesberger, M. R.; Majumdar, A.; Lecomte, J. T. J. *Biochemistry* **2018**, *57*, 631–644.

- (15) Alvarez-Paggi, D.; Hannibal, L.; Castro, M. A.; Oviedo-Rouco, S.; Demicheli, V.; Tórtora, V.; Tomasina, F.; Radi, R.; Murgida, D. H.; Demicheli, V.; et al. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 13382–13460.
- (16) De Groot, M. T.; Koper, M. T. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 1023–1031.
- (17) Domenech-Carbo, A.; MacIuk, A.; Figadere, B.; Poupon, E.; Cebrian-Torrejon, G.; Doménech-Carbó, A.; MacIuk, A.; Figadère, B.; Poupon, E.; Cebrián-Torrejón, G.; et al. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4014–4021.
- (18) Ksenzhek, O. S.; Petrova, S. A. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1978**, *5*, 661–670.
- (19) Shigehara, K.; Anson, F. C. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2776–2783.
- (20) Bianco, P.; Haladjian, J.; Draoui, K. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *279*, 305–314.
- (21) Pilloud, D. L.; Chen, X.; Dutton, P. L.; Moser, C. C. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2868–2877.
- (22) Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K. *Nature* **2000**, *404*, 307–310.
- (23) Egan, T. J. In *On Biomimetics*; Pramatorova, L., Ed.; InTech: Rijeka, 2011; pp 373–394.
- (24) De Villiers, K. A.; Egan, T. J. In *Handbook of Porphyrin Science*; Ferreira, G. C., Kadish, K. M., Smith, K. M., Guilard, R., Eds.; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, 2014; pp 211–254.
- (25) Durrant, M. C. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 9754–9765.
- (26) Kuter, D.; Mohunlal, R.; Fitzroy, S.-M.; Asher, C.; Smith, P. J.; Egan, T. J.; de Villiers, K. A. *CrystEngComm* **2016**, *18*, 5177–5187.
- (27) Galal-Gorchev, H.; Stumm, W. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1963**, *25*, 567–574.
-

- (28) Al-Sogair, F.; Marafie, H. M.; Shuaib, N. M.; Youngo, H. Ben; El-Ezaby, M. S. *J. Coord. Chem.* **2002**, *55*, 1097–1109.
- (29) Chen, Y.; Wang, F.-B.; Guo, L.-R.; Zheng, L.-M.; Xia, X.-H. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 3746–3750.
- (30) De Villiers, K. A.; Kaschula, C. H.; Egan, T. J.; Marques, H. M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 101–117.
- (31) Davies, T. H. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1973**, *329*, 108–117.
- (32) Mukherjee, S.; Bandyopadhyay, S.; Chatterjee, S.; Dey, A. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12304–12307.
- (33) Hirst, J.; Armstrong, F. A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5062–5071.
- (34) Kolpin, C. F.; Swofford, H. S. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 916–920.
- (35) Tao, N. J.; Cardenas, G.; Cunha, F.; Shi, Z. *Langmuir* **1995**, *11*, 4445–4448.
- (36) Laviron, E. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101*, 19–28.
- (37) Rumble, J. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data*; CRC Press, 2019.
- (38) Asher, C.; De Villiers, K. A.; Egan, T. J. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 7994–8003.

Capítulo 4

**Interacción de Metaloporfirinas de Hierro con Ácidos
Orgánicos: Implicaciones en la Formación de la
 β -hematina**

4.5. Bibliografía

- (1) Pisciotta, J. M.; Sullivan, D. *Parasitol. Int.* **2008**, *57*, 89–96.
- (2) De Villiers, K. A.; Egan, T. J. In *Handbook of Porphyrin Science*; Ferreira, G. C., Kadish, K. M., Smith, K. M., Guilard, R., Eds.; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, 2014; pp 211–254.
- (3) Coronado, L. M.; Nadovich, C. T.; Spadafora, C. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2032–2041.
- (4) Slater, A. F. G.; Swiggard, W. J.; Orton, B. R.; Flitter, W. D.; Goldberg, D. E.; Cerami, A.; Henderson, G. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 325–329.
- (5) Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K. *Nature* **2000**, *404*, 307–310.
- (6) Oliveira, M. F.; Kycia, S. W.; Gomez, A.; Kosar, A. J.; Bohle, D. S.; Hempelmann, E.; Menezes, D.; Vannier-Santos, M. A.; Oliveira, P. L.; Ferreira, S. T. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6010–6016.
- (7) Klonis, N.; Dilanian, R.; Hanssen, E.; Darmanin, C.; Streltsov, V.; Deed, S.; Quiney, H.; Tilley, L. *Biochemistry* **2010**, *49*, 6804–6811.
- (8) Gildenhuis, J.; Roex, T.; Egan, T. J.; de Villiers, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1037–1047.
- (9) Egan, T. J. In *On Biomimetics*; Pramatarova, L., Ed.; InTech: Rijeka, 2011; pp 373–394.
- (10) Egan, T. J.; Mavuso, W. W.; Ncokazi, K. K. *Biochemistry* **2001**, *40*, 204–213.
- (11) Egan, T. J.; Tshivhase, M. G. *Dalton Trans.* **2006**, *42*, 5024–5032.
- (12) Egan, T. J.; Chen, J. Y. J.; de Villiers, K. A.; Mabothe, T. E.; Naidoo, K. J.; Ncokazi, K. K.; Langford, S. J.; McNaughton, D.; Pandiancherri, S.; Wood, B. R.

- FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5105–5110.
- (13) Hoang, A. N.; Ncokazi, K. K.; De Villiers, K. A.; Wright, D. W.; Egan, T. J. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1235–1244.
- (14) Hoang, A. N.; Sandlin, R. D.; Omar, A.; Egan, T. J.; Wright, D. W. *Biochemistry* **2010**, *49*, 10107–10116.
- (15) Blauer, G.; Akkawi, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *398*, 7–11.
- (16) Huy, N. T.; Maeda, A.; Uyen, D. T.; Trang, D. T. X.; Sasai, M.; Shiono, T.; Oida, T.; Harada, S.; Kamei, K. *Acta Trop.* **2007**, *101*, 130–138.
- (17) Stiebler, R.; Hoang, A. N.; Egan, T. J.; Wright, D. W.; Oliveira, M. F. *PLoS One* **2010**, *5*, 1–9.
- (18) Hayward, R.; Saliba, K. J.; Kirk, K. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 1016–1025.
- (19) Navarro, M.; Castro, W.; Biot, C. *Organometallics* **2012**, *31*, 5715–5727.
- (20) Gorka, A. P.; De Dios, A.; Roepe, P. D. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5231–5246.
- (21) Kuter, D.; Chibale, K.; Egan, T. J. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 684–692.
- (22) Olafson, K. N.; Nguyen, T. Q.; Vekilov, P. G.; Rimer, J. D. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 13638–13647.
- (23) Olafson, K. N.; Nguyen, T. Q.; Rimer, J. D.; Vekilov, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 7531–7536.
- (24) Delpe Acharige, A. M. D. S.; Brennan, M. P. C.; Lauder, K.; McMahon, F.; Odebunmi, A. O.; Durrant, M. C. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 15364–15381.
- (25) Doménech-Carbó, A.; MacIuk, A.; Figadère, B.; Poupon, E.; Cebrián-Torrejón, G. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4014–4021.
- (26) Wondimagegn, T.; Rauk, A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 569–579.
-

- (27) Wondimagegn, T.; Rauk, A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10301–10310.
- (28) Durrant, M. C. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 9754–9765.
- (29) Da Silva, A. H.; Miranda, E. A. *J. Chem. Eng. Data* **2013**, *58*, 1454–1463.
- (30) Joshi, K. M.; Bapat, M. R.; Dhawale, S. W. *Electrochim. Acta* **1970**, *15*, 1519–1525.
- (31) Rumble, J. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-Reference Book of Chemical and Physical Data*; CRC Press, 2019.
- (32) Tandford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; John Wiley & Sons Inc: New York, NY, 1973.
- (33) Wängnerud, P.; Jönsson, B. *Langmuir* **1994**, *10*, 3268–3278.
- (34) Rifaie-Graham, O.; Hua, X.; Bruns, N.; Balog, S. *Small* **2018**, *14*, 1–7.
- (35) Hieringer, W.; Flechtner, K.; Kretschmann, A.; Seufert, K.; Auwärter, W.; Barth, J. V; Görling, A.; Steinrück, H. P.; Gottfried, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6206–6222.
- (36) Vekilov, P. G.; Rimer, J. D.; Olafson, K. N.; Ketchum, M. A. *CrystEngComm* **2015**, *17*, 7790–7800.

Capítulo 5

**Efecto de la Hidrofobicidad en las Propiedades Redox de
Metaloporfirinas de Hierro**

5.7. Bibliografía

- (1) Gilson, M. K.; Honig, B. H. *Biopolymers* **1986**, *25*, 2097–2119.
 - (2) Simonson, T.; Brooks, C. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8452–8458.
 - (3) Warshel, A.; Dryga, A. *Proteins* **2011**, *79*, 3469–3484.
 - (4) Kassner, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 2263–2267.
 - (5) Benson, D. R.; Hart, B. R.; Zhu, X.; Doughty, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8502–8510.
 - (6) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2239–2314.
 - (7) Shifman, J. M.; Gibney, B. R.; Sharp, R. E.; Dutton, P. L. *Biochemistry* **2000**, *39*, 14813–14821.
 - (8) Gibney, B. R.; Isogai, Y.; Rabanal, F.; Reddy, K. S.; Grosset, A. M.; Moser, C. C.; Dutton, P. L. *Biochemistry* **2000**, *39*, 11041–11049.
 - (9) Hosseinzadeh, P.; Yu, Y.; Petrik, I.; Tian, S.; Lu, Y.; Liu, J.; Bhagi, A.; Chakraborty, S. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4366–4469.
 - (10) Hosseinzadeh, P.; Lu, Y. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2016**, *1857*, 557-581.
 - (11) Stellwagen, E. *Nature* **1978**, *275*, 73–74.
 - (12) Churg, A. K.; Warshel, A. *Biochemistry* **1986**, *25*, 1675–1681.
 - (13) Rivera, M.; Seetharaman, R.; Girdhar, D.; Wirtz, M.; Zhang, X.; Wang, X.; White, S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 1485–1494.
 - (14) Fantuzzi, A.; Sadeghi, S.; Valetti, F.; Rossi, G. L.; Gilardi, G. *Biochemistry* **2002**, *41*, 8718–8724.
 - (15) Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Cowan, J. A.; Ranieri, A.; Sola, M. *J. Am. Chem. Soc.*
-

- 2002**, *124*, 5315–5324.
- (16) Paoli, M.; Marles-Wright, J.; Smith, A. *DNA Cell Biol.* **2002**, *21*, 271–280.
- (17) Tezcan, F. A.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13383–13388.
- (18) Kassner, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2674–2677.
- (19) Zheng, Z.; Gunner, M. R. *Proteins* **2009**, *75*, 719–734.
- (20) Bortolotti, C. A.; Amadei, A.; Aschi, M.; Borsari, M.; Corni, S.; Sola, M.; Daidone, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13670–13678.
- (21) O’Donoghue, D.; Magner, E. *Chem. Commun.* **2003**, *3*, 438–439.
- (22) Grealis, C.; Magner, E. *Langmuir* **2003**, *19*, 1282–1286.
- (23) Moore, A. N. J.; Katz, E.; Willner, I. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *417*, 189–192.
- (24) O’Reilly, N. J.; Magner, E. *Langmuir* **2005**, *21*, 1009–1014.
- (25) Crilly, S.; Magner, E. *Chem. Commun.* **2009**, *5*, 535–537.
- (26) Tom, J.; Jakubec, P. J.; Andreas, H. A. *Sens. Actuators B: Chem.* **2018**, *272*, 425–432.
- (27) Tom, J.; Jakubec, P. J.; Andreas, H. A. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 5764–5772.
- (28) Nam, W.; Oh, S. Y.; Sun, Y. J.; Kim, J.; Kim, W. K.; Woo, S. K.; Shin, W. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7903–7906.
- (29) Stephenson, N. A.; Bell, A. T. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2007**, *275*, 54–62.
- (30) Brusova, Z.; Magner, E. *Bioelectrochemistry* **2009**, *76*, 63–69.
- (31) De Villiers, K. A.; Egan, T. J. In *Handbook of Porphyrin Science*; Ferreira, G. C., Kadish, K. M., Smith, K. M., Guilard, R., Eds.; World Scientific Publishing Co.
-

- Pte. Ltd.: Singapore, 2014; pp 211–254.
- (32) Egan, T. J. In *On Biomimetics*; Pramatorova, L., Ed.; InTech: Rijeka, 2011; pp 373–394.
- (33) Olafson, K. N.; Ketchum, M. A.; Rimer, J. D.; Vekilov, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 4946–4951.
- (34) Ketchum, M. A.; Olafson, K. N.; Petrova, E. V.; Rimer, J. D.; Vekilov, P. G. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 121911/1-121911/9.
- (35) Olafson, K. N.; Rimer, J. D.; Vekilov, P. G. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 2123–2127.
- (36) Foresti, M. L.; Innocenti, M.; Guidelli, R. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *376*, 85–95.
- (37) Sottomayor, M. J.; Coelho, V.; Ferreira, A. P.; Silva, F.; Baturina, O. A.; Safonov, V. A.; Damaskin, B. B. *Electrochim. Acta* **1999**, *45*, 775–787.
- (38) Moncelli, M. R.; Foresti, M. L.; Guidelli, R. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *295*, 225–238.
- (39) Tandford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; John Wiley & Sons Inc: New York, NY, NY, 1973.
- (40) Wängnerud, P.; Jönsson, B. *Langmuir* **1994**, *10*, 3268–3278.
- (41) Sadkowsky, A. *J. Electroanal. Chem.* **1986**, *208*, 69–76.

CONCLUSIONES GENERALES

- Se ha puesto de manifiesto que las formas ionizadas de los tampones frecuentemente utilizados en los estudios del acoplamiento de transferencias electrónicas y protónicas, estabilizan el estado oxidado de las porfirinas de hierro mediante el desplazamiento de la molécula de agua que coordina al centro metálico, siempre y cuando ésta no se encuentre en su estado ionizado.
- Se ha desarrollado una estrategia para cuantificar la constante de equilibrio intrínseca de la asociación de las porfirinas de hierro con las formas aniónicas de ligandos ionizables, poniendo de manifiesto que la asociación de la hemina con el acetato es mayor que con el dihidrógenofosfato. La sustitución de los residuos β de la hemina (propiónicos, vinilos y metilos) por grupos etilo disminuye la acidez de la molécula de agua coordinada y posibilita su asociación con el monohidrógenofosfato.
- La interacción de las porfirinas de hierro con los carboxilatos orgánicos lineales aumenta con la longitud de su cadena hidrocarbonada, poniendo de manifiesto que la asociación Fe(III)-carboxilato se ve reforzada por la interacción de la cadena alquílica con el anillo de porfirina. La contribución de los grupos individuales de los ácidos carboxílicos sigue la secuencia metileno < metilo << carboxilato.
- Se ha comparado la constante de equilibrio de formación del dímero μ -propionato de la hemina con la constante de equilibrio de asociación Fe(III)-propionato, poniéndose de manifiesto que el bajo contenido de agua de las interfases acuo-orgánicas impulsa la formación de la β -hematina.
- Se ha puesto de manifiesto la existencia de dos poblaciones de alcoholes alifáticos adsorbidas sobre un electrodo de grafito modificado con porfirinas de hierro, que difieren en su energía de adsorción e interacción con la metaloporfirina. Una población está fuertemente adsorbida sobre la superficie de grafito y no modifica las propiedades redox de la porfirina de hierro, mientras que la otra población está

adsorbida (menos fuertemente) sobre la porfirina de hierro, y estabiliza su forma reducida.

CONCLUSIONS

- The ionized forms of the commonly used acetate and phosphate buffers stabilize the ferric state of the iron porphyrins by displacing the iron-bound water molecule. But, this ligand exchange event is precluded in the ionized state of the water molecule.
- A strategy has been developed to quantify the intrinsic binding equilibrium constant of iron porphyrins with ionizable ligands, which shows that hemin has a greater affinity for acetate than for dihydrogen phosphate. Replacement of the propionic acid residues of hemin by ethyl groups reduces the acidity of the iron-bound water molecule and enables its binding with the monohydrogen phosphate dianion.
- The interaction of iron porphyrins with organic carboxylic acids increases with the hydrocarbon chain length of the acid, revealing that the Fe(III)-carboxylate binding is reinforced by the interaction of the alkyl chain with the porphyrin ring. Group contributions to the binding free energy follow the sequence: methylene < methyl << carboxylate.
- Comparison of the dimerization equilibrium constant for the formation of the cyclic μ -propionate hemin dimer with that of the Fe(III)-propionate binding reveals that a low water content drives the efficient formation of β -hemozoin in physiological media.
- It has been shown the existence of two adsorbed populations of *n*-hexanol at the metalloporphyrin-modified graphite electrode that differ in their adsorption free energy and interaction with the metalloporphyrin. The more strongly adsorbed population does not affect the redox potential of the iron porphyrins and corresponds to *n*-hexanol molecules adsorbed onto the graphite surface, whereas the less strongly adsorbed molecules stabilizes the reduced form of the iron porphyrins and corresponds to *n*-hexanol molecules adsorbed onto the metalloporphyrin molecule.

