



SERVICIO DE DOCTORADO

PLAN DE INVESTIGACIÓN

REGULADO POR R.D. 99/2011 (NORMATIVA REGULADA POR ACUERDO 7.2/CG 17-6-11)

CURSO 2014-2015

DOCTORANDO

NIF/NIE/PASAPORTE	NOMBRE	APELLIDOS
30.225.208-B	Inmaculada	Márquez Escudero
PROGRAMA DE DOCTORADO DONDE ESTA MATRICULADO		
Electroquímica. Ciencia y Tecnología.		
DEPARTAMENTO / CENTRO / INSTITUTO RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO		
Departamento de Química Física		
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN EN LA QUE ESTÁ MATRICULADO		
Propiedades Electroquímicas de Electroodos Modificados por Moléculas Orgánicas o de Interés Biológico		
TIPO ESTUDIANTE	MODALIDAD DE PERMANENCIA	
☒ NUEVO INGRESO ☐ CONTINUACION DE ESTUDIOS	☒ TIEMPO COMPLETO ☐ TIEMPO PARCIAL	
TÍTULO DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN		
Acoplamiento de Procesos de Transferencia de Carga y Reorganización Molecular en Sistemas Biomiméticos de Electroodos Proteicos		

DIRECTORES DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE Y APELLIDOS	DNI	UNIVERSIDAD / CENTRO / DEPARTAMENTO
Juan José Calvente Pacheco	25.576.139-R	Univ. de Sevilla / Ftad. de Química / Dpto. de Química Física

Se acompaña:

☒ Plan de investigación

☐ Informe de aceptación de la Comisión Académica del programa, tutor y director.

☐ Informe favorable del Comité Ético de Investigación de la Universidad de Sevilla, en el ámbito de los planes de investigación que incidan en materias previstas en el Reglamento General de Investigación. No será preciso dicho informe si éste hubiese sido emitido previamente para el proyecto de investigación en el que se inscribe la tesis. (<http://investigacion.us.es/area-investigacion/comite-etico>)

☐ Currículum vitae del director de la tesis y, en su caso, de los codirectores cuando no sean miembros de la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 22 de Junio de 2015

Fdo.: Inmaculada Márquez Escudero
(Firma del interesado)

SR. COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO



SERVICIO DE DOCTORADO

PLAN DE INVESTIGACIÓN

REGULADO POR R.D. 99/2011 (NORMATIVA REGULADA POR ACUERDO 7.2/CG 17-6-11)

CURSO 2014-2015

TÍTULO

Acoplamiento de Procesos de Transferencia de Carga y Reorganización Molecular en Sistemas Biomiméticos de Electrodo Proteico.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS (Máx. 500 palabras)

El estudio de las transferencias electrónicas entre proteínas y electrodos es importante para el desarrollo de campos como la bioenergética, la electrónica molecular, los biosensores electroquímicos y las biocélulas de combustible.^{1,2}

Actualmente, las plataformas más populares para el estudio de la transferencia electrónica interfacial de proteínas son las monocapas autoensambladas de tioles depositadas sobre electrodos de oro (SAMs). Éstas permiten inmovilizar a la proteína sin alterar significativamente su estructura nativa, y modular variables relevantes tales como: la distancia de separación entre el electrodo y la proteína, la hidrofobicidad de la zona de anclaje de la proteína y la conductividad eléctrica del medio de separación.

A pesar de los numerosos trabajos publicados en este campo, todavía existen algunas observaciones experimentales cuyo origen microscópico se desconoce, y cuya interpretación requiere un estudio más detallado. Entre dichas observaciones se encuentran:

1. Respuesta voltamétrica no ideal, que se caracteriza por:³

- (i) Una disminución de la carga redox faradaica con el aumento de la velocidad de barrido de potencial, que refleja una electrorreactividad parcial.
- (ii) Un ensanchamiento de la onda voltamétrica en condiciones de equilibrio por encima del valor esperado para una población de centros redox aislados.
- (iii) Una separación constante entre los potenciales de pico anódico y catódico a bajas velocidades de barrido. Esta separación indicaría que el proceso está controlado cinéticamente, pero su independencia con la velocidad de barrido es característica de un proceso rápido, que opera en condiciones de equilibrio. A este comportamiento contradictorio se le denomina *cuasi-reversibilidad inusual*.
- (iv) Un desplazamiento asimétrico de los potenciales de pico anódico y catódico con la velocidad de barrido (asimetría cinética), que se desvía del comportamiento esperado para una transferencia electrónica sencilla.

2. Independencia de la constante de velocidad de la transferencia electrónica interfacial de la proteína con la distancia de separación a la superficie del electrodo para monocapas delgadas, que se desvía de la dependencia exponencial observada para monocapas gruesas.⁴⁻⁶ Este cambio de régimen cinético se ha interpretado considerando que la transferencia electrónica de la proteína en monocapas delgadas está controlada por factores friccionales del medio⁴ o por cambios conformacionales de la proteína.⁶ Sin embargo, actualmente no existen evidencias definitivas que permitan distinguir cuál de las dos posibilidades opera.⁵

Dentro de este marco contextual, el objetivo general de este proyecto de tesis es identificar y cuantificar los factores que provocan que el intercambio electrónico proteína-electrodo se desvíe del comportamiento esperado para una población homogénea de centros redox aislados. Basados en los resultados publicados en la bibliografía, suponemos que estas desviaciones pueden estar provocadas por: (i) una reorganización molecular de la película adsorbida inducida por el campo eléctrico, (ii) la penalización electrostática originada por una compensación ineficiente, o lenta, de la carga interfacial que se desarrolla durante la conversión redox, y (iii) la presencia de etapas químicas adicionales.

Para resolver esta problemática nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- i) Estudiar la posible reorganización molecular de las monocapas autoensambladas de tioles, inducida por el potencial, en presencia y ausencia de sondas redox inmovilizadas, que mimetizan a las proteínas azules de cobre.
- ii) Evaluar el impacto de los factores electrostáticos y del acoplamiento de transferencias protónicas en la transferencia electrónica de dichas sondas redox, utilizando monocapas autoensambladas ionizables.
- iii) Identificar y cuantificar los factores que provocan el cambio de régimen cinético de la transferencia electrónica de una proteína azul de cobre, al aumentar su acoplamiento electrónico con el electrodo, utilizando la temperatura como variable impulsora de dicho cambio.

Bibliografía

- (1) Leger, C.; Bertrand, P. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2379-2438.
- (2) Noell, T.; Noell, G. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3564-3576.
- (3) Waldeck, D. H.; Khoshtariya, D. E. In *Modern Aspects of Electrochemistry*; Noam, E., Ed.; Springer: New York; 2011, Vol. 52; pp 105-238.
- (4) Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Shushanyan, M.; Davis, K. L.; Waldeck, D. H.; van Eldik, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 2757-2762, S2757/1-S2757/5.
- (5) Olloqui-Sariego, J. L.; Moreno-Beltrán, B.; Díaz-Quintana, A.; De la Rosa, M. A.; Calvente, J. J.; Andreu, R. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 910-914.
- (6) Alvarez-Paggi, D.; Martin, D. F.; De Biase, P. M.; Hildebrandt, P.; Marti, M. A.; Murgida, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5769-5778.

METODOLOGÍA (Máx. 500 palabras)

Para alcanzar los objetivos mencionados anteriormente, se pretende llevar a cabo las siguientes actividades:

1. Conversión redox de cobre en monocapas autoensambladas neutras.

La utilización de sondas de cobre inmovilizadas sobre monocapas autoensambladas de tioles, como sistema biomimético de las proteínas azules de cobre, requiere abordar previamente dos cuestiones que no están resueltas en la bibliografía: i) la naturaleza mono- ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$) o bi-electrónica ($\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0$) de su conversión redox y (b) la localización espacial de su forma reducida en la interfase electrodo/monocapa/disolución.

Para conseguir estos objetivos, en un primer estudio se van a utilizar monocapas autoensambladas neutras, sobre las cuales se depositará cobre en condiciones de circuito abierto o bajo control potencioestático. Para explorar la accesibilidad del cobre a la superficie del electrodo, se variará la naturaleza del grupo terminal de la monocapa ($-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$) y la longitud de la cadena hidrocarbonada (típicamente entre 2 y 11 metilenos), y se compararán estos resultados con los obtenidos en ausencia de monocapa.

2. Estudio del impacto de los factores electrostáticos.

Para evaluar la influencia de los efectos electrostáticos en la conversión redox del cobre, se llevará a cabo un estudio empleando monocapas autoensambladas aniónicas, sobre las cuales se prevé una mayor adsorción de Cu^{2+} . Concretamente, se utilizarán SAMs con grupo terminal sulfonato ($-\text{SO}_3^-$), que se encuentra totalmente ionizado en medio acuoso. Para regular los factores electrostáticos se variará la composición y la fuerza iónica de la disolución, y se utilizarán monocapas mixtas de mercaptoalcanosulfonatos con alguno de los tioles neutros utilizados en la actividad anterior.

3. Estudio de la influencia de transferencias protónicas interfaciales en la transferencia electrónica del cobre.

Para evaluar la influencia que ejercen las transferencias protónicas en las transferencias electrónicas interfaciales, se llevará a cabo un estudio de la conversión redox del cobre en presencia de SAMs funcionalizadas con grupos carboxílicos y aminos, cuyo estado de ionización se variará modificando el pH y la fuerza iónica de la disolución. Para cuantificar la interacción del cobre con estos grupos ionizables, se llevarán a cabo experimentos en presencia de

caciones competidores con la sonda redox. Complementariamente, para interpretar estos resultados, se realizará también un estudio de dicha interacción en fase homogénea empleando la técnica de espectroscopía de absorción ultravioleta-visible.

Para evaluar la posible permeación de la sonda redox a través de estas monocapas, se realizarán experimentos variando la longitud de la cadena hidrocarbonada, y se utilizarán monocapas mixtas de tioles ionizables y neutros.

4. Estudio de la transferencia electrónica interfacial de la plastocianina inmovilizada sobre SAMs.

Como última actividad, se pretende llevar a cabo un estudio de la transferencia electrónica interfacial de una proteína azul de cobre inmovilizada sobre distintas SAMs, aprovechando la información obtenida previamente con el sistema biomimético para identificar y cuantificar el origen de la no idealidad de su respuesta electroquímica. Se prestará especial atención al cambio de régimen cinético que se produce cuando aumenta su acoplamiento electrónico con el electrodo.

Para conseguir este objetivo se utilizará una variedad termófila de la proteína plastocianina, que preserva su actividad redox hasta 90 °C. Ello permitirá utilizar la temperatura como variable impulsora del cambio de régimen cinético, que habitualmente se observa al disminuir la distancia de separación proteína-electrodo.

Para inmovilizar la proteína sobre las SAMs se utilizarán distintos protocolos de inmovilización, tales como: la fisisorción hidrofóbica o electrostática, y la quimisorción, mediante la formación de un enlace amido entre grupos amino y carboxílicos de la proteína y de la monocapa. Con el protocolo más eficiente, se llevarán a cabo experimentos voltamétricos variando la temperatura, el espesor de la monocapa y la viscosidad de la disolución. Con ello se pretende discriminar si la cinética de la transferencia electrónica en condiciones de alto acoplamiento electrónico proteína-electrodo está controlada por efectos friccionales del medio o cambios conformacionales de la proteína.

5. Revisiones bibliográficas.

De forma paralela a la realización de las actividades descritas anteriormente, se llevarán a cabo revisiones bibliográficas de la temática de trabajo. Dichas revisiones se expondrán a lo largo de cada anualidad, y servirán para contextualizar los resultados que se vayan obteniendo.

6. Redacción de la memoria de la Tesis Doctoral.

La última actividad programada en este proyecto de tesis doctoral es la redacción de la memoria, la cual implicará una racionalización y discusión crítica de los resultados obtenidos, siguiendo los objetivos planteados en este proyecto de tesis.

MEDIOS (Máx. 500 palabras)

Para la realización de las actividades anteriormente descritas, se utilizarán las técnicas de voltametría cíclica, espectroscopía de impedancia electroquímica, y espectroscopía de absorción ultravioleta-visible.

Con la *voltametría cíclica* se pretende establecer el mecanismo general del proceso electródico, y cuantificar:

- (i) La cantidad de especie electroactiva, y su posible dependencia con la escala de tiempo experimental.
- (ii) Los parámetros termodinámicos y cinéticos de la etapa de transferencia electrónica: potencial estándar formal, constante de velocidad estándar, coeficiente de transferencia (en el formalismo de Butler-Volmer) y, si el sistema lo permite, la energía de reorganización (con el formalismo de Marcus-Hush).
- (iii) Los parámetros asociados con los factores que se van a introducir para interpretar la desviación de la respuesta electroquímica con respecto al comportamiento esperado para una población de centros redox aislados.

Con la *espectroscopía de impedancia* se pretende un doble objetivo: i) evaluar el comportamiento dieléctrico de la monocapas autoensambladas cuando operan bajo control potencioestático, con el fin de detectar posibles

reorganizaciones moleculares inducidas por el potencial, y ii) desacoplar el efecto del potencial y de la escala de tiempo en la dinámica del proceso electródico, aprovechando en ambos casos la separación más rigurosa entre las componentes faradaica y no faradaica, que permite llevar a cabo la impedancia. Con ello pretendemos evitar una de las limitaciones de la voltametría cíclica, que requiere explicitar la posible dependencia de los parámetros con el potencial a la hora de su cuantificación a partir de la respuesta experimental.

Para la interpretación de los voltagramas y espectros de impedancia experimentales, y la cuantificación de los correspondientes parámetros fisicoquímico a partir de ellos, se utilizarán programas de *simulación digital* desarrollados en el grupo de investigación.

Con la *espectroscopía de absorción ultravioleta-visible* se pretende estudiar la interacción, en fase homogénea, de las sondas redox de cobre con moléculas, tioladas y notioladas, que contienen los grupos terminales de las SAMs utilizadas. Esta información complementaria nos ayudará a la interpretación y cuantificación de la respuesta electroquímica de dichas sondas en el estado inmovilizado.

PLANIFICACIÓN TEMPORAL (Máx. 500 palabras)

En el siguiente cronograma se detalla la secuencia temporal y duración de las actividades que se van a realizar:

Actividad	1ª Anualidad		2ª Anualidad		3ª Anualidad	
	1 ^{er} Sem.	2º Sem.	1 ^{er} Sem.	2º Sem.	1 ^{er} Sem.	2º Sem.
Conversión redox de cobre en SAMs neutras						
Estudio del impacto de los factores electrostáticos						
Estudio de la influencia de transferencias protónicas interfaciales en la transferencia electrónica del cobre						
Estudio de la transferencia electrónica interfacial de la plastocianina inmovilizada sobre SAMs						
Exposición de revisión bibliográfica						
Redacción de la memoria						