



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**“EFECTO DE LOS MEDIADORES M(II)L₃ Y
M(III)L₃ SOBRE LAS INTERACCIONES EN
LA GLUCOSA OXIDASA DE *Aspergillus niger*”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUIMICO
FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA
ARTURO ALEJANDRO AGUILAR RUIZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. ÁNGEL GABRIEL MENDOZA
MARTÍNEZ**

**ASESOR DE TESIS
DR. LUIS ANTONIO ORTÍZ FRADE**

JUNIO, 2022.

PUEBLA, PUE.



“HUP, 50 años de enseñanza y salud”

OFICIO C.Q./CT 015A/2022

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno de la Licenciatura en Química Farmacobiólogo

Arturo Alejandro Aguilar Ruiz

realizada en el área de Química Orgánica, comunican a Usted la autorización para la publicación del Trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Mendoza Martínez y el Dr. Luis Antonio Ortiz Frade, con el siguiente título:

“EFECTO DE LOS MEDIADORES M^{II}L₃ Y M^{III}L₃ SOBRE LAS INTERACCIONES EN LA GLUCOSA OXIDASA DE *Aspergillus niger*”

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 7 de junio de 2022.


Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 8 de junio de 2022



Dr. Jorge Rigoberto Juárez Posada
PRESIDENTE



Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez
SECRETARIO



M. en C. Alan Carrasco Carballo
VOCAL

c.c.p. Archivo

Cadena digital: 4Ak'Mw-Bu#Oj!Rg, Da. Cc!Uj.Ds(Ly*Gf'XI!Zj. Kd, Fp, Bv+Xk*Is/BI'Dh)Fi.Xx*Kx#Jh)Pn+Vl.La%Vo&Dk. Cm-Gf.Si"Cf#Cg+Ux%Gt%Nu'Hw*Lh+Oy&Xc!Kk*Nc+Pl+Yg.Xw/Gf(Sj#Eo\$Aa'Ai#Th&Pq'Vb*Mm*Vy"Uk%Rn"Py/Kf\$Bj.Ne&Vn'Xs&P g-Sw(Xf!Et%Lx/Gz(Gq"Bg\$Ho)Cc(Xw!Fo*Qz/Ur-Zf.Oe(Ps"Fs\$Et)Zx&Eo\$Bq%Vy(Zo.Ip, Ma#Kj/Yt!

Este trabajo se encuentra en el marco del proyecto:
CONACYT-SEP Ciencia básica 288069

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por permitirme desarrollarme profesionalmente, el apoyo que me brindaron y los conocimientos otorgados. Gracias por permitirme ser un lobo de la BUAP.

Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS), perteneciente al padrón de laboratorios nacionales CONACYT, por los recursos computacionales, el apoyo y la asistencia técnica brindados, a través del proyecto No. 201803022c.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) por ayudarme con esta investigación.

Al Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica (LESQO) por brindarme el apoyo necesario para continuar con la tesis.

Agradecimientos especiales

A mis padres Juan Alejandro Aguilar Sánchez y Mónica Araceli Ruiz Utrilla, las personas más importantes de mi vida, por su amor y su apoyo en todo momento, consejos y por ser parte de mi desarrollo y mi educación, a ustedes les debo la persona que soy ahora.

A mis hermanos Verónica Guadalupe Aguilar Ruiz y Ángel Jeshua Aguilar Ruiz, por ayudarme a salir adelante, motivarme, darme su amor incondicional y por ser la alegría de mi corazón. De igual forma a mi cuñado Juan Carlos Cabrera Jiménez por ser parte de la familia, ser un gran amigo, y por saber que siempre puedo contar contigo.

Al resto de mi familia, abuelos, tíos, primos y sobrinos, por ayudarme en cada etapa de mi vida y depositar su confianza en mí.

A mi director de tesis el Dr. Ángel Gabriel Mendoza Martínez y mi asesor el Dr. Luis Antonio Ortiz Frade por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes y depositar su confianza en mi para la elaboración de este proyecto de tesis, además de su paciencia, soporte y apoyo siempre que lo necesité.

A la QFB Teresa Pacheco Álvarez, futura MSE, por presentarme a mi director, a mi asesor y tenerme en cuenta en diversos proyectos que me ayudan a mejorar profesionalmente, además de estar siempre al tanto de mi futura vida laboral.

Al Dr. Alan Carrasco Carballo por su conocimiento y aporte a esta tesis, además de estar al pendiente en todo momento del progreso de este proyecto.

Al Dr. Raúl Ávila Sosa por estar al pendiente de mí a lo largo de toda mi carrera profesional y ayudarme a solucionar cualquier problema que se presentara, además de ser mi sinodal, gracias por sus comentarios que ayudaron a mejorar la tesis.

Al Dr. Jorge Rigoberto Juárez Posadas por aceptar ser mi sinodal, darse el tiempo de revisar mi tesis a detalle y rápido, aportando sus observaciones para mejorar la tesis.

A los profesores que me ayudaron en la adquisición de conocimientos, por su paciencia y dedicación.

De mis amigos del CDL, Jesús Vergara, Francisco Rodas, Carlos Herrera, Adrián Urdanivia, José Jiménez y Jaime Silva quienes estuvieron conmigo la mayor parte de la carrera e hicieron de esta etapa una etapa agradable, llena de risas y diversión. Del mismo modo, agradezco a mis demás amigos y compañeros de la carrera, con quienes compartí gran parte de tiempo en la universidad, no escribo sus nombres porque son muchísimos y con cada uno de ustedes tengo grandes anécdotas que llevaré siempre en un lugar especial de mi memoria.

A aquella persona que fue especial para mí en la etapa más difícil de mi carrera, me acompañó a lo largo de la escritura de esta tesis, me dio su apoyo, confianza y compañía.

Índice

<i>Glosario</i>	1
1. Introducción	5
2. Marco teórico	7
2.1 Diabetes	7
2.2 Compuestos de coordinación	9
2.2.1 Metales de transición	10
2.2.2 Ligandos.....	12
2.3 Proteínas y enzimas	13
2.3.1 Aspectos generales.....	13
2.4 Bioinformática	19
2.5 Bases del Docking molecular.....	20
2.5.1 Docking Molecular	22
3. Antecedentes	25
3.1 Biosensores electroquímicos de glucosa para el control de la diabetes.....	25
3.1.1 Glucosa oxidasa.	25
3.1.2 Biosensores para glucosa.....	27
3.1.2.1 Biosensores de primera generación.	32
3.1.2.2 Biosensores de segunda generación.....	34
3.1.2.3 Biosensores de tercera generación.....	36
3.2 Mediadores redox en biosensores de glucosa de segunda generación.....	37
3.2.1 Características de mediadores redox.	37
3.2.2 Mediadores redox orgánicos y mediadores redox inorgánicos.....	37
3.3 Mecanismos de transferencia electrónica de mediadores redox con la enzima glucosa oxidasa.....	40

3.3.1	Teoría de Marcus-Hush	40
3.3.2	Modelo de efecto túnel	42
3.3.3	Interacción molecular mediador-GOx	43
4.	<i>Planteamiento del problema</i>	45
5.	<i>Hipótesis</i>	46
6.	<i>Objetivos</i>	47
6.1	Objetivo general	47
6.2	Objetivos particulares	47
7.	<i>Desarrollo experimental</i>	48
7.1	Hardware y Software	48
7.2	Metodología	48
7.2.1	Obtención y preparación de los complejos metálicos.....	48
7.2.2	Minimización de los complejos.	49
7.2.3	Obtención y validación de Targets	49
7.2.4	Preparación de ligandos	49
7.2.5	Docking Molecular	50
8.	<i>Resultados y discusión</i>	51
8.1	Obtención y preparación de los complejos metálicos.....	51
8.2	Minimización de energía de los complejos.....	52
8.3	Obtención y validación de Targets	53
8.4	Estudio de interacciones moleculares	55
9.	<i>Conclusión</i>	79
10.	<i>Referencias</i>	80

Glosario

Acoplamiento molecular. Es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco (usualmente proteico) a partir de sus representaciones tridimensionales. (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019).

Ácido de Lewis. Sustancia que puede aceptar un par de electrones. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Aminoácidos. Unidades monoméricas de proteínas; cada uno está formado por tres grupos funcionales unidos con un carbono α central: un grupo amino, una cadena lateral definitoria y un grupo carboxílico. (Karp, 2014).

Apoenzima. Es la parte proteica de una enzima, desprovista de los cofactores o coenzimas que puedan ser necesarios para que la enzima sea funcionalmente activa. La apoenzima es catalíticamente inactiva. (QUIMICA.ES, s.f.)

Base de Lewis. Sustancia que puede donar un par de electrones. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Biosensor. Dispositivo que utiliza materiales de origen biológico para detectar y cuantificar una sustancia. (Real Academia Española, 2021).

Catabolismo. Es la parte del metabolismo que consiste en la transformación de moléculas orgánicas o biomoléculas complejas en moléculas sencillas y en el almacenamiento de la energía química desprendida en forma de enlaces de fosfato y de moléculas de ATP, mediante la destrucción de las moléculas que contienen gran cantidad de energía en los enlaces covalentes que la forman, en reacciones químicas exotérmicas. (QUIMICA.ES, s.f.)

Catalizador. Sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química sin consumirse. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Coenzima. Un componente orgánico, no proteínico de una enzima. (Karp, 2014)

Cofactor. El componente no proteínico de una enzima, puede ser inorgánico u orgánico. (Karp, 2014)

Compuesto de coordinación. Especie neutra que contiene uno o más iones complejos. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Diabetes *mellitus*. Enfermedad metabólica caracterizada por eliminación excesiva de orina, adelgazamiento, sed intensa y otros trastornos generales. Enfermedad metabólica producida

por una secreción deficiente de insulina, lo que produce un exceso de glucosa en la sangre. (Real Academia Española, 2021).

Difracción de rayos X. Dispersión de los rayos X producida por las unidades de un sólido cristalino común. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Dispositivos amperométricos. son un tipo de sensor electroquímico, ya que miden continuamente la corriente resultante de la oxidación o reducción de una especie electroactiva en una reacción bioquímica. (Grieshaber et al., 2008).

Enlace covalente coordinado. Enlace en el que uno de los dos átomos enlazados proporciona el par de electrones; también se conoce como enlace dativo. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Enlace peptídico. El enlace químico que une los aminoácidos en una proteína; se forma cuando el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de un segundo aminoácido. (Karp, 2014).

Flavoproteínas. Un tipo de portador de electrones en el que un polipéptido está unido con uno o dos grupos prostéticos relacionados, ya sea FAD o FMN. (Karp, 2014).

Glucosa oxidasa. Enzima oxido-reductasa que cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. Esta enzima se aplica ampliamente para la determinación de glucosa en fluidos corporales y en la eliminación de glucosa u oxígeno residual de alimentos y bebidas. Además, los mohos productores de glucosa oxidasa tales como especies de *aspergillus* y *penicillium* se utilizan para la producción biológica de ácido glucónico. (UniProt, 2018).

Hiperglucemia. Nivel de glucosa en la sangre superior al normal. (Real Academia Española, 2021)

Holoenzima. Enzima que está formada por una proteína (apoenzima) y un cofactor, que puede ser un ion o una molécula orgánica compleja unida (grupo prostético) o no (una coenzima). (QUIMICA.ES, s.f.)

Inhibidor competitivo. Un inhibidor enzimático que compite con moléculas de sustrato para tener acceso al sitio activo. (Karp, 2014).

Ligando. Cualquier molécula que puede unirse con un receptor porque tiene una estructura complementaria. (Karp, 2014).

Mediador. Reactivos oxidantes reversibles. Son moléculas pequeñas y móviles, que pueden reaccionar rápidamente con la enzima. Se oxidan en el electrodo y se reducen en el sitio de

reacción de la enzima o viceversa. Por lo tanto, deben mostrar una cinética heterogénea reversible, no reaccionar con el oxígeno e, idealmente, ser independientes del pH. (Grieshaber et al., 2008).

Membrana permselectiva. También denominadas *ionselectivas*, tienen la capacidad de discriminar entre especies cargadas positiva y negativamente. (Argudo Espinoza, 2012).

Metabolismo. El total de las reacciones químicas que ocurren en una célula. (Karp, 2014).

Metales de transición. Elementos que tienen incompletos los subniveles *d* o que forman fácilmente cationes que tienen incompletos los subniveles *d*. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Mutación. Un cambio espontáneo en el gen que lo altera en forma permanente, de manera que causa un cambio heredable. (Karp, 2014).

Número de coordinación. En una red cristalina se define como el número de átomos (o iones) que rodean un átomo (o ion). En los compuestos de coordinación se define como el número de átomos donadores que rodean al átomo metálico central en un complejo. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.)

Número de oxidación. Número de cargas que tendría un átomo en una molécula si los electrones fueran transferidos completamente en la dirección indicada por la diferencia de electronegatividades. (Instituto Tecnológico de Yucatán, s.f.).

Oxidación-reducción (redox), potencial. La separación de carga, medida en voltaje, para cualquier par de agentes oxidantes-reductores, como NAD^+ y NADH , en relación con una pareja estándar. (p. ej., H^+ y H_2). (Karp, 2014).

Oxidación-reducción (redox), reacción. Una en la que ocurre un cambio en el estado electrónico de los reactivos. (Karp, 2014).

Poliuria. Volumen excesivo de orina.

Proteínas. Grupo con diversidad estructural y funcional de polímeros formados por monómeros de aminoácidos. (Karp, 2014).

Quelatos. Son complejos formados por la unión de un metal y un compuesto que contiene dos o más ligandos potenciales. (QUIMICA.ES, s.f.)

Sustrato. El reactivo al que se une una enzima. (Karp, 2014).

Sistemas orgánicos. es un conjunto de órganos y estructuras análogas que trabajan en conjunto para cumplir alguna función en el ser vivo. (QUIMICA.ES, s.f.).

Sitio activo. La parte de la molécula enzimática que participa directamente en la unión con el sustrato. (Karp, 2014).

Transductor. Dispositivo que transforma el efecto de una causa física, como la presión, la temperatura, la dilatación, la humedad, etc., en otro tipo de señal, normalmente eléctrica. (Real Academia Española, 2021).

1. Introducción

A lo largo de los años, la diabetes se ha colocado como una enfermedad de gran importancia en la población humana, puesto que, desde hace miles de años, esta ha estado presente. “El término *diabetes* procede del griego diabetes, que a su vez deriva del verbo *diabaíno* (caminar), formado a partir del prefijo *dia-*, (a través de), y *báino*, (andar, pasar)” (Díaz Rojo, 2004). Este término se conoce así porque al observar a los pacientes diabéticos, se percataban que padecían de exceso de orina, es decir que su cuerpo no retenía todo el líquido que estaba tomando, sino que se excretaba todo.

Según OMS (2020) la diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Además, menciona que el efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento de glucosa en la sangre) y con el tiempo, el exceso de glucosa en la sangre conlleva a diversos problemas, estos pueden generar daño a diferentes sistemas en el cuerpo. Por lo tanto, es una enfermedad de importancia a nivel mundial.

Teniendo en cuenta esto, se llega a la necesidad de monitorear los niveles de glucosa que circula en sangre de personas mayormente diabéticas, en consecuencia, se han elaborado a lo largo de los años pequeños dispositivos llamados biosensores que siguen mejorando constantemente para una medición más sensible y específica, mostrando resultados de mayor calidad y más confiables.

Bhalla et al. (2016) describe:

Un biosensor es un dispositivo que mide reacciones biológicas o químicas generando señales proporcionales a la concentración de un analito en la reacción. Los biosensores se emplean en aplicaciones como el control de enfermedades, el descubrimiento de fármacos y la detección de contaminantes, microorganismos causantes de enfermedades y marcadores que son indicadores de una enfermedad en los fluidos corporales (sangre, orina, saliva, sudor).

Existen diversos tipos de biosensores, sin embargo, los electroquímicos son los usados para la detección de glucosa debido a su capacidad de medir reacciones de oxidación y reducción.

De acuerdo con Hassan et al., (2021) existen 3 tipos de biosensores electroquímicos, aquellos que requieren de oxígeno molecular como mediador para la generación de H_2O_2 , y son llamados biosensores de primera generación; los de segunda generación son los que usan mediadores orgánicos o inorgánicos como aceptor de electrones, y por último los biosensores de tercera generación, que son aquellos que directamente la glucosa da una señal al electrodo. Siendo los de segunda generación los utilizados de manera práctica en la mayoría de dispositivos comerciales.

Un biosensor puede funcionar utilizando una enzima, que para el caso del presente estudio se trata de la glucosa oxidasa, y mediadores que ayudarán a transferir la corriente eléctrica como resultado de una reacción enzimática. En la literatura existen distintos estudios que buscan explicar el efecto del reconocimiento molecular entre el mediador y la enzima sobre el desempeño y sensibilidad de estos sistemas.

Por lo cual en este proyecto considerarán compuestos tris (N-N, de 1,10-fenantrolinas y 2,2-bipiridinas, con un centro metálico de hierro (Fe) con estados de oxidación $2+$ o $3+$, como modelo y se estudiara su interacción con la enzima glucosa oxidasa (GOx), dando información sobre los mecanismos de transferencia eléctrica, hecho que da una pista del desempeño de biosensores de glucosa de 2da generación. Los resultados de esta tesis tienen el fin de contribuir al entendimiento de los fenómenos moleculares que controlan la mediación redox de la enzima glucosa oxidasa y poder diseñar dispositivos más eficientes.

2. Marco teórico

2.1 Diabetes

La diabetes es una enfermedad que es estudiada por miles de años, existiendo reportes desde los antiguos egipcios. Según Zúñiga Guajardo & Rangel Rodríguez (2003) el papiro de Ebers, encontrado en 1872 cerca de Thebes, es la primera referencia que existe de la Diabetes Mellitus, se cree que fue escrito en 1550 a. c. y en él se encuentra una descripción y remedios para la poliuria.

El término *diabetes*, según Mandal (2019), señala que fue acuñada por Apollonius alrededor de 250 a. C. y Thomas Willis en 1675 agrega la palabra *mellitus*, para referirse al gusto dulce de la orina, dando así origen al nombre de la enfermedad.

La diabetes mellitus, es una enfermedad proveniente de la mala alimentación o de la genética de cada persona que tiene como consecuencia un grave trastorno metabólico, dañando gravemente sistemas orgánicos, de acuerdo a la OMS (2020), se describe como “enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce”.

Esta enfermedad está distribuida a nivel global, causando diversas complicaciones crónicas, las cuales American Diabetes Association (s.f.) enlista de la siguiente forma “hipoglucemia, hiperglucemia, enfermedad renal (nefropatía), complicaciones de la piel, complicaciones de los ojos, neuropatía, complicaciones en los pies, cetoacidosis, gastroparesia y salud mental”.

En México es una de las principales causas de muerte, muchos factores tienen que ver en desarrollar la enfermedad, por ejemplo, esto puede ser debido a la mala alimentación que tienen las personas, pues la gastronomía mexicana es muy rica en carbohidratos y lípidos.

En el año 2021, de enero a junio, la diabetes alcanzó el tercer lugar del total de mortalidad en nuestro país (tabla 1). “En el periodo de referencia, las tres principales causas de muerte a nivel nacional fueron: COVID-19 (145,159; 25.0%), enfermedades del corazón (113,899; 19.7%), y diabetes mellitus (74,418; 12.8%).” (INEGI, 2022).

Tabla 2.1

Mortalidad por sexo en México de enero a agosto del año 2021.

Rango	Total	Hombre	Mujer
1	COVID-19 145,159 En 2020 fueron 51,402	COVID-19 89,716 En 2020 fueron 34,460	COVID-19 55,437 En 2020 fueron 16,941
2	Enfermedades del corazón 113,899 En 2020 fueron 98,572	Enfermedades del corazón 62,617 En 2020 fueron 54,394	Enfermedades del corazón 51,276 En 2020 fueron 44,173
3	Diabetes mellitus 74,418 En 2020 fueron 68,372	Diabetes mellitus 38,355 En 2020 fueron 35,522	Diabetes mellitus 36,056 En 2020 fueron 32,850
4	Tumores malignos 44,197 En 2020 fueron 44,717	Tumores malignos 21,482 En 2020 fueron 21,902	Tumores malignos 22,714 En 2020 fueron 22,815
5	Influenza y neumonía 20,956 En 2020 fueron 23,331	Enfermedades del hígado 15,041 En 2020 fueron 14,957	Enfermedades cerebrovasculares 9,161 En 2020 fueron 9,084
6	Enfermedades del hígado 20,956 En 2020 fueron 20,594	Agresiones (homicidios) 14,880 En 2020 fueron 15,982	Influenza y neumonía 8,242 En 2020 fueron 9,222
7	Enfermedades cerebrovasculares 18,843 En 2020 fueron 18,557	Accidentes 13,130 En 2020 fueron 12,095	Enfermedades del hígado 5,602 En 2020 fueron 5,636
8	Agresiones (homicidios) 16,972 En 2020 fueron 18,057	Influenza y neumonía 12,713 En 2020 fueron 14,107	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 4,232 En 2020 fueron 5,687
9	Accidentes 16,912 En 2020 fueron 15,443	Enfermedades cerebrovasculares 9,681 En 2020 fueron 9,472	Accidentes 3,768 En 2020 fueron 3,335
10	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 9,152 En 2020 fueron 12,071	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 4,920 En 2020 fueron 6,384	Insuficiencia renal 3,033 En 2020 fueron 3,264

Fuente:(INEGI, 2022).

Como se puede observar en la tabla 2.1, la tasa de mortalidad para la diabetes es muy alta, y cada vez es más común encontrar pacientes con diabetes, la mayor causa de provocation es por una malos hábitos alimenticios y falta de actividad física.

Los biosensores empleados para medir glucosa en sangre son especialmente para las personas diabéticas que requieren tener un control. Sin embargo, las personas diabéticas no son las únicas que deberían de tener este control, sino aquellas personas que son propensas a padecerlas, por ejemplo, personas adultas cursando algún trastorno alimenticio, con el afán de prevenir la diabetes de tipo no hereditario, y mantener un cuerpo saludable.

2.2 Compuestos de coordinación

Para continuar, es necesario recalcar que para la elaboración de un biosensor se requieren de compuestos necesarios para llevar a cabo el transporte de electrones, y los compuestos de coordinación, también llamados complejos de coordinación, son una gran opción para llevar a cabo dicha tarea.

El entendimiento acerca de los compuestos de coordinación ha alcanzado gran importancia a nivel científico. Actualmente es un objeto de estudio importante en la química, pues tiene diferentes aplicaciones. “(...) Estos compuestos se utilizan como colorantes, enzimas, catalizadores, medicamentos, en analítica, entre otras aplicaciones” (Universidad nacional de Colombia, 2014).

Alfred Werner, propuso la teoría que hoy en día se conoce como “Teoría Wener de la coordinación”, con la cual ganó el premio nobel de Química desarrollando lo que se conoce ahora como química de la coordinación moderna. “(...) [Alfred Werner] Ganó el Premio Nobel de Química en el año 1913 por su proposición de la configuración en octaedro de los metales de transición complejos (...)” (Universidad nacional de Colombia, 2014b).

Por lo tanto:

(...) Un compuesto de coordinación por lo general consiste en un ion complejo y un contraión. Nuestro entendimiento acerca de la naturaleza de los compuestos de coordinación se debe al trabajo de Alfred Werner, quien preparó y caracterizó muchos de ellos. En 1893, a la edad de 26 años, Werner propuso la teoría que hoy se conoce como teoría de Werner de la coordinación (Chang & Goldsby, 2013).

Gutiérrez Ríos (2003) indica que las bases de la teoría de Werner son un *átomo central*, el cual es un ión metálico, rodeado de moléculas neutras o iones negativos, a los que llamó *ligandos*.

Gracias a los estudios de Werner, hoy se tiene más información acerca de los compuestos de coordinación, debido a que, abrió un mundo nuevo a diversas ramas de la química inorgánica, con la posibilidad de realizar nuevas investigaciones sobre cómo funcionan y las aplicaciones que tienen.

“(…) [Werner] demostró que las moléculas neutras estaban directamente enlazadas al metal, de manera que las sales complejas como el $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{NH}_3$ estaban correctamente formuladas como $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. También demostró que se originaban profundas consecuencias estereoquímicas a partir de la suposición de que las moléculas o iones (ligandos) alrededor del metal ocupaban posiciones en las esquinas de un octaedro o un cuadrado (Universidad nacional de Colombia, 2014b).

Los ácidos y bases de Lewis también funcionan en este sistema, Alfred Werner postula que los ligandos ceden electrones y el metal los acepta, manteniéndose así un enlace covalente coordinado, estabilizando por completo la molécula con los metales de transición con cualquiera de sus estados de oxidación.

(…) Werner postuló que la mayoría de los elementos presenta dos tipos de valencia: una valencia primaria y una valencia secundaria. El término actual para la valencia primaria corresponde al número de oxidación y la valencia secundaria equivale ahora al número de coordinación del elemento (..) (Chang & Goldsby, 2013).

Chang & Goldsby (2013) mencionan además que, “(…) los enlaces metal-ligante casi siempre son enlaces covalentes coordinados (...)”, esto es porque el metal acepta los electrones que el ligante le otorga.

2.2.1 Metales de transición

Los complejos de coordinación tienen un centro metálico que actúa como aceptor de electrones, estos metales son llamados metales de transición (figura 2.1). Gracias a sus propiedades, estos metales son capaces de mantener estable al complejo de coordinación.

(…) La característica típica de los metales de transición es que tienen incompletas las subcapas *d* o con facilidad dan origen a iones que tienen incompletas estas

subcapas. Esta característica les confiere diversas propiedades sobresalientes, entre las que figuran su coloración particular, capacidad de formar compuestos paramagnéticos, actividad catalítica y, en especial, una marcada tendencia a formar iones complejos (...) (Chang & Goldsby, 2013).

Figura 2.1

Tabla periódica de los elementos, resaltando en color azul los metales de transición y resaltando con un cuadro rojo los metales del grupo 8

1																	18
1 ^a																	8A
1	2											13	14	15	16	17	2
H	2A											3A	4A	5A	6A	7A	He
3	4											5	6	7	8	9	10
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
11	12	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Na	Mg	3B	4B	5B	6B	7B	8B		1B	2B	Al	Si	P	S	Cl	Ar	
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Te	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
87	88	89	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn						

Fuente: (Chang & Goldsby, 2013).

La familia 8, en la tabla periódica está compuesta por hierro (Fe), rutenio (Ru) y osmio (Os) (Figura 2.1).

Los estados de oxidación más comunes para los metales de transición del grupo 8 son 2+ y 3+, estos son los más estables. Chang & Goldsby (2013), describen la tendencia del estado de oxidación de la siguiente manera “(...) el estado de oxidación 2+ tiende a ser más estable al final de la serie, en tanto que el estado de oxidación 3+ es más estable al principio. (...)”. Chang & Goldsby (2013), también menciona “(...) como se necesita más energía para remover el tercer electrón de los metales que están cerca del final de la serie que para los del principio, los metales del final de la serie tienden a formar iones M^{2+} más que iones M^{3+} ”. Al tener esto en cuenta, se considera que los metales de transición del grupo 8 tienen mayor tendencia de formar iones M^{3+} que los grupos 3, 4, 5, 6 y 7 de la tabla periódica, por el

contrario, a los grupos 9, 10 y 11, que tienen mayor tendencia a formar iones M^{2+} . Esto explica que, los metales del grupo 8 tienen tendencia similar de formar iones M^{2+} y M^{3+} , con una proporción mayor para formar iones M^{2+} , esto es debido a su configuración en la tabla periódica, puesto que, para quitarle un electrón de su última capa, se necesita más energía que aquellos que tienen una configuración electrónica menor.

2.2.2 Ligandos

Los ligandos orgánicos, con electrones disponibles para la coordinación, son los elementos que darán estabilidad al centro metálico compartiendo sus electrones, ellos actúan como bases de Lewis cediendo sus electrones y generando un enlace covalente coordinado con su centro metálico.

El átomo de un metal de transición (en su estado neutro o con carga positiva) actúa como ácido de Lewis al aceptar (y compartir) pares de electrones de las bases de Lewis. De esta manera, los enlaces metal-ligante casi siempre son enlaces covalentes coordinados (Chang & Goldsby, 2013).

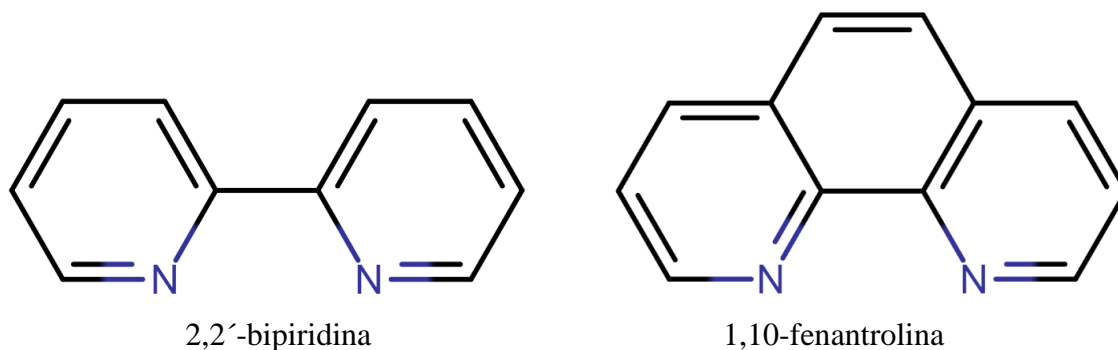
Los centros metálicos, al actuar como ácidos de Lewis, tienden a compartir y aceptar electrones provenientes de otras moléculas que tengan pares de electrones libres para donar, esta es la función de los ligandos, estos son bases de Lewis que donan sus pares de electrones libres para mantener estable a la molécula. Dependiendo de cuantos pares de electrones sea capaz el ligante de donar, se le dará un número de coordinación. “El número de coordinación en los compuestos de coordinación se define como el número de átomos donadores que rodean el átomo del metal central en un ion complejo” (Chang & Goldsby, 2013).

“Según el número de átomos donadores presentes, los ligandos se clasifican en monodentados, bidentados o polidentados (...)” (Chang & Goldsby, 2013). Entre mayor sea el número de átomos donadores presentes, mayor será la estabilidad del compuesto.

Los ligandos bidentados usados en este trabajo se muestran en la figura 2.2.

Figura 2.2

Ligandos bidentados usados para los complejos $M(II)L_3$ y $M(III)L_3$ estudiados en este trabajo



2.3 Proteínas y enzimas

2.3.1 Aspectos generales

Como se expone más adelante, los biosensores electroquímicos de glucosa tienen un componente importante capaz de transferir electrones y así poder generar una señal medible del sustrato, este componente es conocido como enzima. Para comprender como funciona una enzima, es necesario saber qué son, cómo se componen, cuál es su estructura y cuál es la clasificación según la enzima que se esté estudiando.

Las enzimas son proteínas que actúan como biocatalizadores en los organismos vivos, los cuales, son importantes para las funciones catabólicas manteniendo al organismo vivo y funcionando adecuadamente. “Las enzimas aceleran la velocidad de las reacciones muy por encima de un millón de veces, de tal forma que reacciones que tardarían años en la ausencia de catálisis pueden ocurrir en fracciones de segundos si son catalizadas por la enzima adecuada.” (Cooper & Hausman, 2011b). Son proteínas muy específicas y eficaces, acelerando la velocidad de las reacciones bioquímicas. De no ser por la efectividad de este tipo de proteínas, la vida no sería posible, por consiguiente, los procesos metabólicos serían demasiado lentos.

Según McGilvery (1977) las proteínas son moléculas cuyas propiedades químicas crean la mayoría de las funciones biológicas, son polímeros de aminoácidos y que son formados por secuencias de 20 diferentes aminoácidos en cadenas peptídicas. Las proteínas cuentan con cuatro estructuras, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La estructura primaria (figura 2.3a), que no es más que la cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y que dependiendo de la secuencia de aminoácidos que lo conformen, esta tendrá diferente función, es por eso, que es importante mantener esta secuencia intacta, ya que, al cambiar un aminoácido, su función también lo haría. “La naturaleza del péptido dependerá de su composición de aminoácidos, es decir, del número de cada uno de los aminoácidos escogidos para formar el péptido y del orden en que están colocados.” (McGilvery, 1977b).

La estructura secundaria (figura 2.3b) proviene de la unión mediante puentes de hidrógeno de aminoácidos cercanos, afectando al plegamiento o a la forma tridimensional de la proteína, y generando así dos tipos de estructuras frecuentes, la α -hélice “(...) En esta estructura el esqueleto polipeptídico se encuentra estrechamente enrollado alrededor de un eje imaginario dibujado longitudinalmente por el centro de la hélice, y los grupos R de los residuos aminoácidos sobresalen hacia fuera del esqueleto helicoidal.” (Nelson et al., 2009) y la hoja β , comúnmente conocida como β -plegada.

En la conformación β el esqueleto de la cadena polipeptídica se encuentra extendido en zig-zag en lugar de plegarse como una hélice. Las cadenas polipeptídicas en zig-zag pueden disponerse de manera adyacente formando una estructura que semeja una serie de pliegues. En esta disposición, denominada hoja β , se forman enlaces de hidrógeno entre segmentos adyacentes de cadena polipeptídica. (Nelson et al., 2009).

La estructura terciaria (figura 2.3c), es la estructura principal de las enzimas, resultando del doblado y el enlace de la proteína, dándole así una estructura tridimensional. “(...) Los segmentos que interaccionan dentro de la cadena polipeptídica se mantienen en su posición terciaria característica gracias a diferentes tipos de interacciones enlazantes débiles (y a veces mediante enlaces covalentes tales como puentes disulfuro) entre los segmentos (...)” (L. Nelson & M. Cox, 2009). Este tipo de estructuras permite la interacción o el alcance de los aminoácidos que se encuentran lejos de ellos en la secuencia de aminoácidos. Los giros que necesita la secuencia para poder realizar esta acción se encuentran dados por aminoácidos específicos. “(...) La localización de giros (incluidos los giros β) en la cadena polipeptídica y la dirección y el ángulo de estos giros están determinados por el número y la localización

de aminoácidos específicos promotores de su formación, tales como Pro, Thr, Ser y Gly (...)” (L. Nelson & M. Cox, 2009).

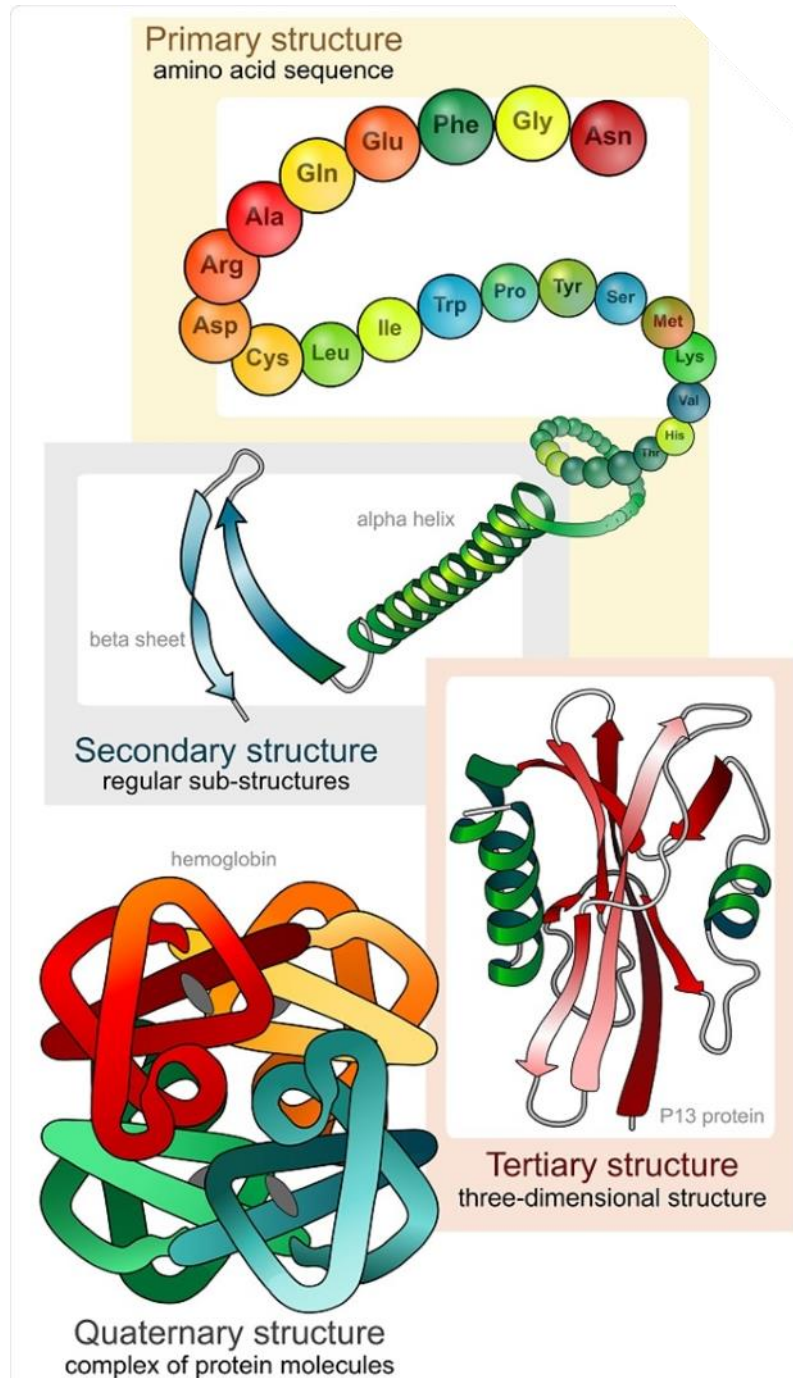
La estructura terciaria puede clasificarse en otros dos tipos de estructuras, las fibrosas “(...) que presentan cadenas polipeptídicas dispuestas en largas hebras u hojas (...)” (L. Nelson & M. Cox, 2009) y las globulares “(...) cadenas polipeptídicas plegadas en formas globulares o esféricas (...)” (L. Nelson & M. Cox, 2009). Destaca la estructura terciaria de tipo globular, puesto que, es la estructura de importancia en esta tesis, considerando que se trabaja en este proyecto con la enzima glucosa oxidasa.

Los dos grupos son estructuralmente diferentes: las proteínas fibrosas constan mayoritariamente de un único tipo de estructura secundaria y su estructura terciaria es relativamente simple. Las proteínas globulares contienen a menudo varios tipos de estructura secundaria. Estos dos grupos también difieren en su función: las estructuras que dan soporte, forma y protección externa a los vertebrados están formadas por proteínas fibrosas mientras que la mayoría de enzimas y proteínas reguladoras son globulares. (L. Nelson & M. Cox, 2009).

Según (Cooper & Hausman, 2011a), la estructura cuaternaria (figura 2.3d) consiste en las interacciones entre diferentes cadenas polipeptídicas en proteínas compuestas de más de un polipéptido, es decir, a diferencia de las estructuras terciarias, estas se componen de más cadenas polipeptídicas.

Figura 2.3

Estructura de las proteínas. a) estructura primaria. b) estructura secundaria. c) estructura terciaria. d) estructura cuaternaria



Fuente: (Smith, 2018).

Con base en lo anterior, las enzimas son secuencias de aminoácidos que se agrupan formando una estructura tridimensional, llamada estructura terciaria, y que tiene una estructura globular (figura 2.4). La estructura fibrosa de las proteínas es distinta a la globular, la figura 2.4 y la figura 2.5 explicará de forma visual la diferencia entre ambas estructuras.

Figura 2.4

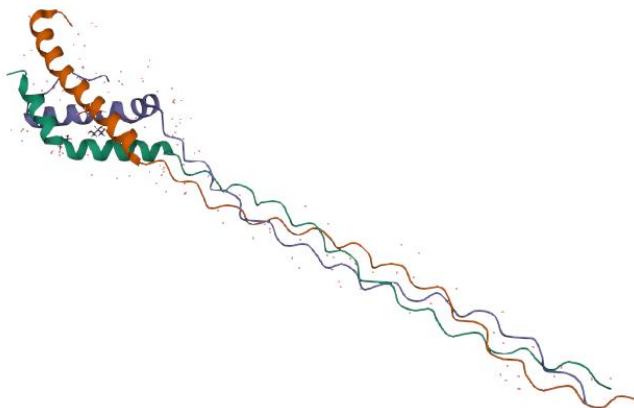
Estructura de la enzima glucosa oxidasa. Imagen tomada desde RCBS PDB, con el código 1CF3



Fuente: (Sehna et al., 2021).

Figura 2.5

Estructura del colágeno, estructura fibrosa. Imagen tomada desde RCBS PDB, con el código 5CTI



Fuente: (Sehna et al., 2021).

Las enzimas también son clasificables, estas se clasifican de acuerdo a la función y el lugar donde realizan la reacción, y pueden ser fácilmente identificadas por su nombre, los bioquímicos han llegado al acuerdo de poner en su nombre un sufijo *-asa*, precedido por la descripción del tipo de reacción, como lo describe Lehninger (1997). En algunos casos, se

identifican por el nombre del sustrato, el ejemplo claro e importante para este tema de tesis es la glucosa oxidasa, señalando a la glucosa como sustrato, el sufijo *-asa* indica que es una enzima y el prefijo oxid- refiriéndose a la función de la enzima, siendo esta una enzima que cataliza oxidaciones.

(...) la International Union of Biochemists (IUB) creó un sistema de nomenclatura de enzimas sin ambigüedad en el cual cada enzima tiene un nombre y número de código singular que identifican el tipo de reacción catalizada y los sustratos comprendidos; así, las enzimas se agrupan en seis clases. (K. Murray et al., 2013) [Tabla 2.2].

Tabla 2.2

Clases en las que se agrupan las enzimas según su función

Clase de enzima	Función
1. Oxidorreductasas	Catalizan oxidaciones y reducciones
2. Transferasas	Catalizan la transferencia de porciones, como grupos glucosilo, metilo o fosforilo
3. Hidrolasas	Catalizan la división hidrolítica de C-C, C-O, C-N y otros enlaces covalentes
4. Liasas	Catalizan la división de C-C, C-O, C-N y otros enlaces covalentes mediante eliminación de átomo, dejando dobles enlaces
5. Isomerasas	Catalizan cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula
6. Ligasas	catalizan la unión de dos moléculas en reacciones acopladas a la hidrólisis de ATP

Fuente: (K. Murray et al., 2013).

Existen enzimas que funcionan con ayuda de una molécula no proteica que participa en la catálisis, a estas moléculas se les llaman cofactores. “El cofactor puede ser un *ión metálico*, o bien una molécula orgánica llamada *coenzima*” (Lehninger, 1997). Los cofactores trabajan en conjunto con las enzimas que así lo requieran para aumentar su velocidad de reacción. “(...) las coenzimas no se alteran de forma irreversible por las reacciones en las que participan, más bien, se reciclan y pueden participar en múltiples reacciones enzimáticas.” (Cooper & Hausman, 2011b). Es por esto, que las enzimas no pueden trabajar sin un ión metálico o una coenzima, así que para diferenciarlos de una enzima activa de una

inactiva reciben el nombre de *holoenzima* o *apoenzima* según corresponda. “El complejo enzima-cofactor catalíticamente activo recibe el nombre de *holoenzima*. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por sí misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de *apoenzima*.” (Lehninger, 1997).

Según McGilvery (1977a) las enzimas que requieren de la participación de estas moléculas generalmente cumplen con ciertas funciones, una de ellas es la de oxidación y reducción, y la mayoría de ellas requiere de la presencia de una coenzima o un ión metálico. Ejemplo de las coenzimas, como lo describe McGilvery (1977a), son las flavín mononucleótido (FMN), o de flavín adenín dinucleótido (FAD), a las proteínas que tienen como coenzima estas moléculas se les conoce como flavoproteínas y son enzimas con funciones de óxido-reducción, es decir, son utilizadas principalmente para transferir átomos de hidrógeno y electrones.

Para observar la interacción entre una molécula pequeña como los complejos de coordinación y una macromolécula como la enzima, se requiere el uso de herramientas computacionales, concretamente la bioinformática.

2.4 Bioinformática

De un tiempo a la fecha la tecnología ha cobrado mayor importancia en el mundo entero, ha logrado cambiar la perspectiva del mundo y actualmente se encuentra al alcance de todos. La tecnología brinda comunicación, información, entretenimiento, entre muchísimas otras cosas, pero también es un soporte importante de la ciencia en el ámbito de la investigación, destacando el área biológica, en donde se hace uso de la bioinformática, rama de la biología que tiene que ver con el uso de la ciencia computacional en procesos biológicos.

(...) La bioinformática es "un campo interdisciplinario que se ocupa del desarrollo y la aplicación de algoritmos que analizan datos biológicos para investigar la estructura y función de los polímeros biológicos y sus relaciones con los sistemas vivos ". El campo se define en términos de sus dos disciplinas fundamentales principales, biología e informática, y su naturaleza interdisciplinaria (...). (Tapprich et al., 2021).

Gracias a esta rama de la Biología se pueden realizar estudios experimentales previos a una experimentación con animales, predecir la estructura tridimensional de las proteínas, guardar información esencial para el análisis de un organismo, proteína o molécula biológica, incluso, puede ayudar a predecir si existe afinidad entre una molécula pequeña y una proteína, aunque esto son solo datos estadísticos, los resultados son altamente significativos. “Los enfoques bioinformáticos son cada vez más esenciales en el descubrimiento de fármacos traslacionales tanto en el ámbito académico como en la industria farmacéutica (...)” (Wooller et al., 2017).

Por otra parte, una herramienta muy útil en el campo de la investigación es el uso del docking molecular, gracias al acoplamiento molecular se pueden predecir qué tan afines son o no las moléculas pequeñas que se obtuvieron en este proyecto con la enzima glucosa oxidasa.

2.5 Bases del Docking molecular

Antes de comenzar a hablar del docking molecular, es importante conocer este tema desde el desarrollo de fármacos, contemplando que los avances con la tecnología han ayudado a diversas áreas.

El Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DIFAC) cobra cada vez mayor importancia en la investigación y desarrollo de medicamentos. Esto se ha favorecido por el número de aplicaciones exitosas de métodos de cómputo para el desarrollo de compuestos que actualmente se encuentran en el mercado. Así mismo, diversos métodos que se emplean frecuentemente en DIFAC pueden transferirse a otras áreas del conocimiento de la química (Medina Franco et al., 2015).

De este modo, el uso de la ciencia computacional ha empleado mejoras eficientes al alcance de cada individuo, empleando menores costos en la parte experimental, ahorrando así mucho dinero por parte de las empresas a cargo de financiar la investigación y tiempo por parte de los investigadores.

Se estima que el desarrollo de un fármaco tarda aproximadamente entre 10 y 15 años y se invierten en promedio de 800 millones de dólares, teniendo el mayor costo y tiempo las pruebas clínicas en humanos. El tiempo y costos tan elevados

están asociados en gran medida a la gran cantidad de moléculas que fallan una o varias etapas del desarrollo de fármacos. (Saldívar Gonzalez et al., 2017).

Pinzi & Rastelli (2019) mencionan que “(...) los enfoques *in silico* ahora permiten la detección virtual de millones de compuestos en un tiempo asequible, reduciendo así los costos iniciales de identificación de aciertos y mejorando las posibilidades de encontrar los fármacos candidatos deseados.”

Los métodos computacionales no solamente ayudaron a la industria farmacéutica, sino también a muchas áreas que requerían información experimental con datos estadísticos aceptables.

(...) A la fecha, los métodos computacionales han contribuido, entre otras aplicaciones, al análisis eficiente de datos, al filtrado de colecciones de compuestos para seleccionar moléculas para evaluación experimental, a la generación de hipótesis para ayudar a entender el mecanismo de acción de fármacos y al diseño de nuevas estructuras químicas. (Saldívar Gonzalez et al., 2017).

Los objetivos del DIFAC son los mismos que se utilizan en el acoplamiento molecular. Estos objetivos se dividen en tres partes.

Diseño o identificación de nuevos compuestos. Esto es, diseñar nuevas estructuras con efecto biológico en una categoría terapéutica deseada. Una alternativa es buscar dentro de colecciones de compuestos existentes moléculas que tengan una actividad biológica específica.

Seleccionar candidatos. Los métodos computacionales ayudan a distinguir las moléculas sobre las cuales se deben enfocar primero las pruebas experimentales, por ejemplo, compra, síntesis, y evaluación biológica. Sin embargo, los métodos de cómputo no reemplazan a los experimentos.

Optimizar líderes [el autor hace referencia a líderes a aquellos compuestos más atractivos para el desarrollo de nuevos productos] para mejorar las propiedades deseadas y disminuir los efectos adversos. (Saldívar Gonzalez et al., 2017).

Para lograr ensamblar los compuestos de coordinación con la enzima, es necesario usar el docking molecular (acoplamiento molecular).

2.5.1 Docking Molecular

El docking molecular es un importante avance en la Química y en la Biología, con ella se observa el tipo de interacciones que existen entre un compuesto químico y una enzima, como es el caso de este proyecto. Con la información que existe recopilada en diversas bases de datos, es posible pronosticar los valores estadísticos de interacción entre estructuras, de acuerdo con su orientación molecular del ligando y estimando su complementariedad.

(...) el acoplamiento molecular es uno de los métodos *in silico* basados en estructuras más populares y exitosos, que ayudan a predecir las interacciones que ocurren entre moléculas y objetivos biológicos. Este proceso generalmente se logra prediciendo primero la orientación molecular de un ligando dentro de un receptor y luego estimando su complementariedad mediante el uso de una función de puntuación. (Pinzi & Rastelli, 2019).

Pinzi & Rastelli (2019) también confirma que “(...) el acoplamiento ha demostrado ser una herramienta importante para ayudar a comprender cómo los compuestos químicos interactúan con sus objetivos moleculares y para el descubrimiento y desarrollo de fármacos.”

El docking molecular no fue desarrollado con el fin de predecir las interacciones moleculares, más bien se desarrolló para investigar el reconocimiento molecular entre una molécula pequeña y una molécula grande, como lo explican Pinzi & Rastelli (2019) en el siguiente enunciado.

“(...) aunque se desarrolló por primera vez para investigar el reconocimiento molecular entre moléculas grandes y pequeñas, ahora también se utiliza ampliamente para ayudar en diferentes tareas de los programas de descubrimiento de fármacos, como la identificación y optimización de aciertos, el reposicionamiento de fármacos, la identificación de objetivos *a posteriori* (cribado inverso), diseño de ligando multiobjetivo y reposicionamiento. Además, el acoplamiento permite comprender las relaciones entre los diferentes objetivos moleculares implicados en una enfermedad

determinada, lo que también es de gran relevancia para la polifarmacología y el descubrimiento de fármacos modernos en general.” (Pinzi & Rastelli, 2019).

La figura 2.6 explica los usos que hoy en día se le puede dar a esta herramienta.

Figura 2.6

Aplicaciones del docking molecular en la investigación



Fuente: (Pinzi & Rastelli, 2019) [traducido].

Esta herramienta es accesible con la capacitación actual, pero depende de la capacidad de cómputo y cálculo con la que se cuenta, hoy en día el uso de una computadora es fundamental en la formación académica. Lo que es claro es que se trata de una tarea repetitiva al realizar n veces el proceso para que los resultados sean estadísticamente significativos. Este enunciado permite comprender el ahorro en tiempo que existe al usar este tipo de metodologías.

El docking molecular tiene 2 procesos:

i) Docking o proceso de búsqueda de la conformación y orientación de las moléculas, y ii) scoring, que consiste en asignar un valor o puntaje que mida la interacción entre las 2 estructuras (Saldívar González et al., 2017).

De las 2 etapas, la segunda es la más difícil de calcular con precisión de forma rápida. “Es por esto que en la actualidad el acoplamiento molecular es especialmente útil para proponer modelos de unión, pero aún no son muy confiables para calcular con precisión la energía de interacción” (Saldívar González et al., 2017).

A pesar de no saber cuál es la energía de interacción con precisión, es importante saber que este da un aproximado y gracias a ese valor estadístico, es posible comenzar a experimentar.

3. Antecedentes

3.1 Biosensores electroquímicos de glucosa para el control de la diabetes.

3.1.1 Glucosa oxidasa.

En cuanto a la glucosa oxidasa es importante mencionar que es una enzima capaz de catalizar la reacción de oxidación de la glucosa y parafraseando a UniProt (2018) ha sido aplicada ampliamente para la determinación de glucosa en fluidos corporales y para eliminar glucosa u oxígeno residual de alimentos y bebidas.

Tabla 3.1

Generalidades de la enzima glucosa oxidasa.

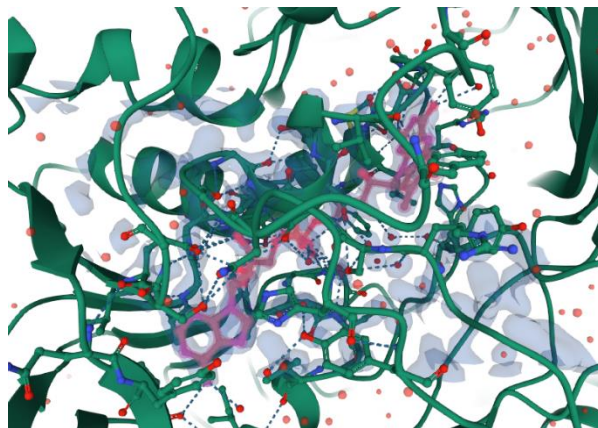
Clasificación*	Oxido-reductasa
Función*	Homodímero de unión a FAD
Familia**	AA3 (Actividades Auxiliares 3)
Ligante*	FAD, flavoproteína
Producción*	<i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>
Tamaño	605 a. a. (583 a. a. enzima madura, 22 a. a. pre-secuencia)
Actividad catalítica*	β -D-glucosa + O ₂ = D-glucono-1,5-lactona + H ₂ O ₂

Fuentes: (Frederick et al., 1990; UniProt, 2018*; Université d'Aix-Marseille, 2021**).

La tabla 3.1 menciona que la glucosa oxidasa es una proteína de la clasificación oxido-reductasa, que reduce el oxígeno a peróxido de hidrógeno, tiene como coenzima al flavín adenosín dinucleótido (FAD). Es una enzima presente en los reinos fungi y bacteria. Para su producción se utilizan cepas de *Aspergillus* o *Penicillium*, pertenecen a la familia de enzimas AA3. “Las enzimas AA3 pertenecen a la familia de las oxidorreductasas glucosa-metanol-colina (GMC). Las enzimas AA3 son flavoproteínas que contienen un dominio de unión a dinucleótido de flavina-adenina (FAD)” (Université d'Aix-Marseille, 2021).

Figura 3.1

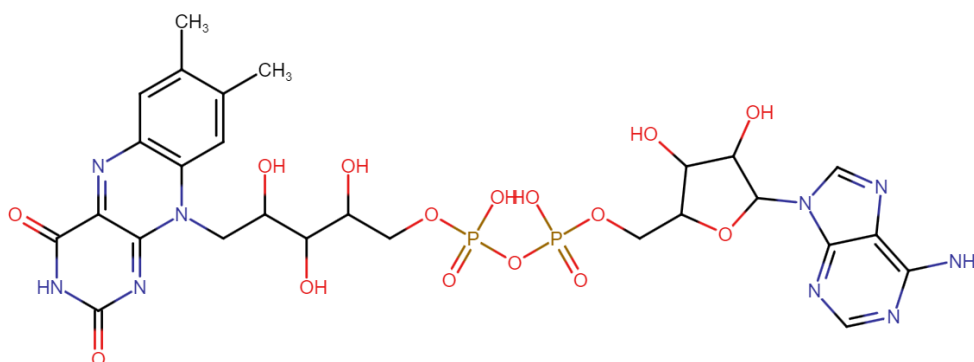
FAD presente en la enzima glucosa oxidasa. Vista en 3D



Fuente: (Sehnal et al., 2021).

Figura 3.2

Estructura molecular del FAD vista en 2D



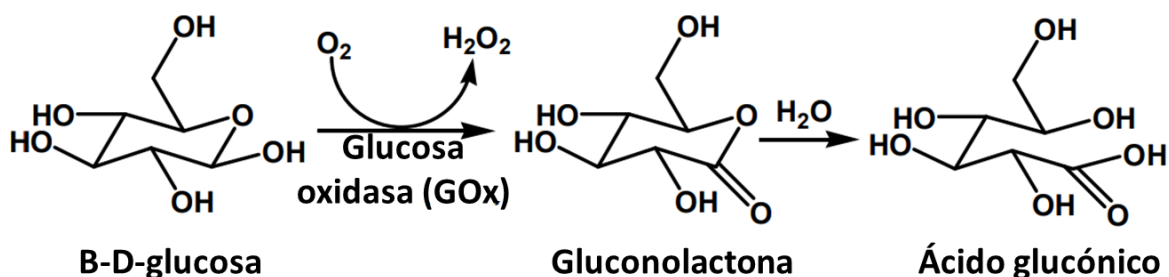
“(…) la enzima madura consta de 583 aminoácidos y está precedida por una pre-secuencia de 22 aminoácidos (…)” (Frederick et al., 1990). En el presente trabajo se utilizó la enzima expresada en *Aspergillus niger*. “(…) cuando se transforman en levadura, estos plásmidos dirigen la síntesis y secreción de entre 75 y 400 microgramos / ml de glucosa oxidasa activa (…)” (Frederick et al., 1990).

La reacción que cataliza la GOx, transforma la glucosa a gluconolactona a partir de dióxígeno, formando como producto gluconolactona y peróxido. “(…) En las reacciones catalíticas, FAD actúa como un portador redox y GOx cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones (…)” (Tu et al., 2019). Otro autor, describe otra reacción (no enzimática) posterior al producto de la gluconolactona, transformando a este producto a ácido glucónico,

explicado en la figura 3.3. “(...) La glucosa oxidasa (GOx) cataliza la oxidación de la glucosa en ácido glucónico (a través de la formación de gluconolactona) (...)” (Dinda et al., 2018).

Figura 3.3

Reacción de la transformación de la glucosa a ácido glucónico con la ayuda de la GOx



Fuente: (Dinda et al., 2018).

3.1.2 Biosensores para glucosa.

Los biosensores son pequeños dispositivos que analizan material biológico, y son útiles en diversas áreas, desde el área médica, hasta la alimenticia y atención del medio ambiente. “(...) disponen de mecanismos para el análisis de la composición de los alimentos, residuos de agroquímicos, toxinas, alérgenos, presencia de patógenos, materiales antinutrientes, presencia de organismos genéticamente modificados, control de procesos y contaminantes ambientales, entre otros, en tiempo real” (Jiménez C. & León P., 2008).

Leland C. Clarck Jr., junto con Lyon fueron los primeros desarrolladores de un sensor para medir la glucosa en sangre, el cual fue comercializado en 1975.

En 1962, surgió este concepto gracias a los trabajos de Leland C. Clark Jr., que trabajó en ellos desde 1956. Él junto con Lyon, construyó el primer sensor en su investigación sobre la detección rápida y confiable del nivel de glucosa sanguínea que se comercializó en 1975 (Meléndez, 2014).

La aparición de los biosensores fue creada en los años 70 y 80 de forma comercial, pero surge la idea desde los años 50. Con el paso de los años, los biosensores han sido mejorados, haciéndolos más sensibles y con mayor exactitud, usando diferentes técnicas de señalización del resultado.

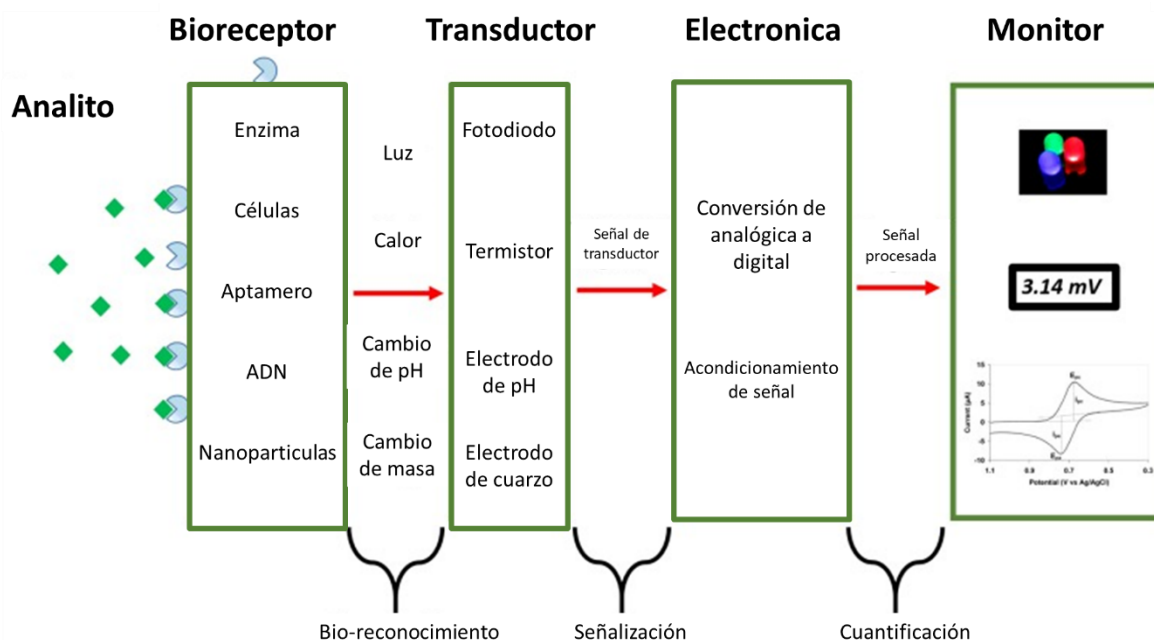
La fabricación de un biosensor requiere de varias disciplinas, como lo es la Electroquímica, Bioquímica, Fisicoquímica, Nanotecnología, Biotecnología, Bioinformática, Medicina, entre otras.

(...) estudio de las interacciones de los elementos de bio-reconocimiento con analitos biomoleculares, la inmovilización de biomoléculas en superficies sólidas, el desarrollo de químicas de superficies antiincrustantes, el diseño y la fabricación de dispositivos, integración de la biología con los dispositivos, micro fluidos, electrónica en chip, empaque, técnicas de muestreo, etc. (Bhalla et al., 2016).

Bhalla et al., (2016) menciona que se busca la mejora hacia estos dispositivos mejorando su reproductividad, repetibilidad, selectividad, estabilidad y linealidad.

Figura 3.4

Esquema general del funcionamiento de un biosensor



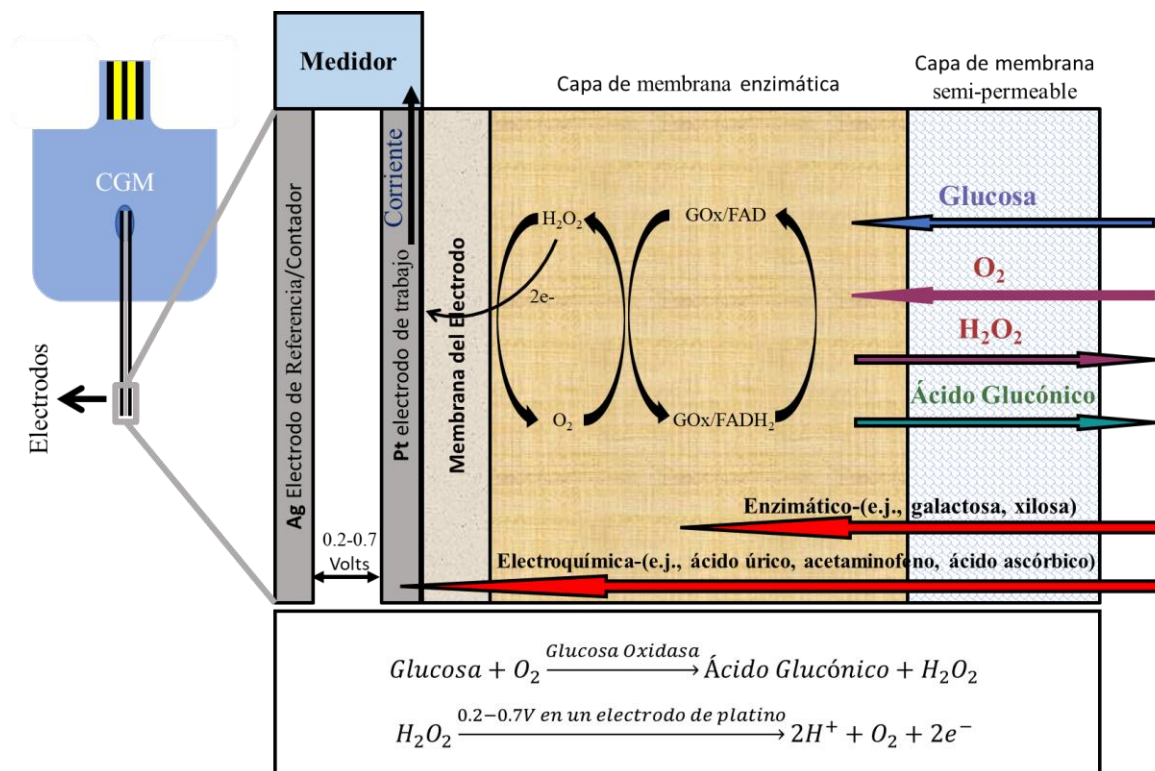
Fuente: (Bhalla et al., 2016) [traducido]

La figura 3.4 ilustra esquemáticamente a un biosensor, se puede observar que, comienza llegando el analito, el cual es la sustancia de interés al bio-receptor, este puede ser cualquiera de los que enlistan en la imagen, enzimas, células, aptámeros, ADN o nanopartículas. El bio-receptor genera algo llamado bio-reconocimiento que “(...) es el proceso de generación de señales (en forma de luz, calor, pH, cambio de carga o masa, etc.)

tras la interacción del bio-receptor con el analito” (Bhalla et al., 2016). El transductor cambiará una energía a otra, a una señal medible, conocido como señalización, “(...) En un biosensor, la función del transductor es convertir el evento de bio-reconocimiento en una señal medible.” (Bhalla et al., 2016). La parte electrónica procesará esta señal y la preparará para poder visualizarla y la mandará a la pantalla, la cual interpretará en forma numérica, gráfica, tabular o en una imagen el resultado.

Figura 3.5

Representación del proceso por el cual funciona un biosensor de glucosa



Fuente: (Boehm et al., 2019) [traducido].

En la figura 3.5 muestra cómo funciona un biosensor de glucosa, incluidas las reacciones químicas que se llevan a cabo. Primero, la glucosa entra a través de una membrana semipermeable junto con el oxígeno, la GOx, con su cofactor FAD, catalizan la reacción de la glucosa con el oxígeno dando como producto peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. “(...) El peróxido de hidrógeno a su vez es oxidado por el sistema de electrodos para generar corriente. Un algoritmo en el receptor y/o transmisor inalámbrico convierte la corriente en un valor de concentración de glucosa que se muestra en el monitor.” (Boehm et al., 2019).

Cabe destacar que existen tres tipos de biosensores, los ópticos, los cuales aprovechan las propiedades de la luz para generar una señalización, los acústicos, que utiliza las ondas acústicas mecánicas como transductor “(...) Éstos son los dispositivos en los cuales las ondas acústicas mecánicas actúan como el sistema de la transducción (...)” (Mandal, 2019b), y los electroquímicos, estos biosensores solamente difieren en el transductor, el cual es un transductor electroquímico, y hace uso de electrodos. “(...) Éstos son útiles en señales electroquímicas, amperométricas y potenciométricas. Estos electrodos se hacen común de platino, de oro, de plata, de acero inoxidable, o de materiales inertes a base de carbono” (Mandal, 2019b).

Algunas de las propiedades que posee la luz, ya sea la de ser guiada a través de ciertas estructuras o la de sufrir fenómenos de resonancia, pueden ser aprovechadas para implementar un biosensor, que en este caso recibe el nombre de biosensor óptico. Su funcionamiento es esencialmente el mismo que el sensor de glucosa, sólo que ahora es la luz la que se encarga de proporcionarnos la información. (González Segura, 2004).

También existen biosensores con otro tipo de transductores y bio-componentes tal como se puede apreciar en la tabla 3.2.

Tabla 3.2

Componentes de un biosensor.

Bio-componentes	Transductores
Enzimas	Electroquímicos
Anticuerpos	Amperométrico
Fragmentos de ADN	Potenciómetro
Células bacterianas	Conductimétrico
Tejido (animal o vegetal)	Óptico
	Acústico
	Térmico

Fuente: (Sciarra Gatti, 2004).

Dentro de los biosensores electroquímicos se encuentran los biosensores amperométricos. “Los transductores amperimétricos, descubren los cambios en corriente que

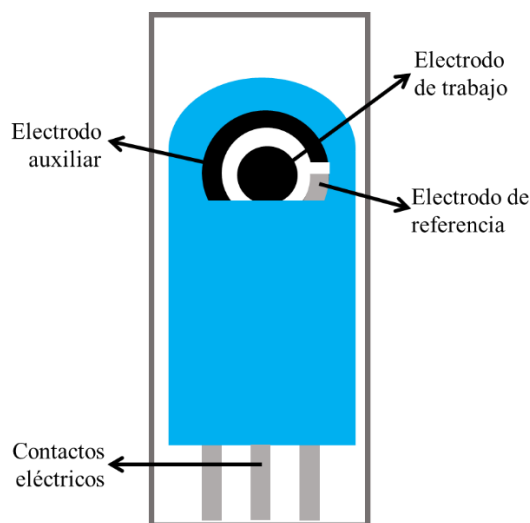
ocurren debido a la oxidación o a la reducción. La corriente refleja la reacción que ocurre entre el analito y el bioelemento” (Mandal, 2019b).

Gracias a que los biosensores electroquímicos usan la corriente y miden el cambio de esta por las reacciones de oxidación y reducción, se pueden usar en enzimas de la familia oxidorreductasas y así medir la corriente que genera la reacción con la glucosa.

Los biosensores en la actualidad tienen un electrodo serigrafiado (figura 3.6), así, es posible “llevarlos en la bolsa” debido a su pequeño tamaño. “Los electrodos serigrafiados así producidos ya constituyen un buen sistema de transducción y son útiles para la construcción de un buen número de sensores electroquímicos” (González García & Costa García, 2010).

Figura 3.6

Electrodo serigrafiado con 3 electrodos



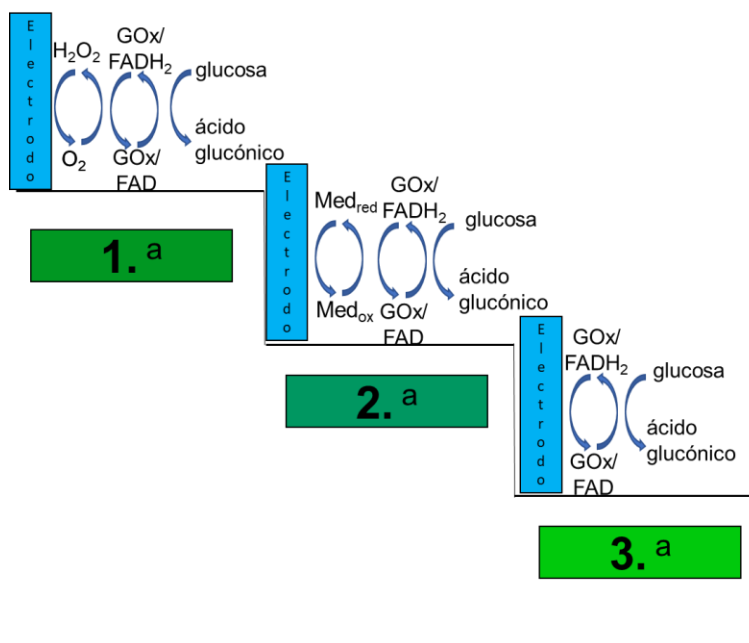
Fuente: (González García & Costa García, 2010).

Como Sciarra Gatti (2004) menciona en su artículo, para crear un biosensor de glucosa y que esté disponible en el mercado, debe de cumplir con ciertos requerimientos, exactitud, buena resolución, rango dinámico, velocidad de respuesta, compensación de temperatura, insensibilidad frente a interferencias eléctricas o del medio ambiente, y la posibilidad de calibración y testeo. Un biosensor es bueno cuando se cumplen estos requisitos, y es factible comercializarlo.

Los biosensores electroquímicos también funcionan con base a un mediador de oxidación, así se clasifican tipos de biosensores, los de primera generación, los de segunda generación y los de tercera generación (figura 3.7).

Figura 3.7

Representación esquemática del mecanismo de la oxidación enzimática de la glucosa para las tres generaciones de biosensores



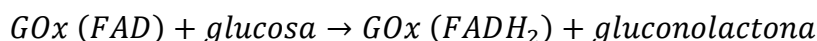
Fuente: (Hassan et al., 2021).

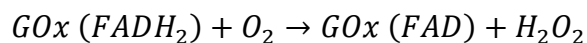
3.1.2.1 Biosensores de primera generación.

Los biosensores de glucosa de primera generación se caracterizan por usar oxígeno molecular para que actúe como mediador para la detección de glucosa y la generación de peróxido de hidrógeno. “La primera generación de biosensores enzimáticos de glucosa se basó en el oxígeno como mediador de oxidación para regenerar GOx (FAD), detectando así la glucosa mediante el control del oxígeno consumido, o la generación de H₂O₂ durante la reacción enzimática” (Hassan et al., 2021).

La reacción permite que el cofactor flavín adenín dinucleótido que se encuentra en la enzima GOx se reduzca por la reacción con la glucosa, cambiando a la enzima a su forma reducida y dando lugar a la gluolactona. Después, el grupo FAD se oxida nuevamente con el oxígeno y así, la enzima recupera su forma oxidada, produciendo peróxido de hidrógeno.

Las siguientes ecuaciones explican de forma resumida la reacción.





Fuente: (Wang, 2008).

Las mediciones de la formación de peróxido tienen la ventaja de ser más simple, especialmente con los dispositivos miniturizados. Tales mediciones se realizan comúnmente en un electrodo de platino a un potencial anódico moderado de alrededor de +0,6 V (frente a Ag / AgCl) (Wang, 2008).

Los biosensores de primera generación son bastante rentables en el mercado ya que tienen buenas ventajas. “(...) los biosensores enzimáticos de glucosa de primera generación son estables, simples y fáciles de usar en aplicaciones miniturizadas.” (Hassan et al., 2021).

Claro que toda ventaja viene acompañada de desventajas, en este caso, este tipo de biosensores tiene la desventaja de sufrir interferencias electroquímicas y, además, son dependientes de oxígeno. Aunque claro, a lo largo de los años, estas desventajas han sido minimizadas por los científicos, añadiendo una membrana permselectiva y/o incrementando la permeabilidad de oxígeno y glucosa.

(...) En un nivel de alto potencial, algunas especies coexistentes como el ácido ascórbico y el ácido úrico son electroactivos, reduciendo la selectividad y precisión del biosensor. Este problema fue minimizado utilizando una membrana permselectiva, reduciendo el acceso de los interferentes a la superficie del transductor biosensor (...).

(...) la tensión de fluctuación de oxígeno y la limitación estequiométrica del oxígeno usualmente se refiere a la “deficiencia de oxígeno” (la concentración normal de oxígeno es de magnitud más baja a los niveles de glucosa fisiológico) (...). (Hassan et al., 2021).

La deficiencia de oxígeno y las especies que pueden coexistir, tienden a reducir la señal que existe al momento de la reacción, en otras palabras, la señal producida al momento de la reacción no va a ser leída por el medidor de manera correcta, produciendo un error en cuanto a la selectividad y la precisión del biosensor. A causa de estos inconvenientes, se optó por buscar una forma de reemplazar al oxígeno, con la intención de mejorar la señal del biosensor.

No sólo se buscó la forma de reemplazar al oxígeno, sino también se optó por buscar la adaptación de este mismo en los biosensores y así mismo aumentar la selectividad y precisión de este.

(...) Un enfoque se basa en el uso de películas que limitan el transporte de masas (como poliuretano o policarbonato) para adaptar el flujo de glucosa y oxígeno, es decir, aumentando la relación de permeabilidad oxígeno / glucosa. Un electrodo cilíndrico bidimensional, diseñado por el grupo de Gough's, ha sido particularmente atractivo para abordar el déficit de oxígeno al permitir que el oxígeno se difunda en la enzima región del sensor en ambas direcciones mientras que la glucosa se difunde solo desde una dirección (del extremo expuesto). (Wang, 2008).

3.1.2.2 Biosensores de segunda generación.

Los biosensores de glucosa de segunda generación, ya no emplean el oxígeno molecular como aceptor de electrones, en su lugar ocupan un mediador sintético con la capacidad de trasladar electrones desde la enzima al electrodo, este biosensor “se basó en el uso de un Med_{ox} artificial para mediar el ciclo GOx en lugar de depender del oxígeno como mediador para transportar electrones hacia y desde el sitio activo de la enzima.” (Hassan et al., 2021).

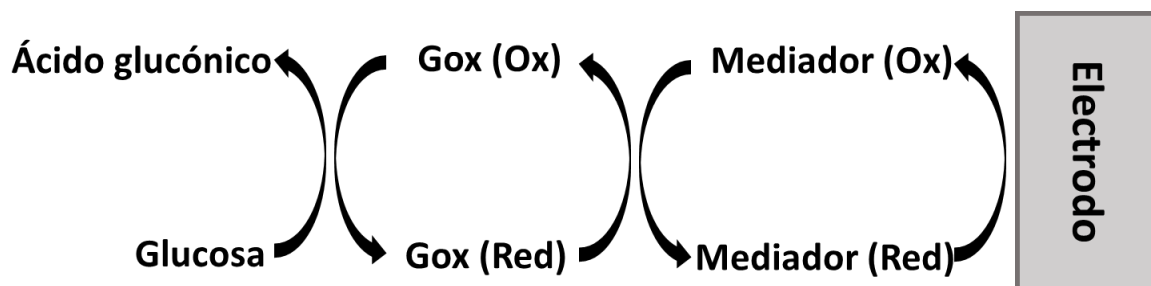
Un factor limitante es la transferencia de electrones del sitio activo (FAD) al electrodo, pues existe una gran barrera que cubre al sitio activo, Wang (2008) describe que “(...) la transferencia de electrones entre el sitio activo del GOx y la superficie del electrodo es el factor limitante en el funcionamiento de biosensores amperométricos de glucosa. La GOx no transfiere electrones directamente a los electrodos convencionales debido a una gruesa capa de proteína que rodea su centro redox flavina adenina dinucleótido (FAD) e introduce una barrera intrínseca a la transferencia directa de electrones”.

El biosensor funciona formando ácido glucónico a partir de la glucosa y la enzima GOx en estado oxidado, de ahí que se genera la enzima reducida, esta interactúa con el mediador oxidado, dando como producto a la GOx oxidada de nuevo y a mediadores reducidos los cuales, al interactuar y dar la señal a los electrodos, este se transforma a su

estado oxidado de nuevo creando un ciclo (figura 3.8), el cual va a reaccionar dependiendo de la concentración de glucosa.

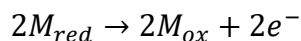
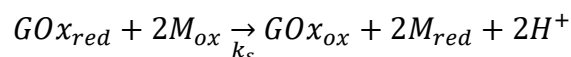
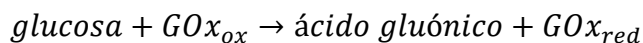
Figura 3.8

Secuencia de los eventos que ocurren en la reacción de un biosensor de segunda generación



Fuente: (Wang, 2008) [traducido].

Las siguientes ecuaciones explican de forma resumida la reacción.



La tabla 3.3 muestra algunos de los mediadores utilizados en glucómetros comerciales.

Tabla 3.3

Sistemas electroquímicos para el monitoreo de glucosa en sangre.

Compañía	Marca	Enzima	Mediador
Abbot/Medisense	Precision	GOx	Ferroceno
Bayer	Elite	GOx	Ferrocianuro
LifeScan	SureStep	GOx	Ferrocianuro
Roche-Diagnostics	Accu-Check	GOx	Ferrocianuro
Therasense	FreeStyle	GOx	Osmio

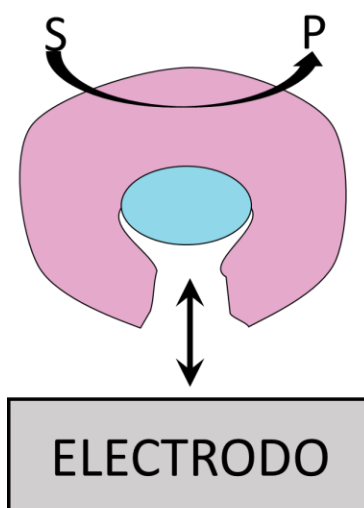
Fuente: (Ramírez Delgado, 2015).

3.1.2.3 Biosensores de tercera generación.

Los biosensores de tercera generación usan energía de transmisión directa (DET) que dependerá de la distancia entre el centro redox y el electrodo. “El concepto fundamental de DET fue propuesto por Heller y Degani que demostraron la posibilidad de conectar el sitio activo de la enzima covalentemente a la superficie del electrodo usando un polímero redox.” (Hassan et al., 2021).

Figura 3.9

Esquema del biosensor de tercera generación



Fuente: (Wang, 2008).

El proceso lo describe Wang (2008) de forma en que el electrón es transferido directamente de la glucosa al electrodo por la vía del sitio activo de la enzima. En la figura 3.9 representa que el sustrato, en este caso la glucosa, entra en contacto con la enzima, el cual, al realizar su proceso de oxidación y reducción, generará un producto, el ácido glucónico y los electrones que tiene disponibles el $FADH_2$ harán que el electrodo pueda dar una señal.

Se cree que este dispositivo es más eficiente que los de la generación uno y dos, sin embargo, todavía presta restricciones, debido a que la enzima puede ser activada por ciertos factores ambientales.

(...) la actividad de la enzima puede verse influenciada por factores ambientales externos como la temperatura, el pH y la humedad. Además, el rendimiento del

biosensor también depende del grosor de la capa enzimática con un grosor de capa alto que da como resultado una atenuación o pérdida de la señal. (Hassan et al., 2021).

3.2 Mediadores redox en biosensores de glucosa de segunda generación.

3.2.1 Características de mediadores redox.

Como vimos en el punto 3.1.2.2 de la sección de antecedentes, los biosensores electroquímicos de glucosa de segunda generación usan mediadores sintéticos en lugar del oxígeno para llevar a cabo las funciones de transferencia electrónica con la enzima GOx y el electrodo, para poder detectar los niveles de glucosa, así, los tipos de mediadores varían por cada empresa que las fabrica y abre la posibilidad de encontrar un mediador más conveniente.

Las características de los mediadores las describe (Harwood & Pouton, 1996) de la siguiente forma:

- (i) Debe ser químicamente estable en las formas oxidada y reducida.
- (ii) Debe tener un potencial redox que muestre poco o ningún cambio en condiciones de variación de pH.
- (iii) Debe ser de fácil inmovilización a la superficie del electrodo
- (iv) Debe ser operado por un potencial de electrodo relativamente bajo, para que no exista interferencia de otras especies que se puedan oxidar en el electrodo.
- (v) Con referencia al sensor de glucosa debe reaccionar rápidamente con la fabricación FADH₂ de las flavoenzimas.

Para que un mediador redox sea bueno, cabe resaltar que el potencial redox del mediador debe de ser mayor al potencial redox de la GOx, el cual Ramírez Delgado (2015) reporta que el potencial redox de la GOx es de -0.22 V vs ENH.

3.2.2 Mediadores redox orgánicos y mediadores redox inorgánicos.

Como se puede apreciar, existe gran variedad de mediadores que cumplen con la función requerida, y muchos más siguen siendo estudiados. Los mediadores pueden dividirse en dos grupos, los orgánicos y los inorgánicos.

Los derivados de ferroceno, ferricianidas, sales conductoras orgánicas (particularmente TTF-TCNQ [tetratíafulvaleno-tetracianoquinodimetano]), compuestos de quinona, complejos con metales de transición, y compuestos de

fenotiacina y fenozacina, son particularmente útiles para el contacto eléctrico con GOx. (Wang, 2008).

Los más comunes y con mayor eficiencia, según Cruz Ramírez (2016), son derivados del ferroceno y complejos de osmio (II) y rutenio (II), también otros complejos con centros metálicos como el cobre, níquel, cromo y otros metales de transición.

Entre los mediadores redox orgánicos se encuentran los derivados de benzoquinona, quinonas, derivados de fenazina, fenotiazina, tetracianodimetano (TCNQ), tetratiafulvaleno (TTF), viológeno (Cruz Ramírez, 2016), metosulfato de fenazina y 2,6-diclorofenol (Ramírez Delgado, 2015).

Los mediadores redox inorgánicos que existen son ferrocianuro, derivados del ferroceno, octacianotungstato, hexacianoferrato y complejos metálicos (Ramírez Delgado, 2015), algunos óxidos, tales como Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , MnO_2 , SnO_2 y óxidos metálicos del grupo del platino, particularmente el IrO_2 , incorporados en pasta de carbón o tinta de impresión de pantalla (Cruz Ramírez, 2016).

La tabla 3.4 enlista los mediadores usados en la fabricación de biosensores.

Tabla 3.4

Sistemas electroquímicos para el monitoreo de glucosa en sangre

Enzima	Mediador	Potencial Redox (mV)
Glucosa oxidasa	a, b 1,1-dimetilferroceno	100 (vs SCE)
	a, b Ferroceno	165 (vs SCE)
	a, b Vinil ferroceno	250 (vs SCE)
	a, b Ácido carboxil ferroceno	275 (vs SCE)
	a, b Hidroximetil ferroceno	185 (vs SCE)
	a, b $[\text{Ru}(\text{CN})_6]^{4-}$	685 (vs SCE)
	a, b Benzoquinona	39 (vs SCE)
	a, b NMP	-161 (vs SCE)
	a, b TTF	300 (vs SCE)
	a, b TCNQ	127 (vs SCE)
	a, b $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	180 (vs SCE)
	a, b $[\text{Os}(1,10\text{-fenantrolina})_3]^{2+}$	675 (vs Ag/AgCl)

	^{a,b} [Os(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) ₃] ²⁺	485 (vs Ag/AgCl)
	^{a,b} [Os(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina) ₃] ²⁺	600 (vs Ag/AgCl)
	^{a,b} [Os(2,2-bipiridina) ₃] ²⁺	660 (vs Ag/AgCl)
	^{a,b} [Os(2,2-bipiridina) ₃]Cl ₂	655 (vs Ag/AgCl)
	^{a,b} [Ru(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) ₃] ²⁺	940 (vs Ag/AgCl)
	^{a,b} [Ru(1,10-fenantrolina) ₃] ²⁺	1156 (vs Ag/AgCl)
	^{a,b} [Ru(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina) ₃] ²⁺	1100 (vs Ag/AgCl)
	^{a, b} [Ru(2,2-bipiridina) ₃] ²⁺	1085 (vs Ag/AgCl)
	^{a, b} [Ru(2,2-bipiridina) ₃]Cl ₂	1090 Ag/AgCl)
Colesterol oxidasa	^b Hidroximetil ferroceno	190 (vs SCE)
	^b Ácido carboxil ferroceno	275 (vs SCE)
	^b [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180 (vs SCE)
Lactato oxidasa	^b [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180 (vs SCE)
	^b Ácido carboxil ferroceno	280 (vs SCE)
	^b Hidroquinona	60 (vs SCE)
Xantina oxidasa	^b Ácido carboxil ferroceno	275 (vs SCE)
	^b [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180 (vs SCE)
Lactato deshidrogenasa	^b Ácido carboxil ferroceno	275 (vs SCE)
	^b [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180 (vs SCE)
	^b TMPD	-10 (vs SCE)
	^b Ácido carboxil ferroceno	275 (vs SCE)
	^b [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	180 (vs SCE)
Glucosa deshidrogenasa	^b Ácido carboxil ferroceno	275 (vs SCE)
	^b 1,1-dimetil-ferroceno	100 (vs SCE)
	^b TMPD	-10 (vs SCE)
Galactosa oxidasa	^b Ácido carboxil ferroceno	275 (vs SCE)
	^b 1,1-dimetil-ferroceno	100 (vs SCE)

SCE: Saturated Calomel Electrode (Electrodo saturado de calomelanos).

Fuentes: (Cruz Ramírez, 2016 a; Ramírez Delgado, 2015 b).

Las desventajas que tienen estos mediadores son “(...) el tiempo de vida corto, la sensibilidad, las interferencias con sustancias que inhiben la señal, la dependencia del pH, así como su toxicidad, costos y difíciles métodos de preparación como los derivados de ferroceno, etc.” (Ramírez Delgado, 2015).

3.3 Mecanismos de transferencia electrónica de mediadores redox con la enzima glucosa oxidasa.

Como se afirmó arriba, para que pueda existir una señal en el biosensor, se necesita el factor de la transferencia electrónica, el cual está dado por el oxígeno molecular o por mediadores sintéticos que son útiles para cumplir esta función y así poder mandar una señal electroquímica. “La transferencia de electrones entre el mediador oxidado Med (Ox) y el GOD reducido ($FADH_2$) es el paso clave para mejorar la señal de corriente, lo que mejora el rendimiento de las aplicaciones bioelectrónicas.” (Hernández-Padilla et al., 2021).

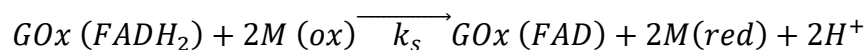
3.3.1 Teoría de Marcus-Hush

Para comprender mejor este tema, esta teoría considera que tanto los reactivos como productos tienen que tener la misma energía como se describe en el siguiente enunciado.

Un primer supuesto de la teoría de Marcus-Hush es considerar que el electrón se transfiere solo cuando los estados reactivo y producto tienen la misma energía, como lo requiere la aproximación de Franck-Condon y el principio de conservación de energía en ausencia de interacción con fuentes de energía externa (como fotones). (López-Estrada et al., 2018).

Dentro de la ecuación para pasar de reactivo a producto, existe una constante de velocidad, la cual es necesaria para generar una señal, esta constante es la k_s o constante homogénea de velocidad de transferencia de electrones. Cruz-Ramírez et al. (2019) sugieren que k_s sigue la teoría de la relación cruzada de Marcus, que indica la capacidad de las especies de ganar o perder electrones, que depende de la diferencia de potenciales redox entre Med (red) / Med (ox) y el sitio activo catalítico de la enzima GOD FAD / $FADH_2$ (-0,2 V vs NHE).

La siguiente ecuación muestra el comportamiento de la constante homogénea de velocidad de transferencia de electrones (k_s) en la reacción de reducción de la enzima GOx, ecuaciones ya vistas previamente.



Acorde con la ecuación, se observa que el valor de k_s es vital para que la reacción pueda cumplirse, generando una señal, y como se ha mencionado antes, la k_s sigue la relación cruzada de Marcus a través de la siguiente ecuación.

$$k_s = \sqrt{f_{12}k_{11}k_{22}K_{ET}}$$

(...) k_{11} y k_{22} son las constantes de tasa de transferencia de electrones de autointercambio y f_{12} es un parámetro que relaciona k_{11} y k_{22} con la tasa de colisión de los reactivos. K_{ET} es la constante de equilibrio para la transferencia de electrones, obtenida al igualar las ecuaciones de Nernst de los pares Med (Red) / Med (Ox) y GOx (FAD) / GOx (FADH₂) y, calculada con la diferencia de potenciales redox intercambiando n electrones. (Hernández-Padilla et al., 2021).

En la ecuación continua, se observa que entre mayor sea el valor de GOx (FAD) / GOx (FADH₂), más pequeño será el valor de K_{ET} , y entre menor sea este valor, más negativo será el valor de k_s , por lo que entre mayor sea el valor del potencial de los mediadores, la reacción será favorecida. Dicho esto, el objetivo primordial para que la reacción se vea favorecida, la k_s debe ser alta.

En el caso particular de un mediador redox con la enzima glucosa oxidasa, como primera aproximación, se ha observado que a medida que el potencial redox del mediador es mayor al del sitio activo de la enzima GOx, FAD/FADH₂ (-0.22 V vs ENH), se espera un valor alto de constante de transferencia electrónica homogénea (k_s), según la relación cruzada de Marcus. Para que la reacción sea favorecida termodinámica y cinéticamente. (Cruz Ramírez, 2016).

$$K_{ET} = 10^{\frac{[E_{Med(ox)/Med(red)}^0 - E_{GOx(FAD)/GOx(FADH_2)}^0]}{0.059}}^n$$

Este valor depende de la diferencia de los potenciales redox de los mediadores y el sitio activo de la proteína.

Al final, la ecuación matemática que describe el cálculo de k_s , se apreciaría de la siguiente manera.

$$k_s = \sqrt{f_{12}k_{11}k_{22} \left(10^{\frac{[E_{Med(ox)/Med(red)}^0 - E_{GOD(FAD)/GOD(FADH_2)}^0]}{0.059}]^n} \right)}$$

3.3.2 Modelo de efecto túnel

A diferencia al modelo de Marcus que utiliza solamente los potenciales redox de los mediadores y del sitio activo de la proteína, este modelo toma en cuenta también las distancias que existen entre los mediadores y el sitio activo de la proteína.

La asociación del modelo del efecto túnel proviene de los estudios de Devault y Chance.

(...) DeVault y Chance reportaron que el milisegundo de la transferencia electrónica fue a temperaturas independientes de 120 K a 4 K y dedujeron que la reacción procedió a través de un mecanismo de tunelización cuántica, quizá tomando lugar sobre una distancia tan larga como 30 Å. Ellos sugirieron que la transferencia de electrones de largo alcance puede ser común y esencial a la energía redox biológica de los cloroplastos y mitocondrias. (...) (Moser et al., 1992).

En el modelo anterior vimos que la K_{ET} depende de la diferencia de potenciales, si embargo, en su mismo artículo, habla también de esta constante de equilibrio tomando en cuenta las distancias del donador y el aceptor de electrones. La ecuación que representa este comportamiento es la siguiente.

$$K_{ET} = \left(\frac{2\pi}{h} \right) V_R^2 FC$$

Moser et al., (1992), explica que el índice de transferencia de electrones proviene de las reglas de oro de Fermi, que son derivadas de la teoría de la perturbación de la mecánica cuántica. El mismo artículo explica que V_R^2 es el símbolo del acoplamiento electrónico “(...) elementos de la matriz de la mecánica cuántica del acoplamiento de los reactivos y funciones de onda electrónicas del producto (...)” (Moser et al., 1992). FC es el factor de Franck-Codon “(...) superposición integrada de funciones de onda de reactivos y productos de misma energía (...)” (Moser et al., 1992). Y la h es la constante de Planck.

Para representar el factor FC y V_R^2 (Moser et al., 1992) propone en las siguientes ecuaciones que V_0^2 es el máximo acoplamiento eléctrico, R la distancia del centro del borde

del átomo del donador al centro del borde del átomo aceptor y β el coeficiente exponencial de decaída del acoplamiento eléctrico con R. FC es la expresión semiclásica de Hopfield, en la cual toman en cuenta la variación de la distribución con correcciones cuánticas a bajas temperaturas (σ^2).

$$V_R^2 = V_0^2 e^{(-\beta R)}$$
$$FC = (2\pi\sigma^2)^{-1/2} \exp [-(\Delta G - \lambda)^2 / 2\sigma^2]$$

La distancia es un factor importante al determinar la transferencia electrónica en modelos biológicos. “La selección de la distancia, la energía libre y la reorganización de la energía son suficientes para definir el índice y la dirección de la especificidad de la transferencia electrónica biológica, conociendo sus requerimientos fisiológicos en diversos sistemas.” (Moser et al., 1992).

3.3.3 Interacción molecular mediador-GOx

Ambos modelos son importantes a la hora de explicar como sucede la transferencia electrónica de un átomo a otro, como lo es el caso del complejo al sitio de unión de la proteína. Los modelos vistos anteriormente, explican cómo se podría dar la transferencia electrónica, como vimos, el modelo de Marcus no depende de la distancia, pero sí de sus potenciales redox, este modelo nos servirá cuando los átomos se encuentran a distancias cercanas, ya que no se requiere de otro factor más que los potenciales redox, y el modelo del efecto túnel explicaría la transferencia de electrones cuando las sustancias se encuentren muy alejadas, dado que, como se afirmó en el punto anterior, los electrones necesitarán pasar la barrera que la proteína impone.

En el trabajo de Hernández-Padilla et al. (2021), utilizan estos modelos para observar el comportamiento de dos complejos diferentes con la enzima GOx, y cada complejo sigue un modelo diferente respecto a las distancias y potenciales usadas para cada uno. Los complejos que se usaron en el artículo son $[\text{Co}^{\text{II}}\text{L}_3]^{2+}$ y derivados de ferroceno. La tabla 3.5, obtenida del mismo artículo, y los datos referidos en dicha tabla fueron obtenidos por fuentes bibliográficas, por docking molecular, y calculadas por medio de las ecuaciones antes mencionadas. Los complejos de cobalto tienen unas distancias lejanas respecto al sitio activo de la enzima, de modo que seguirían el modelo del efecto túnel y los derivados de ferroceno,

al tener distancias más cortas respecto al sitio activo de la enzima, estarían siguiendo el modelo de Marcus para la transferencia de electrones.

Tabla 3.5

Datos de potenciales redox (E^0), constante homogénea de velocidad de transferencia de electrones (k_s), equilibrio constante para la transferencia de electrones (K_{ET}), energías de interacción de la enzima GOx con $[Co^II L_3]^{2+}$ y derivados de ferroceno

Compuesto	E^0V/ENH	$\log k_s$	Energía de interacción (E_{int}) kJ/mol	$\log K_{ET}$	Distancia M(II)...N ₅ (FAD) (Å)
[Co(5-NO₂-phen)₃]²⁺	0.642	4.3	-76.24	14.3	15.0
[Co(5-Br-phen)₃]²⁺	0.491	4.1	-75.28	11.7	16.3
[Co(5-Cl-phen)₃]²⁺	0.504	4.2	-71.98	11.9	20.4
[Co(phen)₃]²⁺	0.376	3.2	-69.07	9.7	32.9
[Co(5-CH₃-phen)₃]²⁺	0.323	n.o.	-69.83	8.8	21.8
Fc-CH₂NH(CH₃)₂	0.636	5.72	-50.74	14.25	5.5
Fc-COOH	0.533	5.30	-63.6	12.15	5.0
Fc-CH=CH₂	0.486	4.48	-64.45	11.71	4.4
Fc-H	0.401	4.41	-57.29	10.27	4.3
Fc-1,1-CH₃	0.336	4.89	-55.79	9.17	4.4

Fuente: (Hernández-Padilla et al., 2021).

En conclusión, para que un modelo nos dé la información más confiable, requerimos el conocimiento de la distancia que existe entre la proteína y los complejos.

4. Planteamiento del problema

La Diabetes Mellitus, al ser una enfermedad de gran importancia a nivel mundial, genera una amplia gama de investigación, la cual, dentro de estas investigaciones se encuentra la búsqueda de biosensores que monitoreen el nivel de glucosa circulante en el torrente sanguíneo, buscando aquellos que sean más económicos y con mayor efectividad de cuantificación. En la actualidad existen diversos mediadores en el mercado, y gracias al estudio de Cruz-Ramírez et al. (2019) llevados a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, o también conocido como CIDETEQ, confirman la coexistencia de ciertos complejos metálicos con ligandos de bipyridinas y fenantrolinas, las cuales demuestran una buena capacidad de interacción con la enzima glucosa oxidasa de cepas de *Aspergillus niger*. Gracias a estos estudios, surge la idea de implementar ligandos de bipyridinas y fenantrolinas con complejos metálicos de hierro, con la finalidad de mejorar significativamente el costo del producto y su efectividad a los biosensores ya presentes en el mercado. El análisis de cada complejo metálico con estados reducido y oxidado junto con la glucosa oxidasa, dentro y fuera del sitio activo, ayudarán a predecir la interacción molecular más conveniente entre los complejos metálicos estudiados, es decir, evaluar si estos mediadores cumplen con las características necesarias para poder fabricar biosensores de mejor calidad.

5. Hipótesis

Los complejos de coordinación tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) y tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) sustituirán al oxígeno como el aceptor final de electrones en la reacción enzimática de la enzima glucosa oxidasa de la cepa de *Aspergillus niger*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Estudiar la energía de acoplamiento de los complejos de coordinación $M^{II}L_3$ y $M^{III}L_3$ usando bipyridinas y fenantrolinas como ligandos y hierro como el centro metálico en la enzima glucosa oxidasa dentro y fuera de su sitio activo, estando oxidada y reducida, para predecir el correcto funcionamiento de transporte de electrones desde la enzima glucosa oxidasa hasta los mediadores.

6.2 Objetivos particulares

- 6.2.1 Buscar las estructuras de los complejos $M(II)L_3$ y $M(III)L_3$ usando bipyridinas y fenantrolinas como ligandos y hierro y rutenio como los centros metálicos, en CSD-enterprise 2021. Así como buscar en el Protein Data Bank la enzima glucosa oxidasa de la cepa *Aspergillus niger*, para su estudio de acoplamiento molecular.
- 6.2.2 Obtener las geometrías de mínima energía para cada complejo y realizar los cálculos por DFT para conocer los orbitales “frontera” involucrados en las interacciones intermoleculares.
- 6.2.3 Evaluar y comparar las energías de interacción de los complejos de coordinación obtenidos frente a la apoenzima y holoenzima glucosa oxidasa dentro y fuera de su sitio.
- 6.2.4 Evaluar y comparar las energías de interacción de los complejos de coordinación obtenidos frente a la holoenzima glucosa oxidasa en estado reducido dentro y fuera de su sitio.
- 6.2.5 Evaluar la llegada de la glucosa al sitio activo de la holoenzima glucosa oxidasa con las energías de interacción de los complejos de coordinación dentro y fuera de su sitio.

7. Desarrollo experimental

7.1 Hardware y Software

La experimentación se llevó a cabo en 2 computadoras, una computadora tipo Laptop HP Pavilio006E con procesador “AMD A8-7410 APU” con “AMD Radeon R5 Graphics”, 2.20 GHz, RAM 8.00 GB y sistema operativo de 64 bits en Windows 10 Pro. La siguiente PC usada con el fin de estudiar las interacciones moleculares es una PC con Intel® Core™ i9-10900, RAM 64.00 GB, 2.80 GHz, sistema operativo de 64 bits en Windows 10 Pro.

Los softwares descargados y páginas web se enlistan en la tabla 7.1.

Tabla 7.1

Softwares utilizados en este trabajo, expresando cuales son en línea, y cuales fueron descargados.

Softwares descargados	Páginas web
CSD-enterprise 2021	The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)
ConQuest 2021.1.0	Marvin JS
Mercury 2021.1.0	UniProt
Gaussian 09	RCBS Protein Data Bank
Glide	
MacroModel	
LigPrep	
Protein Preparation Wizard	

7.2 Metodología

7.2.1 Obtención y preparación de los complejos metálicos.

La búsqueda de complejos de coordinación $M^{II}L_3$ y $M^{III}L_3$ se realizó en el programa ConQuest 2021.1.0 de la paquetería de CSD-enterprise 2021, en la cual, se obtuvieron resultados para los complejos de coordinación de Fe^{2+} y Fe^{3+} con ligante Tris(2,2'-bipiridina) y Tris(1,10-fenantrolina). Se limitó a la selección de dichos cristales a aquellos que tuvieran un solvente de simple complejidad. Se descargaron los archivos en formato “.cif” encontradas en la página “The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)”. Las estructuras cristalinas se analizaron en el programa Mercury 2021.1.0, en este programa también se llevó a cabo la eliminación de disolventes con los que fueron cristalizadas, realizado este paso, las moléculas cristalizadas se guardaron en formato “.Mol2”.

7.2.2 Minimización de los complejos.

Los cálculos de la teoría del funcional de la densidad (DFT) para los mediadores redox, fueron realizados usando el programa Gaussian 09 (Frisch et al., 2018). La optimización de la geometría completa se ejecutó utilizando la función “optimización y frecuencia” con el fin de no encontrar frecuencias negativas, para el cálculo de DFT se realizó con los parámetros del método PBEPBE, la función base LANL2DZ y el parámetro de ajuste DEF2TZV, siempre añadiendo la carga correspondiente.

7.2.3 Obtención y validación de Targets

Los cristales de la enzima Glucosa Oxidasa fueron localizadas a través de la plataforma RCSB-PDB Protein Data Bank, página web que guarda gran cantidad de datos cristalográficos de las proteínas.

A partir de los cristales de la GOx en el RCSB-PDB, se limitó a resoluciones de 1 a 3 Å para garantizar la definición en los mismos; se eliminaron co-cristales y medios de cristalización, determinando únicamente moléculas de agua con interacción reportada o menor a 3.0 Å en el sitio catalítico de la proteína, en el módulo “Protein preparation wizard” utilizando como parámetros pH: 7.4 (considerado fisiológico), se revisó la estabilidad del modelo con su diagrama de Ramachandran para proceder a minimizar con el campo de fuerza OPLS4 con un gradiente de RMSD <0.3 Å (Madhavi Sastry et al., 2013), finalmente se utilizó el co-cristal para el proceso de re-docking con el módulo Glide (*Glide*, 2021) y la aceptación se definió a RMSD <2.0 Å.

7.2.4 Preparación de ligandos

Los ligandos de referencia (sustratos, inhibidores, ligandos endógenos y bloqueadores) se obtuvieron como co-cristal en las proteínas. Los derivados complejos previamente obtenido de cristal minimización con nivel OPLS4 y PRCG en el módulo MacroModel (*MacroModel*, 2021). Para el acoplamiento molecular, los ligandos se prepararon utilizando LigPrep de Schrödinger Suite (*LigPrep*, 2021), mediante el campo de fuerza OPLS4. Todos los posibles centros protonados y estados de ionización se calcularon para cada estructura usando Ionizer a pH de 7,4. Se seleccionaron los conformadores con la energía más baja para cada ligando.

7.2.5 Docking Molecular

El acoplamiento molecular entre los sitios de unión del receptor y los ligandos se realizó usando el módulo Glide (*Glide*, 2021) de Maestro 12.7 y la 'grid box' del receptor para cada diana se preparó usando el OPLS4. Cada cuadro de cuadrícula se construyó sobre la base de inhibidores o ligandos de referencia co-cristalizados, así como en el espacio global de la proteína para obtener los posibles sitios de interacción. El softening de las partes no polares de los receptores se llevó a cabo escalando los radios de van der Waals en un factor de 0,08. Los átomos se consideraron no polares si se determinaba que su carga atómica parcial absoluta era $<0,25$. En flexibilidad, se permitieron rotaciones de ligando adicionales para los grupos hidroxilo en Ser, Thr y Tyr, y el grupo tiol en los residuos Cys. Además, se mantuvo la posición de unión de energía más baja de cada ligando. Las energías de acoplamiento se realizaron en tres modos de detección virtual de alto rendimiento (HTVS), precisión estándar (SP) y precisión adicional (XP).

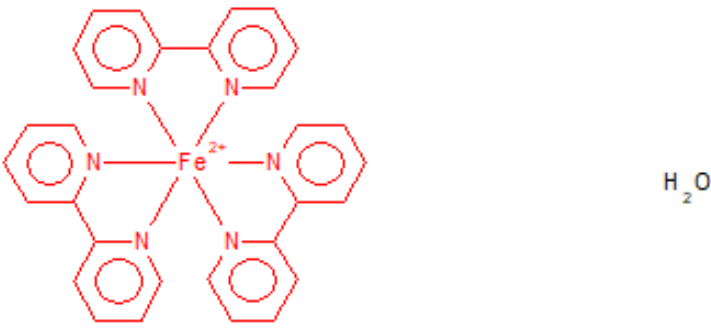
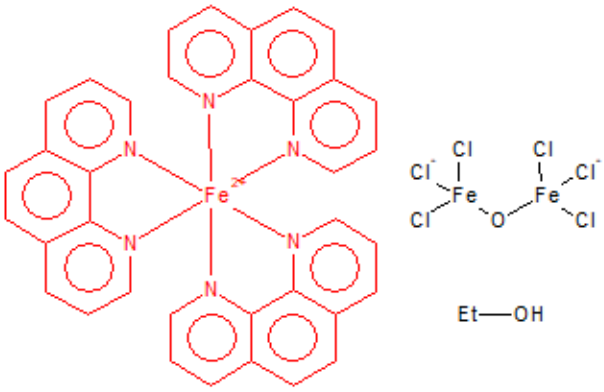
8. Resultados y discusión

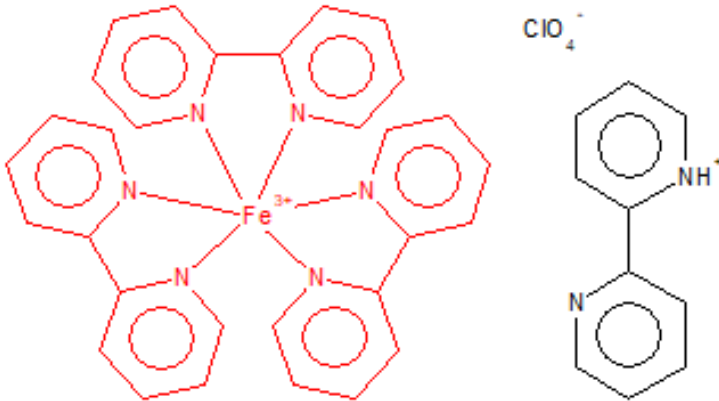
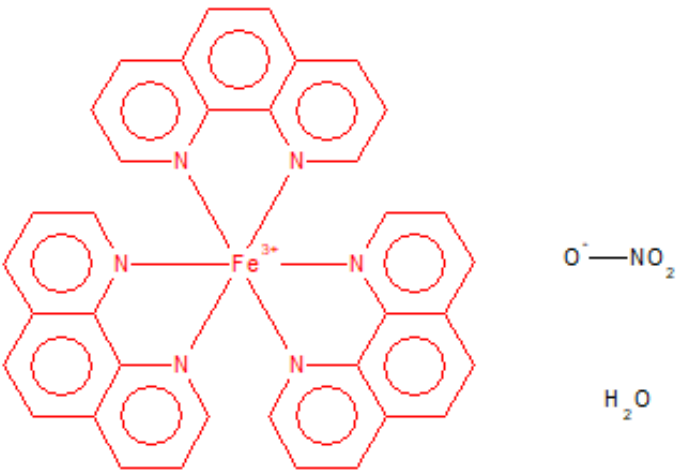
8.1 Obtención y preparación de los complejos metálicos.

La búsqueda de los complejos de coordinación $M^{II}L_3$ y $M^{III}L_3$ dio como resultado 4 moléculas diferentes enlistadas en la tabla 8.1. Estas moléculas tienen como centro metálico al hierro con estados de oxidación +2 y +3, unidos a ligandos de tres bipyridinas y tres fenantrolinas.

Tabla 8.1

Moléculas seleccionadas para el estudio, resaltando su nombre, la clave y estructura junto con la molécula del solvente con el que fue sintetizado.

Nombre	Clave CCDS	Estructura molecular
tris (2,2'-bipiridin) hierro (II)	UCOJAX01	 <p>Fuente: (Zhou et al., 2001).</p>
tris (1,10-fenantrolin) hierro (II)	AFIRAJ	 <p>Fuente: (Li et al., 2008).</p>

<p>tris (2,2'-bipiridin) hierro (III)</p>	<p>BPBPFE</p>	 <p>Fuente: (Figgis et al., 1978).</p>
<p>tris (1,10-fenantrolin) hierro (III)</p>	<p>BIPGEN</p>	 <p>Fuente: (Odoko & Okabe, 2004).</p>

8.2 Minimización de energía de los complejos.

Según Hernández-Padilla et al. (2021), existen estudios previos que indican que los resultados de DFT son precisos para describir estabilidades y geometrías de equilibrio. Dicho lo anterior, la optimización no presentó frecuencias negativas y las convergencias fueron cercanas a cero, esto quiere decir que la optimización fue exitosa. Las moléculas optimizadas se utilizaron para llevar a cabo el estudio de interacciones moleculares.

La minimización de las energías sirve para distribuir la energía alrededor de toda la molécula.

Figura 8.1

Estructuras moleculares de los complejos de coordinación.



a) tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) y (III)

b) tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) y (III)

8.3 Obtención y validación de Targets

La elección de una enzima requiere de valores que ayudarán a determinar la calidad global de la proteína con las medidas comparativas mostradas en la gráfica de la figura 8.2, demuestran diferentes parámetros que nos ayudaron a elegir adecuadamente a la proteína de mejor calidad, es decir, la proteína será de buena calidad si no hay muchas diferencias estructurales, que un átomo no se encuentre muy cerca de otro, que sus ángulos de torción no sean inusuales y que tampoco tengan conformaciones inusuales. En el gráfico de la figura 8.2, se busca que los percentiles relativos a todas las estructuras de rayos-X fueran lo más cercanas a cero, o visiblemente, más cercano al lado azul, esto nos dará la confiabilidad de trabajar con una proteína de buena calidad.

De acuerdo con Berman et al. (2003), los parámetros estadísticamente medibles presentados en la figura 8.2 significan:

Rfree: medida de ajuste del modelo a un pequeño subconjunto de datos experimentales.

Clashscore: medida derivada del número de pares de átomos en el modelo que están inusualmente cerca uno del otro.

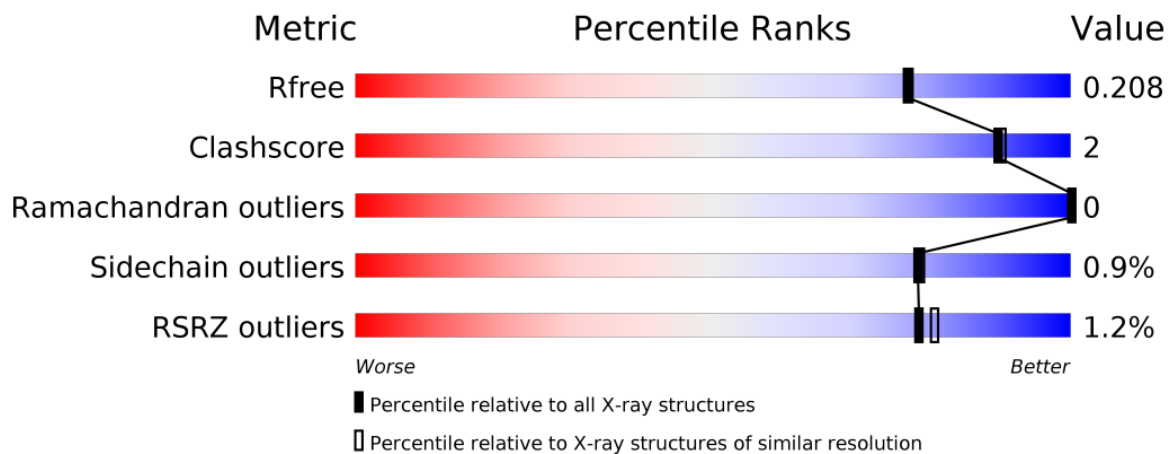
Ramachandran outliers: mide combinaciones de ángulos ϕ y ψ inusuales.

Sidechain outliers: mide combinaciones de valores de ángulos de torsión preferidos, los rotámeros o confórmeros rotámeros.

RSRZ outliers: mide específicamente la calidad del ajuste entre un tipo de residuo y un contenedor real o espacio real.

Figura 8.2

Gráfica de calidad de la proteína GOx cristalizada y con el nombre clave ICF3.



Fuente: (Berman et al., 2003).

Fue cristalizada a una resolución de 1.9 Å por difracción de rayos-X y sin presentar alguna mutación (figura 8.3) (Wohlfahrt et al., 1999).

Figura 8.3

Representación de la glucosa oxidasa resaltando de color morado la coenzima FAD en el sitio activo catalítico de la proteína.

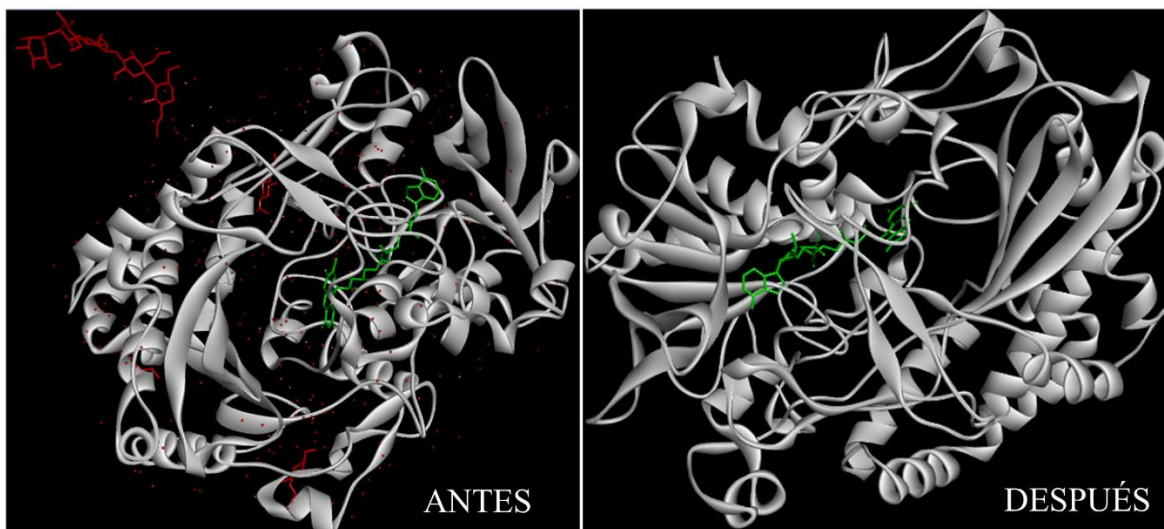


Fuente: (Wohlfahrt et al., 1999).

Antes de realizar el estudio de interacciones, se preparó la proteína quitándole los iones y moléculas de disolvente encontrados dispersos en el espacio de la proteína (figura 8.4). Posteriormente y de igual manera, se salvó en formato “.pdb”.

Figura 8.4

ICF3 glucosa oxidasa antes y después de la eliminación de residuos.

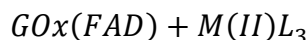


Fuente: (Dessault Systemes, 2021).

8.4 Estudio de interacciones moleculares

8.4.1 Estudio de la interacción de los mediadores M(II)L₃ y M(III)L₃ con la enzima GOx sin la reacción enzimática.

Primeramente, se analizarán los resultados de las interacciones moleculares antes de que suceda la reacción entre la enzima GOx y la glucosa, como se muestra en la siguiente ecuación.



La tabla 8.2, expone los valores de las energías de interacción obtenidos en el Docking Molecular de esta reacción enzimática que se obtuvieron al exponer los mediadores con la enzima GOx, estos mediadores son tris (2,2'-bipiridin) hierro (II), tris (2,2'-bipiridin) hierro (III), tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) y tris (1,10-fenantrolin) hierro (III). Así mismo, se analizó también a la apoenzima GOx y a la holoenzima GOx dentro y fuera del sitio activo catalítico por separado.

Se realizan las pruebas del mediador oxidado y el mediador reducido para que corrobore la respuesta electroquímica con las diferencias de energías, las cuales, según los

resultados, son muy cercanas a cero. Además, se analizan los estudios primeramente de la enzima GOx en estado oxidado (GOX/FAD) porque es el estado que está presente cuando no se encuentra el sustrato (glucosa), es decir, cuando no exista todavía un analito.

Tabla 8.2

Resultados del estudio de interacciones moleculares entre la apoenzima y holoenzima GOx con los complejos metálicos dentro y fuera del sitio catalítico de la enzima.

	trisbipy Fe(II) (kcal/mol)	trisbipy Fe(III) (kcal/mol)	trisfen Fe(II) (kcal/mol)	trisfen Fe(III) (kcal/mol)
EN EL SITIO CATALÍTICO				
GOx	26.32	26.25	37.79	38.09
GOx(FAD)	26.32	26.25	39.79	38.09
FUERA DEL SITIO CATALÍTICO				
GOx	-6.43	-6.44	-7.03	-7.04
GOx(FAD)	-6.43	-6.44	-7.03	-7.04

Al observar los resultados, se aprecia, en primera instancia que los mediadores no tienen buena energía de interacción dentro del sitio catalítico de la proteína, por lo que termodinámicamente sería imposible que esta reacción suceda. Este resultado es un punto a favor, porque de ser posible esta interacción, no habría una respuesta electroquímica, puesto que el mediador estaría tan embebido que no generaría una respuesta. Las razones por las que la enzima GOx no permite su entrada, es primeramente porque la enzima es específica para la glucosa, por ende, no permitirá la entrada de otra sustancia extraña como es el caso de estos mediadores, además, la estructura externa de la enzima, impide la entrada de moléculas grandes por impedimento estérico.

Las siguientes figuras ilustran la posición de cada uno de los mediadores, al observar cada una de ellas demuestra que sí importa el estado de oxidación que tengan los mediadores, puesto que se puede apreciar un ligero cambio en la posición de cada uno de los mediadores en sus dos estados estudiados, quiere decir que en este caso sí se presenta un cambio cuando entran en contacto con el FAD, no obstante, cuando la energía de interacción no tiene cambios estadísticamente significativos, los complejos no llegan a moverse de su misma posición, esto ocurre cuando se compara la apoenzima con la holoenzima y cada mediador en un mismo estado de oxidación.

Figura 8.5

8.5.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) unido al sitio catalítico de la apoenzima GOx.



8.5.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) unido al sitio catalítico de la apoenzima GOx.

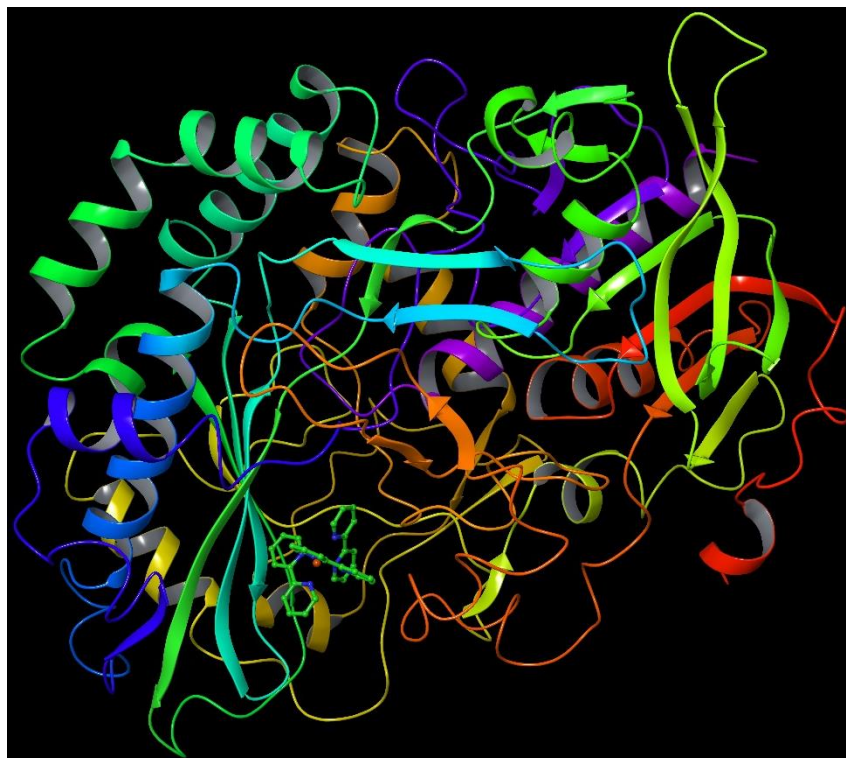


Figura 8.6

8.6.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) unido al sitio catalítico de la holoenzima GOx.



8.6.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) unido al sitio catalítico de la holoenzima GOx.

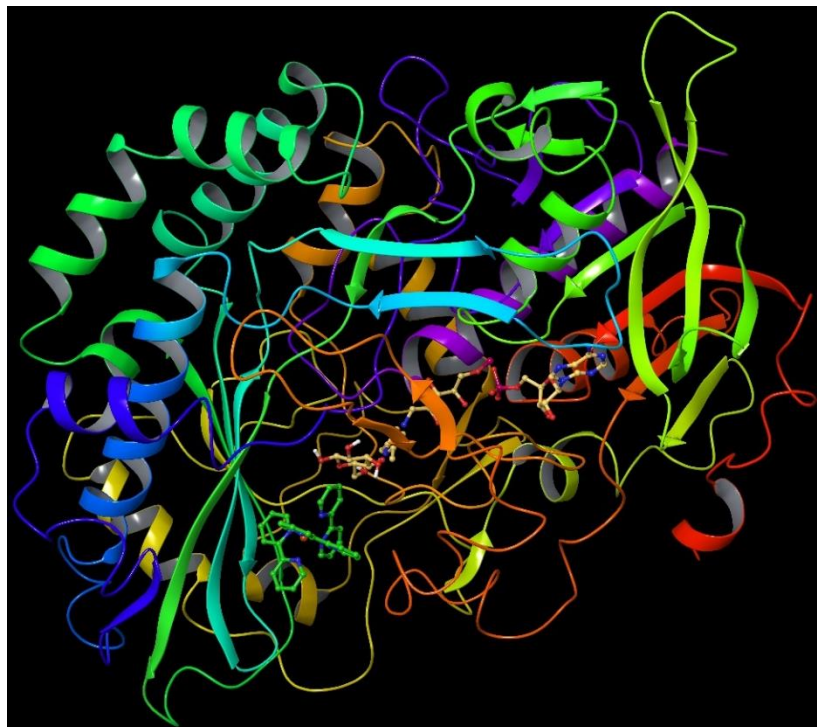


Figura 8.7

8.7.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) unido al sitio catalítico de la apoenzima GOx.



8.7.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) unido al sitio catalítico de la apoenzima GOx.



Figura 8.8

8.8.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) unido al sitio catalítico de la holoenzima GOx.



8.8.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) unido al sitio catalítico de la holoenzima GOx.



Como se observa en las figuras 8.7 y 8.8, la estructura de la molécula del ligando tris (1,10-fenantrolina), es más grande que el ligando tris (2,2'-bipiridina), por lo tanto, esta molécula ocupa un espacio mayor dentro del sitio catalítico de la proteína, dicho comportamiento hace que la estructura cambie de posición, alejándose más del sitio catalítico, y entre más alejada esté de ella, más difícil será la transferencia de electrones, razón por la cual, la energía de acoplamiento es menor dentro de la proteína para ligandos tris (1,10-fenantrolin).

Continuando con el análisis, los resultados fuera del sitio catalítico son favorables, puesto que tienen una energía de acoplamiento de carácter negativo, por lo tanto, termodinámicamente, los mediadores podrán interactuar con la enzima para posteriormente realizar el transporte de electrones hacia el electrodo, dando así una señal electroquímica.

Al ser una enzima del tipo oxido-reductasa, requiere de un ión metálico o una coenzima que le ayude a realizar su función. Tanto la apoenzima como la holoenzima presentan energías de acoplamiento iguales en cada mediador, se infiere que la interacción entre la enzima GOx y los mediadores son independientes de la coenzima, es decir, el FAD no interacciona con el mediador, más bien, el mediador interacciona con la GOx nada más.

Las diferencias de energías están dadas por una simple resta $Med_{ox} - Med_{red}$, el cual tiende a 0, gracias a ello se corrobora que la respuesta electroquímica del mediador sea el adecuado. Para ambos mediadores la diferencia de energías es de -0.01, quiere decir que tienen una tendencia a 0. Dicho lo anterior, al tender a 0, el potencial redox no cambia, dando así una buena respuesta electroquímica. También, este resultado nos confirma que la posición del mediador será la misma, como se expone en las siguientes figuras.

Figura 8.9

8.9.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) fuera del sitio catalítico de la apoenzima GOx.



8.9.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la apoenzima GOx.



Figura 8.10

8.10.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



8.10.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



Figura 8.11

8.11.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) fuera del sitio catalítico de la apoenzima GOx.



8.11.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la apoenzima GOx.



Figura 8.12

8.12.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



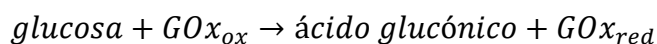
8.12.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



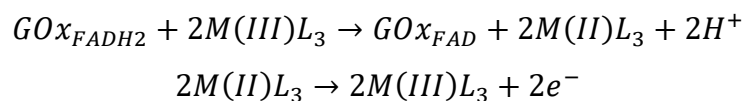
Los resultados que se obtuvieron de las energías de interacción fuera del sitio, ayudó a concluir que para este paso los complejos tris (1,10-fenantrolin) hierro son los que presentan mejores efectos, debido a que este presenta una mayor energía de interacción y la diferencia de ellas hace que tenga una buena respuesta electroquímica, además, al no unirse a la enzima en su sitio catalítico, cumplirá con la función de transportar electrones, y gracias a que la enzima no se mueve en ningún momento, este mediador es eficaz para la medición de glucosa, cabe resaltar que esto mismo pasa con los complejos tris (2,2'-bipiridin) hierro, no obstante, estos presentan una energía de interacción menor a la del otro complejo.

8.4.2 Estudio de la interacción de los mediadores M(II)L₃ y M(III)L₃ con la enzima GOx pasada la reacción enzimática.

En segundo lugar, se analizarán los resultados de las interacciones moleculares después de que la enzima GOx oxide a la glucosa, la enzima pasa de un estado oxidado a un estado reducido al adquirir los átomos de hidrógeno junto con sus electrones, como se muestra en la siguiente ecuación.



La GOx debe regresar a su estado oxidado nuevamente para poder continuar oxidando moléculas de glucosa, dicho proceso se lleva a cabo por medio del mediador, el cual actúa como un agente oxidante, quiere decir, el mediador aceptará los electrones provenientes del FADH₂ de la enzima, de esta forma, el mediador quedará reducido, con electrones de más, como lo indica la siguiente ecuación, estos electrones serán los que captará el electrodo generando una señal electroquímica.



La tabla 8.3, expone los valores de las energías de interacción obtenidos en el Docking Molecular de esta reacción enzimática. De igual forma que el estudio anterior, se obtuvieron al exponer los mediadores oxidados y reducidos con la enzima en estado reducido GOx(FADH₂) dentro del sitio catalítico y fuera del sitio catalítico.

Tabla 8.3

Resultados del estudio de interacciones moleculares entre la enzima GOx en estado reducido y los complejos metálicos dentro y fuera del sitio catalítico de la enzima.

	trisbipy Fe(II) (kcal/mol)	trisbipy Fe(III) (kcal/mol)	trisfen Fe(II) (kcal/mol)	trisfen Fe(III) (kcal/mol)
EN EL SITIO CATALÍTICO				
GOx(FADH ₂)+ gluconolactona	137.93	135.55	123.43	123.95
FUERA DEL SITIO CATALÍTICO				
GOx(FADH ₂)+ gluconolactona	-7.48	-7.5	-8.76	-8.76

La energía de acoplamiento dentro del sitio, resulta ser de mucha más baja energía que con la enzima en estado oxidado (véase tabla 8.2), quiere decir que además de la especificidad de la enzima y del impedimento estérico, existe otro factor que impide el paso de estas moléculas al sitio catalítico de la enzima, esto es debido que la molécula se encuentra en un estado electropositivo por tener 2 hidrógenos de más, repeliendo así a estas moléculas. Las siguientes figuras demuestran la posición preferida de las moléculas dentro del sitio catalítico de la enzima, aunque el cambio sea mínimo a simple vista imperceptible, si existe un cambio en la posición de cada uno de ellos.

Figura 8.13

8.13.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.

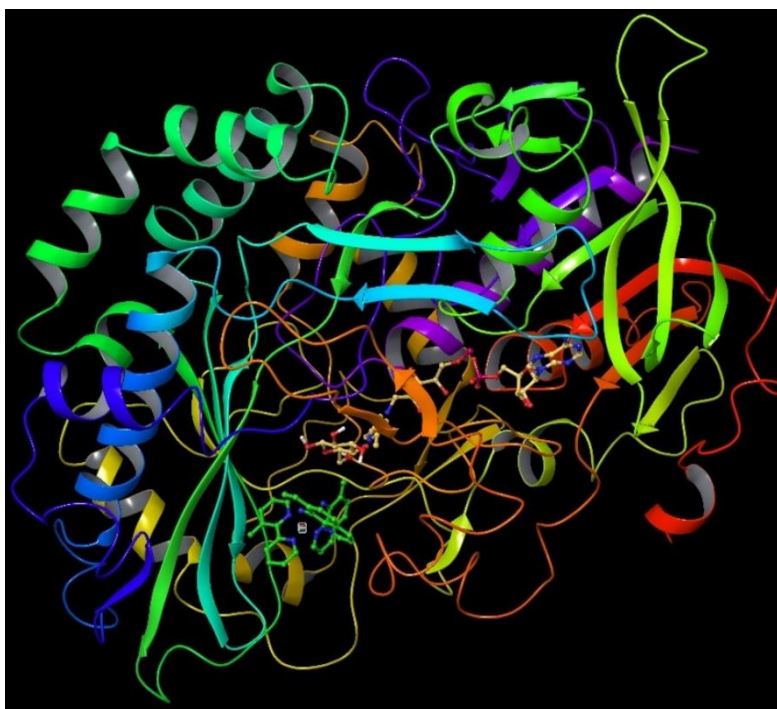


8.13.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.



Figura 8.14

8.14.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.



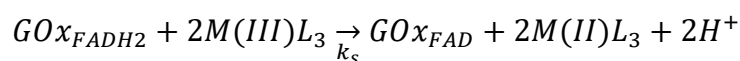
8.14.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.



Teniendo en cuenta este punto, cuando los mediadores se encuentran fuera del sitio catalítico de la enzima reducida (tabla 8.3), los resultados son favorable, puesto que, al igual que las energías de interacción con la enzima oxidada (tabla 8.2), se encuentran con valores positivos, quiere decir que termodinámicamente la interacción es posible. Dicho lo anterior, esta interacción es más fuerte en el mediador tris (1,10-fenantrolin) hierro (III).

Los resultados demuestran que cuando se pasa del estado 2+ a 3+ no hay cambios en las energías, es decir, no hay cambios en el potencial redox.

Llegado a este punto, entra en juego la constante de transferencia electrónica (k_s), el cual indica la velocidad de la reacción, como lo describe la siguiente ecuación.



$$k_s = \sqrt{f_{12}k_{11}k_{22}K_{ET}}$$

$$K_{ET} = 10^{\frac{[E_{Med(ox)/Med(red)}^0 - E_{GOD(FAD)/GOD(FADH_2)}^0]}{0.059}}$$

La k_s es directamente proporcional a la constante de equilibrio, la cual depende de la diferencia de potenciales entre el mediador oxidado y reducido, gracias a los resultados, se

confirma que este potencial no cambia, y como se mencionó en la sección 3.1, mientras mayor sean estos potenciales, la velocidad de la reacción va a ser mayor. Los potenciales de los mediadores están reportados en el trabajo de Cruz-Ramírez et al. (2019) y confirman que son mayor al potencial reportado de la enzima GOx el cual es de -0.22 V vs ENH (Ramírez Delgado, 2015), esto asegura que los mediadores tienen una buena velocidad de transferencia electrónica con la enzima GOx.

Finalmente, las siguientes figuras aseguran que las posiciones de los mediadores estén en el mismo lugar fuera del sitio catalítico de la enzima esté en estado oxidado o reducido, con ello se puede confirmar que estos mediadores son excelentes candidatos para la elaboración de un biosensor de segunda generación.

Figura 8.15

8.15.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.



8.15.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.



Figura 8.16

8.16.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.



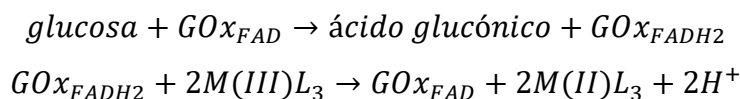
8.16.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx reducida.



Como se observa en las imágenes anteriores, y si se compara con las imágenes de las figuras 8.11 y 8.12, las posiciones de cada uno de ellos no cambian, siguen estando en el mismo sitio activo, debido a que esa posición es termodinámicamente más estable, gracias a ello, se garantiza que las moléculas se mantendrán acopladas en ese mismo lugar en cualquier etapa de la reacción. Además, como está fuera del sitio, se encuentra a una distancia lejana, por lo que se infiere que la transferencia de electrones está dada por el modelo del efecto túnel. La molécula que se observa en las imágenes de las figuras 8.13 y 8.14, además de los mediadores y el FADH₂, es la gluconolactona, esta molécula es el producto de la oxidación de la glucosa, dicha molécula no interfiere con el intercambio de electrones que existe entre la GOx y los mediadores. Hecha esta salvedad, se concluye que ambos mediadores tienen buenas energías de interacción, sus potenciales y posiciones siguen siendo los mismos, por lo que se pueden usar como catalizadores en biosensores de glucosa de segunda generación. Así mismo, el mediador tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) tiene una interacción más fuerte con la enzima, por lo que este mediador sería el mejor candidato para su uso en un biosensor.

8.4.3 Estudio de la interacción de los mediadores M(II)L₃ y M(III)L₃ con la enzima GOx un momento antes de llevarse a cabo la reacción.

La importancia de este estudio, es pensar que la glucosa podría llegar a afectar, impidiendo o disminuyendo la energía de interacción que existe entre los complejos y la enzima GOx. No obstante, cabe destacar que no importa si la glucosa está presente o no, puesto que la glucosa no forma parte de la reacción GOx(FADH₂)/Med_{ox}, es decir, la glucosa no interfiere en la transferencia de electrones de la GOx al mediador, como muestra la siguiente ecuación.



Este estudio tiene el mismo formato que los anteriores dos estudios, con el simple cambio de añadir a la glucosa al sitio activo de la enzima GOx en estado oxidado, dichos resultados se muestran en la tabla 8.4.

Tabla 8.4

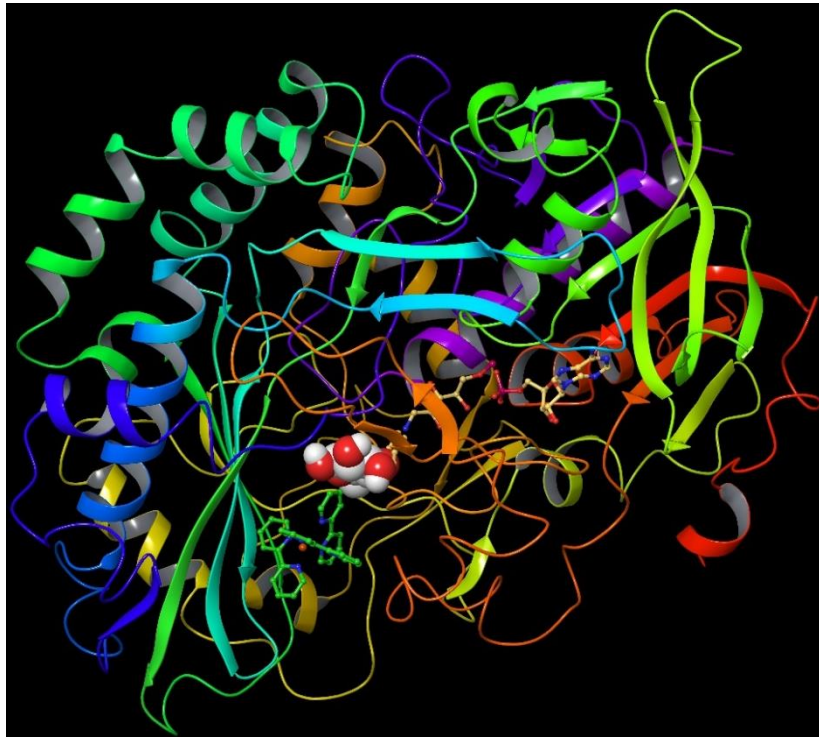
Resultados del estudio de interacciones moleculares entre la enzima GOx en estado reducido y los complejos metálicos dentro y fuera del sitio catalítico de la enzima.

	trisbipy Fe(II) (kcal/mol)	trisbipy Fe(III) (kcal/mol)	trisfen Fe(II) (kcal/mol)	trisfen Fe(III) (kcal/mol)
EN EL SITIO ACTIVO				
GOx(FAD)+Glucosa	27.75	28.68	56.43	56.84
FUERA DEL SITIO ACTIVO				
GOx(FAD)+Glucosa	-7.48	-7.5	-8.7	-8.71

Dentro del sitio activo de la enzima se observa un cambio respecto a los valores presentados en la tabla 8.2, la energía de interacción disminuye, este comportamiento se resume en que la enzima tendría forzosamente que dejar entrar a otra molécula, además de su sustrato, para ocupar el mismo sitio. Los mediadores tris (1,10-fenantrolin) hierro sufren una disminución aún mayor de la energía de acoplamiento debido a que ocupan un espacio más grande. Las siguientes figuras ilustran el sitio de unión de la glucosa en la enzima GOx y los mediadores.

Figura 8.17

8.17.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx.

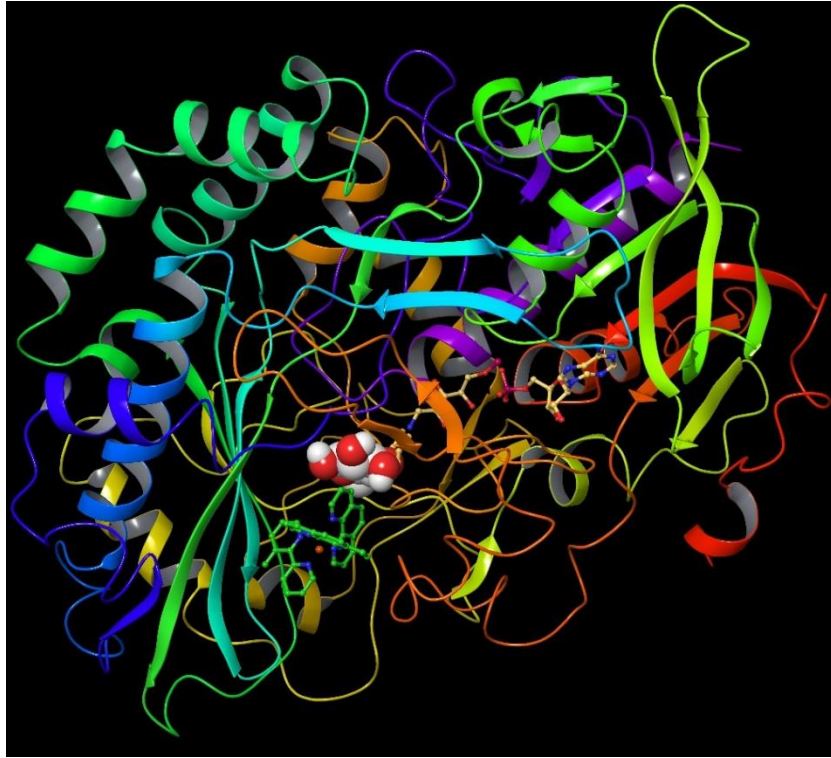


8.17.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx.

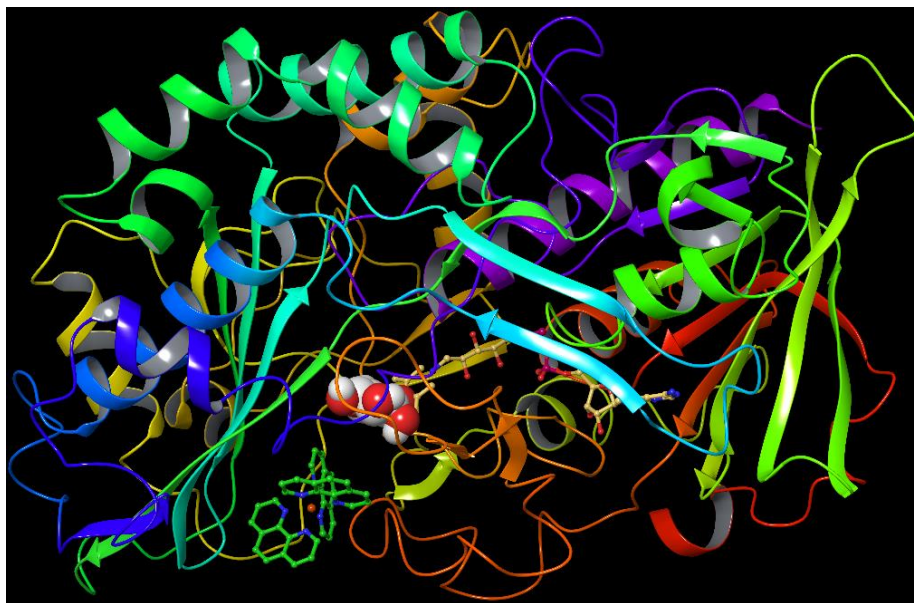


Figura 8.18

8.18.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



8.18.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) dentro del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



Cabe señalar que si se compara la figura 8.13.1 con la figura 8.6.1, aquí se logra percibir como la glucosa de cierta forma *empuja* al mediador para ocupar ese espacio. En las demás figuras no se llega a percibir ese cambio, es la única comparación de figuras en las que se puede percibir ese cambio.

Cuando la interacción es fuera del sitio activo catalítico de la enzima, los valores no cambian con los valores de la GOx reducida (tabla 8.3), esto quiere decir que la glucosa no afecta en la interacción que ocurre entre el mediador y la glucosa oxidasa, otro factor importante es que los mediadores no se mueven de lugar, esto es visualmente apreciado en las siguientes figuras y comparables con las figuras 8.15 y 8.16. Otro punto a tratar es que, sí se puede observar un cambio en las energías de acoplamiento del complejo con fenantrolinas, sin embargo, es un cambio muy mínimo y es estadísticamente insignificativo. Por lo tanto, la entrada de la glucosa no afecta en la transferencia de electrones con el mediador.

Figura 8.19

8.19.1 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (II) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



8.19.2 Unión del complejo metálico tris (2,2'-bipiridin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



Figura 8.20

8.20.1 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



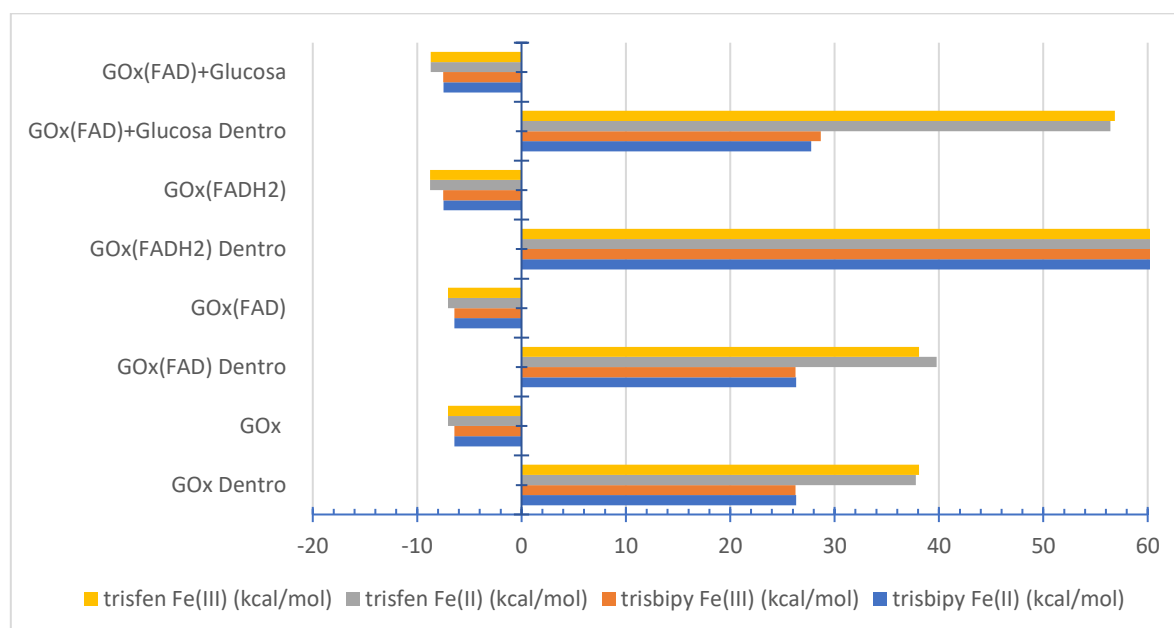
8.20.2 Unión del complejo metálico tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) fuera del sitio catalítico de la holoenzima GOx.



Finalmente, la gráfica de la figura 8.21, engloba todos los resultados de las interacciones moleculares discutidas en este trabajo, aquí podemos apreciar el comportamiento de cada mediador en cada momento de la reacción.

Figura 8.21

Gráfico global de los resultados presentados y discutidos en esta tesis.



9. Conclusión

Esta investigación tuvo como objetivo principal evaluar la capacidad de los complejos metálicos tris (2,2'-bipiridin) hierro (II), tris (2,2'-bipiridin) hierro (III), tris (1,10-fenantrolin) hierro (II) y tris (1,10-fenantrolin) hierro (III) para observar la interacción con la enzima glucosa oxidasa. Con base en los análisis presentados, se concluye que los complejos metálicos tienen una buena energía de acoplamiento fuera del sitio activo de la proteína, reafirmando así nuestra hipótesis. Además, el estudio demuestra que dentro del sitio activo de la proteína no existe una buena energía de acoplamiento, las diferencias de energías hacen ver que no tendrían un buen potencial redox, debido a ello no habría buena respuesta electroquímica, así mismo, las moléculas se desplazan si tener un lugar fijo. Fuera del sitio activo, el análisis permite corroborar que las energías de acoplamiento, las diferencias de energía y la posición que cada molécula ocupa son excelentes. Gracias a estos resultados podemos confirmar que el potencial redox no cambiará, que los complejos no se moverán de su lugar a pesar de que la reacción transcurra. Concluyendo que la interacción y la velocidad de la transferencia de electrones no será afectada por ningún factor químico o físico dentro de la reacción enzimática y que dicha transferencia de electrones está dada por medio del modelo del efecto túnel, puesto que el mediador está alejado del sitio catalítico de la enzima.

Todavía cabe señalar que, entre los dos diferentes ligandos, aquel que presentó una mejor energía de acoplamiento fue el mediador tris (1,10-fenantrolin) hierro (III), el cual sería el candidato ideal para utilizarse en estudios futuros para el desarrollo de un nuevo biosensor de glucosa de segunda generación.

10. Referencias

- American Diabetes Association. (n.d.). *Living with Diabetes*. <http://archives.diabetes.org/>
- Argudo Espinoza, C. (2012). *Concepción Integral y Aplicación Experimental de Procesos de Membranas en la Reutilización de Aguas Depuradas* [Tesis Doctoral]. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Ballón Paucara, W. G., & Grados Torrez, R. E. (2019). Acomplamiento molecular: : criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7, 55–72.
- Berman, H., Henrick, K., & Nakamura, H. (2003). Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(12), 980–980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Boehm, R., Donovan, J., Sheth, D., Durfor, A., Roberts, J., & Isayeva, I. (2019). In Vitro Sugar Interference Testing With Amperometric Glucose Oxidase Sensors. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 13(1), 82–95. <https://doi.org/10.1177/1932296818791538>
- Chang, R., & Goldsby, K. A. (2013). Química de los metales de transición y compuestos de coordinación. In *Química* (11th ed., pp. 996–1022).
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2011a). Composición de las células. In *La Célula* (5th ed., p. 58). MARBÁN.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2011b). Metabolismo celular. In *La Célula* (5th ed., pp. 73–78). MARBÁN.
- Cruz Ramírez, M. (2016). *Efecto de la denticidad y del sustituyente de los ligantes en complejos de Co(II) y Fe(II) en sus procesos de transferencia electrónica con la enzima glucosa oxidasa*.
- Cruz-Ramírez, M., Ramírez-Delgado, V., Rebolledo-Chávez, J. P. F., Mendoza, A., Reyes-Vidal, Y., Rangel, F. J. T., Ruiz-Azuara, L., & Ortiz-Frade, L. (2019). Revisiting the role of π acceptor character of polypyridine ligands in the redox behavior of tris and bis Fe(II) complexes and in the electron transfer with glucose oxidase. *Inorganica Chimica Acta*, 495, 119015. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119015>

- Dessault Systemes. (2021). *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*.
- Díaz Rojo, J. A. (2004). El término diabetes: aspectos históricos y lexicográficos. *Panace@*, V(15), 30.
- Dinda, S., Sarkar, S., & Das, P. K. (2018). Glucose oxidase mediated targeted cancer-starving therapy by biotinylated self-assembled vesicles. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 54(71), 9929–9932. <https://doi.org/10.1039/c8cc03599g>
- Figgis, B. N., Skelton, B. W., & White, A. H. (1978). Crystal structure and E.S.R. of 2,2'-Bipyridylum Tris(2,2'-bipyridyl)iron(III) tetraperchlorate. *Australian Journal of Chemistry*, 31(1), 57–64. <https://doi.org/10.1071/CH9780057>
- Frederick, K. R., Tung, J., Emerick, R. S., Masiarz, F. R., Chamberlain, S. H., Vasavada, A., Rosenberg, S., Chakraborty, S., & Schopfer, L. M. (1990). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(7), 3793–3802.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., ... Fox, D. J. (2018). *Gaussian 09*.
- Glide. (2021). Schrödinger, LCC.
- González García, M. B., & Costa García, A. (2010). Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*. https://core.ac.uk/display/230316823?utm_source=pdf&utm_medium=banner&utm_campaign=pdf-decoration-v1
- González Segura, A. (2004). *Biosensores ópticos*. http://isagoge.atSPACE.com/documentos/Archivo_isagoge1/BIOSENSORES_OPTICO_S.pdf
- Griesshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 8(3), 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>

- Gutiérrez Ríos, E. (2003). Compuestos de coordinación. In *Química inorgánica* (2nd ed., p. 545). REERTÉ, S. A.
- Harwood, G. W. J., & Pouton, C. W. (1996). Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drugs and metabolites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18(2), 163–191. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00093-M](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00093-M)
- Hassan, M. H., Vyas, C., Grieve, B., & Bartolo, P. (2021). Recent Advances in Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Sensing. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(14). <https://doi.org/10.3390/s21144672>
- Hernández-Padilla, G., Cruz-Ramírez, M., Rebolledo-Chávez, J. P. F., Ocampo-Hernández, J., Mendoza, A., Tenorio, F. J., Ramírez, L. D., & Ortiz-Frade, L. (2021). The role of molecular interaction between GOD and metal complexes on redox mediation processes. *Journal of Molecular Structure*, 1245, 131026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131026>
- INEGI. (2022). *ESTADÍSTICAS DE DEFUNCIONES REGISTRADAS DE ENERO A JUNIO DE 2021*.
- Instituto Tecnológico de Yucatán. (n.d.). *Diccionario Químico*. [Http://itm-quimica.50webs.com/Diccionario.Htm](http://itm-quimica.50webs.com/Diccionario.Htm).
- Jiménez C., C., & León P., D. E. (2008). Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 144–154. <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a17.pdf>
- K. Murray, R., A. Bender, D., M. Botham, K., J. Kennelly, P., W. Rodwell, V., & Weil, P. A. (2013). *HARPER BIOQUÍMICA ILUSTRADA* (29th ed.). McGRAW-HILL.
- Karp, G. (2014). Glosario. In *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos* (7a ed.). McGraw-Hill.
- L. Nelson, D., & M. Cox, M. (2009). Estructura tridimensional de las proteínas. In *Lehninger Principios de bioquímica* (5th ed., pp. 113–123).
- Lehninger, A. L. (1997). Enzimas: cinética e inhibición. In *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*. (2nd ed., pp. 190–191). OMEGA.
- Li, Z.-X., Yu, M.-M., Zhang, Y.-N., & Wei, L.-H. (2008). Tris(1,10-phenanthroline-κN,N')iron(II) μ-oxido-bis[trichloridoferrate(III)] ethanol hemisolvate. *Acta*

- Crystallographica. Section E, Structure Reports Online*, 64(Pt 12), m1514.
<https://doi.org/10.1107/S1600536808035897>
- LigPrep*. (2021). Srödinger, LCC.
- López-Estrada, O., Laguna, H. G., Barrueta-Flores, C., & Amador-Bedolla, C. (2018). Reassessment of the Four-Point Approach to the Electron-Transfer Marcus-Hush Theory. *ACS Omega*, 3(2), 2130–2140. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01425>
- MacroModel*. (2021). Srödinger, LLC.
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Mandal, A. (2019a). *Origen de la diabetes “del término.”* News Medical Life Science. [https://www.news-medical.net/health/History-of-Diabetes-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/History-of-Diabetes-(Spanish).aspx)
- Mandal, A. (2019b). *Principios del biosensor.* News Medical Life Science. [https://www.news-medical.net/health/Biosensor-Principles-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Biosensor-Principles-(Spanish).aspx)
- McGilvery, R. W. (1977a). Coenzimas y vitaminas. In *Conceptos bioquímicos* (pp. 117–133). REVERTÉ.
- McGilvery, R. W. (1977b). La naturaleza de las proteínas. In *Conceptos bioquímicos* (p. 7). REVERTÉ.
- Medina Franco, J. L., Fernández de Gortari, E., & Jesús Naveja, J. (2015). Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 26(3), 1–7.
- Meléndez, J. (2014). *Biosensores, vida y salud.* Recolucionando La Ciencia. <https://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/972440.biosensores-vida-y-salud.html>
- Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S., & Dutton, P. L. (1992). Nature of biological electron transfer. *Nature*, 355(6363), 796–802. <https://doi.org/10.1038/355796a0>
- Nelson, D. L. (David L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2009). Lehninger principios de bioquímica. In *Principios de bioquímica* (5a. ed.). Omega.
- Odoko, M., & Okabe, N. (2004). Tris(1,10-phenanthroline- κ^2 N,N')-iron(III) trinitrate monohydrate. *Acta Crystallographica Section E*, 60(12), m1822--m1824. <https://doi.org/10.1107/S1600536804027345>

- OMS. (2020). *Diabetes*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- QUIMICA.ES. (n.d.). *Diccionario*. <https://www.Quimica.Es/Enciclopedia/>.
- Ramírez Delgado, V. (2015). *Influencia de la estructura electrónica en compuestos de coordinación, sobre sus procesos de transferencia electrónica con la enzima glucosa oxidasa*. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.
- Real Academia Española. (2021). *Diccionario de la Lengua Española*. <https://dle.rae.es/>.
- Saldívar Gonzalez, F., Prieto Martínez, F. D., & Medina Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28, 51–58.
- Sciarra Gatti, P. (2004). Electroodos para medir Glucosa. *XIII SEMINARIO DE ING. BIOMÉDICA*. <http://www.nib.fmed.edu.uy/Sciarra.pdf>
- Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S. K., Koča, J., & Rose, A. S. (2021). Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W431–W437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>
- Smith, Y. (2018). *Estructura y función de la proteína*. News Medical Life Science. [https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Structure-and-Function-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Structure-and-Function-(Spanish).aspx)
- Tapprich, W. E., Reichart, L., Simon, D. M., Duncan, G., McClung, W., Grandgenett, N., & Pauley, M. A. (2021). An instructional definition and assessment rubric for bioinformatics instruction. *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 49(1), 38–45. <https://doi.org/10.1002/bmb.21361>
- Tu, T., Wang, Y., Huang, H., Wang, Y., Jiang, X., Wang, Z., Yao, B., & Luo, H. (2019). Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution. *Food Chemistry*, 281, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.099>
- UniProt. (2018). *UniProtKB* - P13006 (GOX_ASPNG). <https://www.uniprot.org/uniprot/P13006>

- Universidad nacional de colombia. (2014a). *Curso de Química de Coordinación*.
http://168.176.239.58/cursos/ciencias/2000189_1/aplicaciones.html
- Universidad nacional de colombia. (2014b). *Curso de Química de Coordinación*.
http://red.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000189_1/introduccion.html
- Université d'Aix-Marseille. (2021). *Carbohydrate-Activate Enzimes*.
<http://www.cazy.org/AA3.html>
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814–825.
<https://doi.org/10.1021/cr068123a>
- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H. M., & Hecht, H.-J. (1999). 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 55(5), 969–977.
<https://doi.org/10.1107/S0907444999003431>
- Wooller, S. K., Benstead-Hume, G., Chen, X., Ali, Y., & Pearl, F. M. G. (2017). Bioinformatics in translational drug discovery. *Bioscience Reports*, 37(4).
<https://doi.org/10.1042/BSR20160180>
- Zhou, Y.-S., Zhang, L.-J., Fun, H.-K., Zuo, J.-L., Razak, I. A., Chantrapromma, S., & You, X.-Z. (2001). Synthesis and structures of two novel one-dimensional mixed-valence iron molybdophosphate matrices. *New J. Chem.*, 25(10), 1342–1346.
<https://doi.org/10.1039/B102903G>
- Zúñiga Guajardo, S., & Rangel Rodríguez, I. (2003). Historia de la Diabetes Mellitus y el descubrimiento de la insulina. *Diabetes Hoy Para El Médico y El Profesional de La Salud*, 4(2), 984–986.