

Application Note AN-RA-008

## Fácil detección de enzimas con el efecto electroquímico-SERS.

La activación de las características mejoradas de los electrodos de plata ayuda a obtener bandas Raman características de moléculas biológicas

La espectroscopia Raman es una de las técnicas de análisis químico más prometedoras. Esto se debe a sus propiedades inherentes de huellas dactilares que permiten la identificación de diferentes especies presentes en un sistema estudiado.

Aunque la baja sensibilidad ha limitado su uso como método de detección, el efecto de dispersión Raman mejorada en superficie (SERS) ha mejorado su eficacia para uso analítico. La mejora de la señal Raman ha permitido el desarrollo de muchas aplicaciones de

detección. En particular, la energía proporcionada por el láser de 638 nm garantiza un equilibrio entre el riesgo de danar la muestra y la generación de fluorescencia, lo que hace que este láser sea popular para la mayoría de las aplicaciones biológicas.

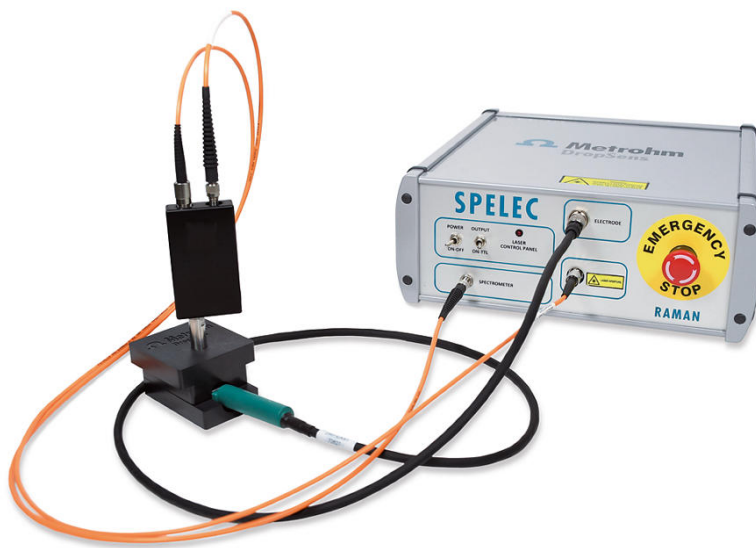
En esta nota de aplicación, la aldehído deshidrogenasa y el citocromo c se analizan mediante espectroelectroquímica Raman como prueba de concepto.

## INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

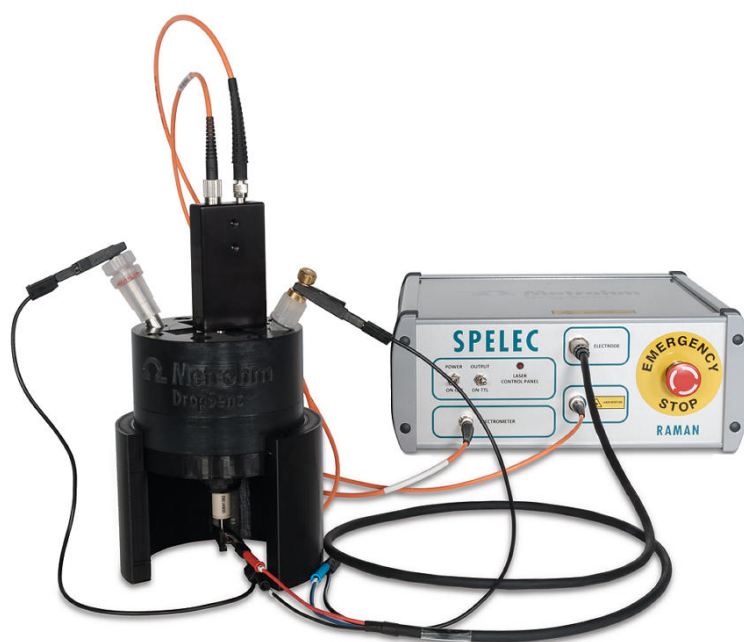
Las mediciones se realizaron utilizando un instrumento SPELEC RAMAN 638 (láser de 638 nm), una sonda Raman correspondiente a la longitud de

onda del láser y celdas espectroelectroquímicas para electrodos serigrafados (Figura 1a) así como para electrodos convencionales (Figura 1b).

a)



b)



**Figura 1.** Instrumento SPELEC RAMAN 638 y sonda Raman utilizados en combinación con una celda espectroelectroquímica Raman para (a) electrodos serigrafiados y (b) convencionales.

Se utilizaron electrodos serigrafiados con plata (Ag SPE, C013) como sustrato de SERS debido a sus propiedades de activación electroquímica. Además, también se utilizó un electrodo de trabajo de plata convencional (6.09395.044) como sustrato de SERS en combinación con electrodos contadores y de referencia de acero (6.0343.110) y Ag/AgCl (6.0728.120), respectivamente.

El SPELEC RAMAN 638 se controló con DropView SPELEC, un software dedicado que proporciona información espectroelectroquímica e incluye herramientas para realizar un tratamiento y análisis adecuado de los datos recopilados. Todo el hardware y software utilizado para este estudio está compilado en **tabla 1**.

**Tabla 1.** Descripción general del equipo de hardware y software.

Equipo	Número de artículo
Instrumento	SPELECRAMAN638
Investigacion	RAMANPROBE638
Celda espectroelectroquímica Raman para SPE	RAMANCEL
Celda espectroelectroquímica Raman para electrodos convencionales.	RAMANCELL-C
SPE de plata	C013
Cable de conexión para SPEs	ELENCO
Electrodo de trabajo de plata	6.09395.044
Contraelectrodo de acero	6.0343.110
Electrodo de referencia Ag/AgCl	6.0728.120
Cable de conexión para electrodos convencionales.	CABSTATO
Software	DropView SPELEC

## EC-SERS EFFECT DE LOS ELECTRODOS SERIGRAFIADOS: DETECCIÓN DE ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

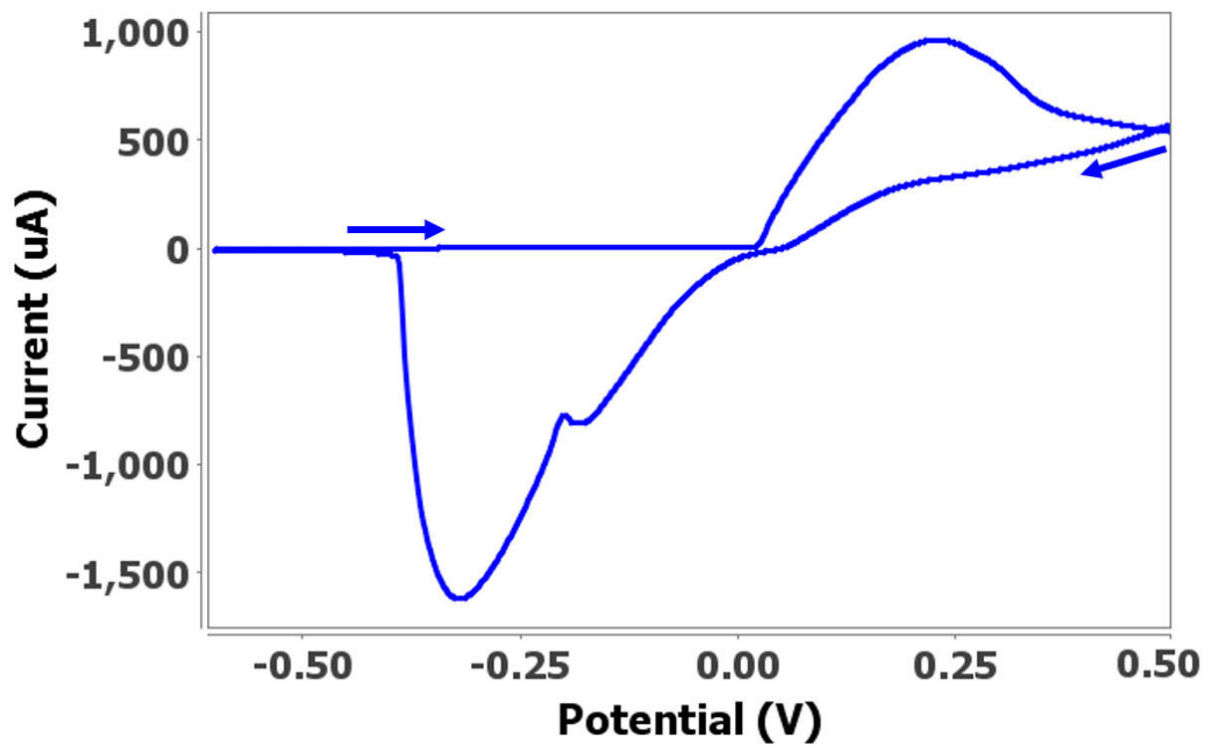
Se empleó espectroelectroquímica Raman para la detección de aldehído deshidrogenasa (ALDH) en solución acuosa. El protocolo SERS electroquímico (EC-SERS) requiere dos pasos en un solo experimento: la activación electroquímica de las características SERS de Ag SPE y luego la detección espectroscópica de la muestra.

La activación electroquímica consiste en escanear el potencial desde +0,50 V para producir la oxidación inicial de la superficie de plata, seguida de su reducción hasta -0,60 V para generar nanoestructuras con efecto SERS. El experimento espectroelectroquímico se realiza en presencia del analito a detectar (en este caso ALDH), pero los iones cloruro también están presentes en solución para

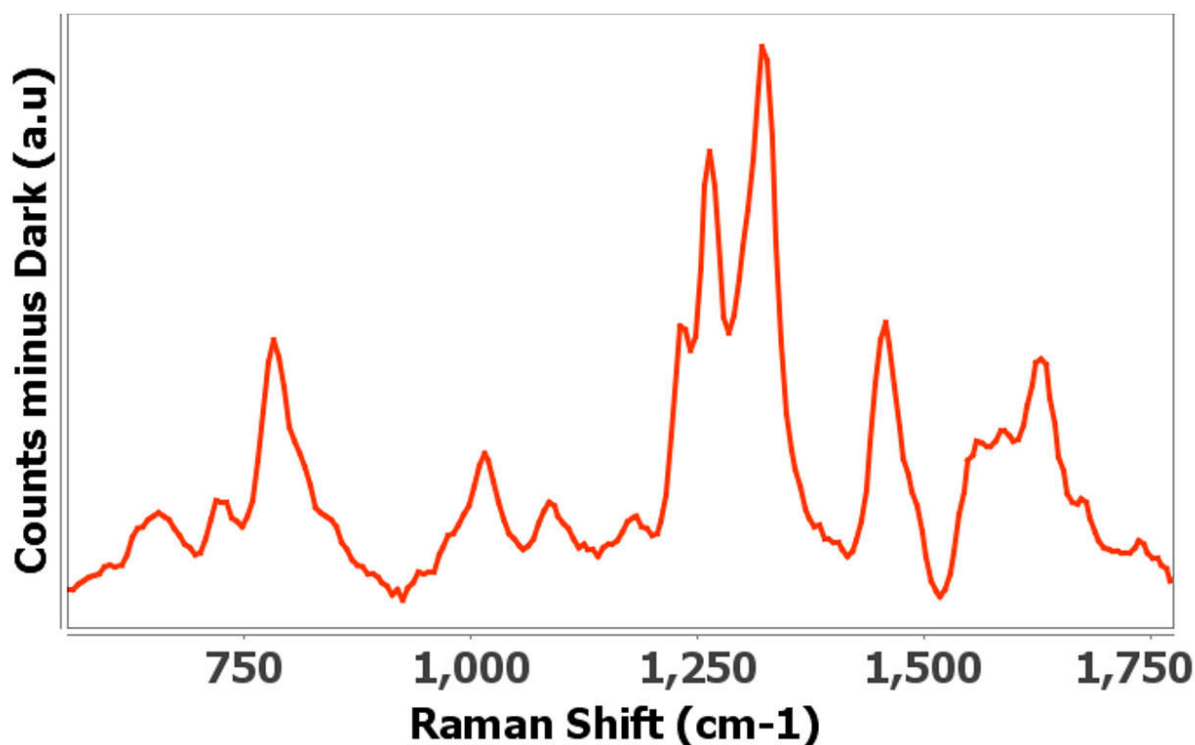
favorecer la generación del sustrato SERS de plata.1]. Para evaluar la evolución de las bandas Raman durante todo el experimento, y por tanto optimizar la detección óptica, SPELEC RAMAN 638 realiza medidas en modo operando. De esta manera, los espectros se registran continuamente durante todo el experimento y no sólo a determinados potenciales.

**Figura 2a** muestra el voltamograma cíclico de ALDH, y el espectro Raman característico de ALDH se muestra en **Figura 2b**. Los resultados se obtuvieron para 1 mg/ml de ALDH en una solución acuosa de 0,1 mol/l de KCl. Aunque la adquisición de espectros se realizó de forma continua, el espectro Raman en **Figura 2b** se registró a -0,50 V ya que este potencial proporciona la intensidad Raman más alta.

a)



b)



**Figura 2.** (a) Voltamograma cíclico y (b) Espectro Raman de 1 mg/ml de aldehído deshidrogenasa en una solución acuosa de cloruro de potasio de 0,1 mol/L utilizando electrodos de C013. El tiempo de integración fue de 2000 ms.

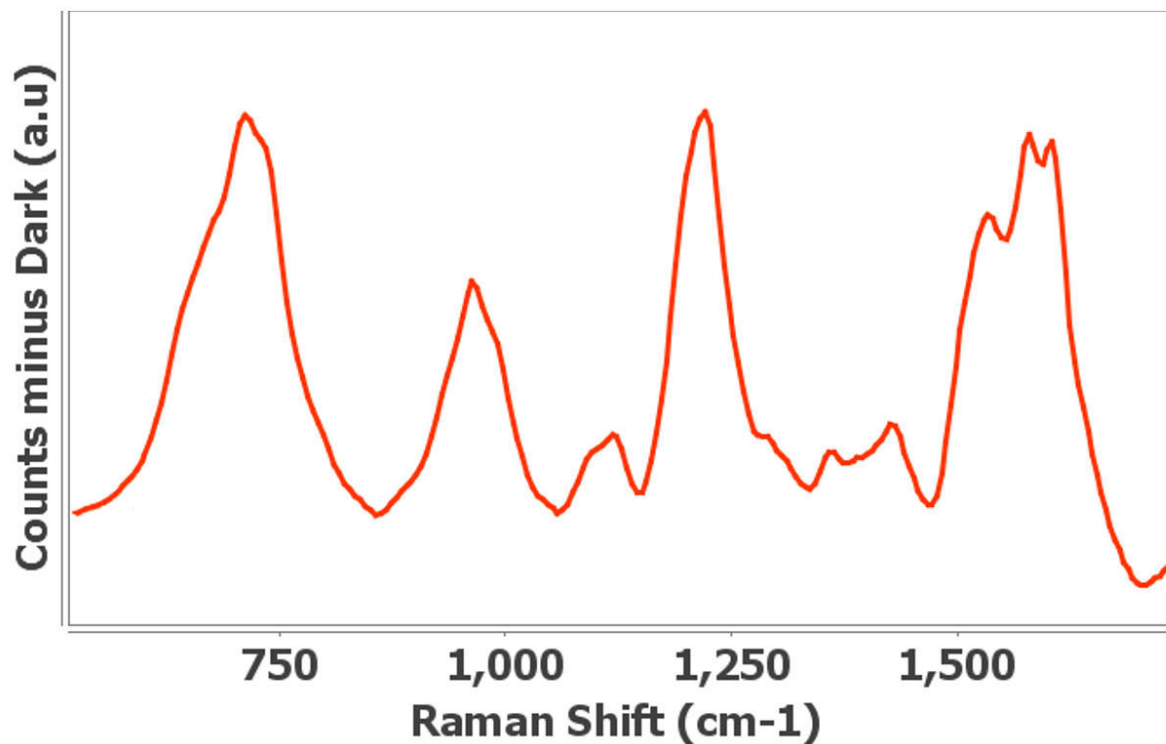
La combinación del procedimiento EC-SERS propuesto para la fácil activación de Ag SPE con un instrumento espectroelectroquímico Raman (láser de

638 nm) ofrece una alternativa rápida e interesante para la caracterización de ALDH en solución no reportada previamente en la literatura.

## EC-SERS EFFECT DE LOS ELECTRODOS CONVENCIONALES: DETECCIÓN DEL CITOCROMO C

También se utilizaron electrodos convencionales para la detección EC-SERS de diferentes enzimas como el citocromo c. El protocolo para este tipo de electrodo sigue los mismos pasos que para los SPE. Se requiere una oxidación inicial de la superficie seguida de una posterior reducción para generar nanoestructuras de plata con efecto SERS. La ventana de potencial se ajustó de acuerdo con los electrodos utilizados en

este experimento. Los mejores resultados se obtuvieron escaneando el potencial de 0,1 mg/ml de citocromo c en una solución acuosa de KCl de 0,1 mol/l de +0,80 V a -0,80 V. El espectro Raman con mayor intensidad (**figura 3**) se registró a -0,70 V. Las asignaciones de modos vibratorios de cada banda Raman del citocromo c se enumeran en **Tabla 2**.



**Figura 3.** Espectro Raman obtenido de 0,1 mg/ml de citocromo c en una solución acuosa de cloruro de potasio de 0,1 mol/l utilizando un electrodo de plata convencional. El tiempo de integración fue de 2000 ms.

**Tabla 2.** Asignación vibratoria del citocromo c [2,3].

Bandas SERS del citocromo c (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
713	Respiración hemo
969	Deformación asimétrica del pirrol
1123	C <sub>β</sub> -C <sub>1</sub>
1220	Medio anillo de pirrol asimétrico
1358	Medio anillo de pirrol simétrico
1426	Cuarto de anillo de pirrol
1528	C <sub>α</sub> C <sub>m'</sub> , C <sub>α</sub> N
1578	C <sub>β</sub> C <sub>β'</sub> , C <sub>α</sub> C <sub>m'</sub>
1604	C <sub>α</sub> C <sub>m'</sub> , C <sub>α</sub> C <sub>β</sub>

Teniendo en cuenta que el citocromo c existe en formas reducidas y oxidadas interconvertibles, el estado de oxidación del ion Fe se puede determinar según la posición de sus bandas Raman características. El citocromo c reducido muestra una banda Raman centrada en  $1604\text{ cm}^{-1}$ , mientras que la forma oxidada muestra una banda desplazada hacia

arriba centrada en  $1636\text{ cm}^{-1}$ . Según el espectro Raman (**Figura 3**) y las asignaciones vibratorias (**Tabla 2**), la forma reducida del analito se detecta durante el experimento EC-SERS. Este experimento demuestra la posibilidad de detectar el citocromo c y caracterizar su estado de oxidación.

## CONCLUSIÓN

La espectroelectroquímica Raman es una técnica de respuesta múltiple que proporciona resultados sobresalientes al estudiar una amplia variedad de sistemas. En el caso particular del láser de 638 nm, la energía proporcionada a esta longitud de onda es adecuada para aplicaciones biológicas.

En este trabajo, los protocolos electroquímicos propuestos para la activación de propiedades SERS de diferentes electrodos de plata (tanto serigrafados

como convencionales) ofrecen un procedimiento fácil y rápido para mejorar la intensidad Raman. Esta mejora de la intensidad Raman permite la detección de diferentes moléculas presentes en la solución. En este trabajo se definen bandas Raman de huellas dactilares de ALDH, no reportadas anteriormente. En el estudio del citocromo c, además de la caracterización del estado redox del ion Fe, se definen las bandas Raman características.

## REFERENCIAS

1. Martín-Yerga, D.; Pérez-Junquera, A.; González-García, M. B.; et al. Quantitative Raman Spectroelectrochemistry Using Silver Screen-Printed Electrodes. *Electrochimica Acta* **2018**, *264*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.01.060>.
2. Brazhe, N. A.; Evlyukhin, A. B.; Goodilin, E. A.; et al. Probing Cytochrome c in Living Mitochondria with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Sci Rep* **2015**, *5* (1), 13793. <https://doi.org/10.1038/srep13793>.
3. Hu, S.; Morris, I. K.; Singh, J. P.; Complete Assignment of Cytochrome c Resonance Raman Spectra via Enzymic Reconstitution with Isotopically Labeled Hemes. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (26), 12446–12458. <https://doi.org/10.1021/ja00079a028>.

## NOTAS DE APLICACIÓN RELACIONADAS

[AN-RA-006](#) Nuevas estrategias para la obtención del efecto SERS en disolventes orgánicos

[AN-SEC-001](#) Espectroelectroquímica: una técnica analítica autovalidada: confirme los resultados

[mediante dos rutas diferentes en un solo experimento](#)  
[AN-SEC-002](#) Recopilación de información de experimentos espectroelectroquímicos: cálculo de parámetros electroquímicos a partir de datos



## CONTACT

Metrohm Hispania  
Calle Aguacate 15  
28044 Madrid

mh@metrohm.es

## CONFIGURACIÓN



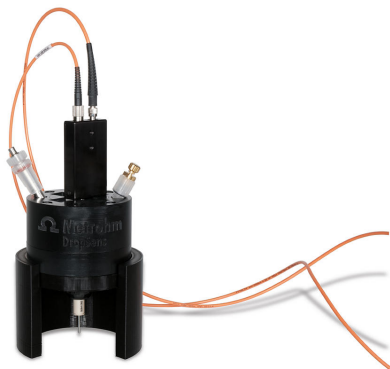
### Aparato Raman espectroelectroquímico (láser de 638 nm)

SPELECRAMAN638 es un aparato para realizar medidas espectroelectroquímicas Raman. Combina en un solo instrumento un láser de clase 3B (638 nm  $\pm 0,5$ ), un bipotenciostato-galvanostato y un espectrómetro (gama de longitudes de onda de 640-885 nm y desplazamiento Raman 50-4370  $\text{cm}^{-1}$ ) e incluye un software específico para espectroelectroquímica que permite la sincronización de experimentos electroquímicos y ópticos.



### Celda Raman para electrodos serigrafiados

Celda de reflexión de teflón negro para realizar medidas espectroelectroquímicas Raman con electrodos serigrafiados en combinación con sonda Raman, ref. RAMANPROBE.



### Celda espectroelectroquímica Raman para electrodos convencionales

Celda fabricada en PEEK para medidas espectroelectroquímicas. Diseñada para el uso con la sonda Raman, ref. RAMANPROBE, y electrodos convencionales de Metrohm.



### DropView SPELEC Software

DropView SPELEC es un software espectroelectroquímico que controla el instrumento SPELEC y ofrece una sincronización perfecta de las medidas ópticas y electroquímicas, así como herramientas avanzadas para el tratamiento de los datos.