

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO BASADO EN LA
COINMOVILIZACIÓN DE QUITOSANO Y PEROXIDASA DE PALMA REAL
(*Roystonea regia*) SOBRE ELECTRODOS DE GRAFENO.**

ERIKA NAHIWDUT VILLAMIZAR GUTIÉRREZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO BASADO EN LA
COINMOVILIZACIÓN DE QUITOSANO Y PEROXIDASA DE PALMA REAL
(*Roystonea regia*) SOBRE ELECTRODOS DE GRAFENO.**

ERIKA NAHIWDUT VILLAMIZAR GUTIÉRREZ

Tesis de grado para optar al título de Químico.

Director

JOHN JAIRO CASTILLO LEÓN

Doctor en Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

A mis dos hermosas madres

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander bajo la supervisión del profesor John Jairo Castillo León, a quien le expreso mi más profundo agradecimiento por hacer posible la realización de este estudio. Además, agradezco por su paciencia, orientación y aportes en el desarrollo de este trabajo.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por su apoyo económico a través del proyecto de convocatoria interna INMOVILIZACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*) MEDIANTE LA PREPARACION DE AGREGADOS ENZIMATICOS ENTRECruzADOS (CLEAs) y fondo de capital semilla 2014 número 726.

Al destino, por darme dos madres al nacer. Una me dio la vida, pero juntas comparten ese hermoso sentimiento de ser mi madre. Juntas me guían en el camino de la vida dándome luz, dándome paz. Sin importar la distancia, la hora, siempre están. A ustedes que dieron todo sin pedir nada a cambio, a ustedes que dejaron todo por mí, a ustedes que entregaron todo por mí...

A todos mis colegas y amigos, por ser compañía, por ser alegría, porque la vida se torna más divertida y memorable cuando se comparten aventuras, salidas, facturas, risas. Los aprecio a todos, a los que son y a los que fueron, sin duda alguna sin ustedes no hubiera sido igual. Siempre he criticado estas listas, no pretendo enumerarlos. Los que son mis amigos recordarán los viajes juntos, las emotivas salidas a calmar la sed, las sorpresas de cumpleaños, las cuentas que daban más de lo esperado, los difíciles caminos para llegar a las cascadas, las conversaciones entre los cuatro fantásticos por ese amigo que se enamoró de la incorrecta, las historias que siempre se repetían, las palabras de aliento cuando teníamos la bata puesta, los días en los que necesité un abrazo...

A todos ustedes les adeudo una razón...

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO DE REFERENCIA	21
1.1 MARCO DE ANTECEDENTES	21
1.2 MARCO TEÓRICO	24
1.2.1 Biosensores	24
1.2.1.1 Transductores electroquímicos	25
1.2.1.1.1 Biosensores Amperométricos.	27
1.2.1.1.2 Electroodos serigrafados	27
1.2.1.1.3 Modificación de electrodos	29
1.2.1.2 Receptor biológico catalítico.	31
1.2.1.2.1 Biosensores enzimáticos.	32
1.2.1.2.2 Oxidoreductasas	33
1.2.1.2.3 Peroxidasas	33
1.2.1.2.4 Peroxidasa de palma real (<i>Roystonea regia</i>)	35
1.2.2 Técnicas electroquímicas utilizadas para el estudio de biosensores	36
1.2.2.1 Voltamperometría	37
1.2.2.2 Voltamperometría Cíclica.	37
1.2.2.3 Cronoamperometría.	38
2. METODOLOGÍA	40

2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS	40
2.2 ETAPA I: Extracción y semi-purificación.	41
2.2.1 Extracción	41
2.2.2 Eliminación de pigmentos	42
2.2.3 Cromatografía Hidrofóbica	42
2.2.4 Cromatografía de permeación en gel	43
2.2.5 Determinación de Proteínas	44
2.2.6 Determinación de Actividad Enzimática	44
2.3 ETAPA II: MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS DE GRAFENO.	45
2.4 ETAPA III: CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.	46
2.4.1 Caracterización de los electrodos usando ferrocianuro de potasio como electrolito modelo	48
2.4.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo	48
2.4.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno	49
2.4.4 Influencia del pH	49
2.5 ETAPA IV: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS	50
2.5.1 Respuesta cronoamperométrica del electrodo modificado	50
2.5.2 Estudio de la especificidad del electrodo modificado en presencia de sustancias interferentes	50
2.5.3 Determinación del rango lineal	51
2.5.4 Sensibilidad	51
2.5.5 Límite de detección	52

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	53
3.1 EXTRACCIÓN Y SEMI-PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL (<i>Roystonea regia</i>)	53
3.2 MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS.	58
3.3 CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	62
3.3.1 Caracterización de los electrodos usando ferrocianuro de potasio como electrolito modelo	62
3.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo	65
3.3.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno	72
3.3.4 Influencia del pH.	74
3.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS.	78
4. CONCLUSIONES	86
5. RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	96

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Configuración típica de un biosensor	24
Figura 2. Clasificación de biosensores.....	25
Figura 3. Electrodo serigrafiado	28
Figura 4. Síntesis enzimática del quitosano	30
Figura 5. Las enzimas reducen la energía de activación.	32
Figura 6. Visualización de la estructura cristalina de la peroxidasa de palma real mediante el software PyMOL.....	35
Figura 7. Voltamperometría Cíclica.....	38
Figura 8. Cronoamperometría. Aplicación de un pulso de potencial al sistema y estudio de la variación de la corriente contra el tiempo.....	39
Figura 9. Celda electroquímica (DRP-CELL-70077)	41
Figura 10. Purificador de proteínas Bio-RAD BioLogic LP.	43
Figura 11. Representación del montaje experimental.	47
Figura 12. Partes del montaje experimental.....	47
Figura 13. Material vegetal y solución buffer de extracción.....	53
Figura 14. Eliminación de pigmentos, formación de capas insolubles.....	54
Figura 15. Cromatografía hidrofóbica de la peroxidasa de palma real sobre fenil sefarosa.....	56
Figura 16. Cromatografía de permeación en gel de la peroxidasa de palma real sobre Sephadex G-50.....	57
Figura 17. Posible mecanismo de reacción entre CS y GA.....	60
Figura 18. Diagrama esquemático de la construcción del electrodo modificado. ..	61
Figura 19. Comparación de VCs para los electrodos a) SPE, b) SPE/CS c) SPE/CS/GA y d) SPE/CS/GA/PPR (solución 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ con 0.1 M de KCl, velocidad de barrido 100 mV/s).	63

Figura 20. VCs para los electrodos (A) SPE, (B) SPE/PPR y (C) SPE/CS/GA/PPR en ausencia (cuervas a) y presencia (cuervas b) de peróxido de hidrógeno 5 mM (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s).....	66
Figura 21. Comparación de los VCs para los electrodos a) SPE, b) modificado con enzima SPE/PPR y c) SPE/CS/GA/PPR en presencia de 5 mM de H ₂ O ₂ (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s)	69
Figura 22. Posible mecanismo para la reducción bioelectrocatalítica del H ₂ O ₂ por la PPR para el electrodo SPE/CS/GA/PPR.....	70
Figura 23. Voltamograma cíclico para el electrodo SPE/CS/GA/PPR (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s) Número de ciclos 20.	71
Figura 24. (A) Voltamogramas cíclicos del electrodo SPE/CS/GA/PPR a diferentes velocidades de barrido (de interior a exterior): 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mV/s (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s) en presencia de 5 mM de H ₂ O ₂ . (B) Diagrama de los picos de corriente (a) catódica y (b) anódica versus raíz cuadrada de la velocidad de barrido.	73
Figura 25. VCs efecto del pH sobre la respuesta del electrodo SPE/CS/GA/PPR tomados en solución buffer A) 10mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), B) 10mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), C) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0), D) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 7.0), E) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 8.0) y F) 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0), en presencia de 1mM de H ₂ O ₂ , velocidad de barrido 100mV/s.	75
Figura 26. Efecto del pH sobre la respuesta de corriente del biosensor SPE/CS/GA/PPR. (Barras de error= ± D.E. y n=2.)	76
Figura 27. (A) Perfil amperométrico Corriente vs Tiempo para la adición de H ₂ O ₂ (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl). Potencial aplicado -1.0 V vs Ag. (B)	

Curva de calibración para la determinación de H₂O₂. (Barras de error= ± D.E. y n=2.)80

Figura 28. Perfil amperométrico Corriente vs Tiempo del electrodo SPE/CS/GA/PPR para a) 500 μM de H₂O₂, b) 500 μM de glucosa, c) 500 μM de ácido ascórbico, d) 500 μM de ácido cítrico, e) 500 μM de etanol, f) 1000 μM de H₂O₂, g) 1500 μM de H₂O₂ y h) 900 μM de glucosa (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl). Potencial aplicado -1.0 V vs Ag.....82

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tipos de transductores electroquímicos clasificados por el tipo de medición, con los analitos correspondientes medidos.	26
Tabla 2. Etapas de semi-purificación de la peroxidasa de palma real.	58
Tabla 3. Diferencia de potencial y relación de corriente entre los picos de oxidación y reducción para los electrodos estudiados.	65
Tabla 4. Diferentes tipos de biosensores de peróxido de hidrógeno.	82

ABREVIATURAS

A	Amperios
μA	Microamperios
BSA	Albúmina de suero bovino
CS	Quitosano
Da	Dalton
g	Gramo
GA	Glutaraldehído
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
L	Litro
μL	Microlitros
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
p/v	peso/volumen
PEG	Polietilenglicol
PPR	Peroxidasa de palma real
SPE	Electrodos serigrafados
U	Unidad de actividad peroxidasa
UIS	Universidad Industrial de Santander
V	Voltios
VC	Voltamperometría cíclica
VCs	Voltamogramas cíclicos

mV

Milivoltios

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO BASADO EN LA COINMOVILIZACIÓN DE QUITOSANO Y PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*) SOBRE ELECTRODOS DE GRAFENO

AUTORA: VILLAMIZAR GUTIERREZ ERIKA NAHIWDUT**

PALABRAS CLAVES: biosensor, peroxidasa de palma real, electrodo de grafeno, peróxido de hidrógeno

DESCRIPCIÓN

En el presente trabajo se desarrolló un novedoso electrodo enzimático amperométrico basado en la co-inmovilización de quitosano y peroxidasa de palma real mediante el uso de glutaraldehído como herramienta entrecruzante sobre electrodos serigrafiados de grafeno para la detección de peróxido de hidrógeno.

El desarrollo del electrodo enzimático comprendió cuatro etapas, la primera involucró la extracción y semi-purificación de la peroxidasa de palma real. Proceso que consiguió aumentar el valor de la actividad específica y el factor de purificación hasta 504.34 U/mg y 6.5 respectivamente.

En segunda instancia, los electrodos serigrafiados de grafeno fueron modificados con peroxidasa de palma real mediante el uso de quitosano y glutaraldehído, sustancias modificadoras que permitieron la formación de enlaces covalentes para dar lugar a la inmovilización de la enzima al electrodo. La tercera etapa comprendió el estudio y la caracterización electroquímica del electrodo modificado mediante voltamperometría cíclica. El electrodo enzimático presentó respuesta a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Además se comprobó que el proceso de transferencia electrónica estuvo controlado superficialmente y que en gran medida dependió del pH de la solución.

Finalmente, en la cuarta etapa se realizó la evaluación de los parámetros analíticos: rango lineal, sensibilidad, nivel mínimo de detección y especificidad del electrodo modificado mediante cronoamperometría. Se observó que el electrodo enzimático presentó una relación lineal entre la respuesta de corriente y la concentración de peróxido de hidrógeno en un intervalo de rango de 500 μM a 5000 μM ($r^2 = 0.9983$), con una sensibilidad de calibrado de $0.021 \mu\text{A} * \frac{\text{L}}{\mu\text{mol}}$ y un límite de detección a 404 μM . (S/N=3)

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: John Jairo Castillo León. Doctor en Química

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED ON THE COIMMOBILIZATION OF CHITOSAN AND ROYAL PALM PEROXIDASE (*Roystonea regia*) ON GRAPHENE ELECTRODES.

AUTHOR VILLAMIZAR GUTIERREZ ERIKA NAHIWDUT**

KEYWORDS: biosensor, royal palm peroxidase, graphene electrode, hydrogen peroxide

DESCRIPTION

In this work we developed a novel amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the coimmobilization of royal palm peroxidase (*Roystonea regia*) on chitosan by using glutaraldehyde as a linker on graphene screen printed electrode.

The development of the enzyme electrode consisted in four steps. The first step was the extraction and semi-purification of the royal palm peroxidase. This process allowed to increase the specific activity and purification factor to 504.34 U / mg and 6.5 respectively.

The graphene screen-printed electrodes were modified with royal palm peroxidase by using chitosan and glutaraldehyde, which allowed the covalent bonds formation between the enzyme and the electrode surface. The third step included electrochemical studies based on cyclic voltammetry. The enzyme electrode showed response to different concentrations of hydrogen peroxide, these were demonstrated by the increasing on the electrocatalytic current of reduction of hydrogen peroxide. Furthermore, it was found that the electron transfer process was controlled superficially and depended on the pH of the solution.

Finally, the evaluation of the analytical parameters: linear range, sensitivity, minimum detection level and specificity was performed by chronoamperometry experiments. The enzyme electrode showed a linear response to hydrogen peroxide over a concentration range from 500 μM to 5000 μM ($r^2 = 0.9934$), with a sensitivity calibration $0.021 \mu\text{A} * \frac{\text{L}}{\mu\text{mol}}$ and a detection limit of 404 μM . (S/N=3).

* Degree of Project

** Science of Faculty, School of Chemistry, Director: John Jairo Castillo León. Doctor in Chemistry

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, diferentes estudios científicos han querido proporcionar herramientas y materiales que permitan la construcción de nuevos dispositivos de detección que sean fiables, de fácil manejo y sobre todo que requieran pocas cantidades de muestra (en el orden de microlitros) para la determinación de un analito en una mezcla compleja. Los enormes avances en instrumentación analítica moderna han dado lugar a una mejora en la selectividad, inclusive para análisis de trazas, mediante técnicas como: cromatografía de gases, espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta resolución, etc. Sin embargo, la gran mayoría de estas técnicas implican un elevado costo y consumo de tiempo, dada la necesidad de realizar pretratamientos a las muestra.

Como alternativa de solución surge el desarrollo de los denominados sensores, dispositivos que representan sistemas altamente sensibles y específicos, que juegan un rol determinante para abordar de modo rápido y confiable el análisis de un amplio espectro de especies: patógenos, compuestos asociados a procesos industriales, contaminantes ambientales, entre otros. Un grupo especialmente atractivo dentro de los sensores es el constituido por los designados biosensores, en los que se emplean mecanismos o principios biológicos para el reconocimiento de especies particulares.

En 1999 la IUPAC introduce el término de biosensor¹, definiéndolos como dispositivos de detección que cuentan con un elemento de reconocimiento biológico integrado a un sistema de transducción, el cual conduce la respuesta hacia un aparato de salida. A partir de 1999¹ se inicia el potencial estudio de las

¹ SABINE BORGMANN, A. S. Amperometric Biosensors. Advances in Electrochemical Science and Engineering. 2011

diferentes configuraciones de biosensores mediante el uso de anticuerpos, lectinas, ácidos nucleicos, enzimas, entre otros, como elementos de bioreconocimiento en conjunto con los diferentes sistemas de transducción, que pueden variar desde electroquímicos, ópticos, térmicos o de masa.

Los biosensores enzimáticos con transductores amperométricos, utilizan como sistema de bioreconocimiento proteínas con capacidad catalítica que reaccionan específicamente con un analito o familia de analitos, acelerando la reacción química y además favoreciendo muy eficientemente el proceso biológico. Estos sistemas basan su medición en la detección de la corriente resultante de la oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva en la superficie del electrodo.

Actualmente, se han desarrollado investigaciones basadas en la construcción de biosensores amperométricos de peroxidasa de rábano picante (HRP), enzima que ha sido ampliamente estudiada. Un ejemplo clave se puede observar en el estudio realizado por Shu-Xia Xu y col.², donde el uso de HRP inmovilizada en una matriz sol-gel y depositada en electrodos de carbono de vidrio modificados con nanotubos de carbono representa un sistema lo suficientemente apto para la cuantificación de peróxido de hidrógeno, además de simbolizar un método sencillo, rápido y selectivo para dicho procedimiento.

Sin embargo, la mayoría de los biosensores que utilizan la HRP presentan algunas limitaciones de trabajo como la inactivación y en algunas ocasiones desnaturalización de la enzima cuando se encuentra en altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, altas temperaturas o pHs extremos. Por otro lado, es común encontrar dificultades en el proceso de transferencia de electrones desde el centro activo de la enzima hacia la superficie del electrodo, contratiempo que

² SHU-XIA XU, J.-L. L.-L.-X. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol-gel thin film on a multi-wall carbon nanotube modified electrode. The Royal Society of Chemistry. 2014

generalmente se resuelve con la modificación de la enzima mediante técnicas de ingeniería genética o con la nanoestructuración del electrodo.

De esta forma, surge la necesidad de encontrar nuevas enzimas con mejores propiedades catalíticas para el desarrollo de biosensores mejorados y más eficientes. Colombia es un país con excelentes recursos naturales prospectos a nuevas fuentes enzimáticas que pueden ser usadas para el desarrollo biotecnológico del país. Esta biodiversidad da grandes ventajas competitivas que al ser basadas en el uso sostenible puede y debe convertirse en desarrollo científico para el país. Bajo esta filosofía, se planteó el uso de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) para la construcción de un novedoso biosensor. Estudio pionero que abre un nuevo campo de investigación al desarrollo biotecnológico del país.

En este trabajo de grado se presentan los resultados del estudio bajo el cual se desarrolló un biosensor amperométrico mediante coinmovilización de quitosano y peroxidasa de palma real (PPR) mediante el uso de glutaraldehído (GA) como herramienta entrecruzante sobre electrodos de grafeno para la detección de peróxido de hidrógeno. El trabajo se desarrolló en cuatro etapas, la primera de ellas involucró la extracción y semi-purificación de la peroxidasa de palma real. En segunda instancia, se modificaron los electrodos mediante la formación de enlaces covalentes entre el CS, GA y PPR. La tercera fase correspondió a la caracterización electroquímica de los electrodos por voltamperometría cíclica (VC). Finalmente, en la cuarta etapa, se realizó la evaluación de parámetros analíticos como: rango lineal, sensibilidad y nivel mínimo de detección mediante cronoamperometría.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 MARCO DE ANTECEDENTES

El uso de electrodos enzimáticos fue reportado por primera vez en 1962³ por Clark & Lions⁴, este reporte, utilizaba la enzima glucosa oxidasa como bioreceptor de la glucosa que en presencia de oxígeno catalizaba la reacción hacia la producción de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno; este último es oxidado sobre la superficie de un electrodo de platino produciendo una corriente eléctrica que es proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra. Este estudio marca la historia del éxito de los biosensores pues la salud y calidad de vida de los pacientes con diabetes dependen de la supervisión precisa de sus niveles de glucosa en sangre por medio de los biosensores de glucosa.

Más tarde, en 1999 la IUPAC introduce y define el termino biosensor como dispositivo integrado capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa específica usando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) que es retenido en contacto directo con un elemento de transducción electroquímica⁵.

Otra enzima que ha sido de gran interés es la HRP, esta empezó a ser estudiada desde antes de 1989, año en el cual G. Jansson y col.⁶ muestran un atractivo sistema de senso para la cuantificación de peróxido de hidrógeno utilizando

³ SABINE BORGMANN, A. S. Amperometric Biosensors. *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. 2011

⁴ LELAND C. CLARK, J. A. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals New York Academy of Sciences*. 1962

⁵ DANIEL R. THÉVENOT, K. T. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 2333-2348. 1999

⁶ G. JONSSON, L. G. An Electrochemical Sensor for Hydrogen Peroxide Based on Peroxidase Adsorbed on a Spectrographic Graphite Electrode. *Electroanalysis*, 465-468. 1989

electrodos de grafito modificados con HRP, la cual fue fuertemente adsorbida en la superficie del electrodo.

Estudios más recientes introducen al diseño de nuevos biosensores desarrollados bajo estrategias de nanoestructuración, inmovilización y mediación, cada una de estas modificaciones aporta mejoras al sistema de medición y en conjunto representan diseños prometedores de detección.

Aprovechando el desarrollo de la ciencia de los nanomateriales, la nanoestructuración ha empezado a tener gran apogeo en el desarrollo de dispositivos de detección. A modo de ejemplo, en 2014, Shu-Xia Xu y col.⁷ desarrolló un prototipo de biosensor para la cuantificación de peróxido de hidrógeno basado en la inmovilización sol-gel de HRP en electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono de pared múltiple, dejando clara evidencia de que la presencia de este nanomaterial mejora la respuesta-corriente del biosensor. El comportamiento bioelectroquímico y respuesta amperométrica del dispositivo se evaluó mediante voltamperometría cíclica y cronoamperometría respectivamente.

El grafeno es un alótropo del carbono, un teselado hexagonal plano formado por átomos de carbono y enlaces covalentes que se forman a partir de la superposición de los híbridos sp^2 de los carbonos enlazados. Materiales basados en el grafeno están ganando atención como nuevos materiales en diferentes aplicaciones. Las propiedades físico-químicas únicas del grafeno, especialmente su área superficial excepcionalmente alta, conductividad térmica y movilidad de electrones además de la resistencia mecánica, pueden conducir a tecnologías nuevas o mejoradas. Los materiales de grafeno pueden utilizarse como adsorbentes de contaminantes, fotocatalizadores para descontaminación de agua,

⁷ SHU-XIA XU, J.-L. L.-L.-X. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol-gel thin film on a multi-wall carbon nanotube modified electrode. The Royal Society of Chemistry. 2014

membranas y tecnologías de desalinización, en aplicaciones antimicrobianas, electrodos para la detección de contaminantes y otras biomoléculas pertinentes, incluyendo disruptores hormonales y metabolitos microbianos.⁸

En 2011 Kuila y col.⁹ realizan una revisión bibliográfica del avance de los biosensores basados en grafeno, resaltando las características fisicoquímicas del material, como la gran área superficial y la excelente conductividad eléctrica que le permite actuar como alambre de electrones entre los centros redox de una enzima o proteína y la superficie del electrodo. Además, describen la aplicación del grafeno en electrodos enzimáticos para la detección de glucosa, citocromo c, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), hemoglobina, ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, colesterol y peróxido de hidrógeno.

Debido al gran número de estudios y trabajos relacionados con la HRP el desarrollo de los biosensores ha ido en constante crecimiento. Sin embargo en 2005, Inna Alpeeva y col.¹⁰ desarrollan un estudio comparativo de tres diferentes biosensores amperométricos utilizando peroxidasas de rábano picante (*Armoracia rusticana*), palma real (*Roystonea regia*) y batata dulce (*Ipomoea batatas*) en donde se evaluaron parámetros analíticos como dependencia del pH, límite de detección, rango lineal, estabilidad operacional y de almacenamiento. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento claramente diferente para los diferentes biosensores, destacando la superioridad del sensor basado en PPR.

A pesar de la existencia de un trabajo que involucró el uso de PPR en la construcción de un biosensor, nuestro trabajo orientó su interés al estudio y caracterización bioelectroquímica de la PPR inmovilizada en electrodos

⁸ PERREAULT, F., FARIA, A. F., & ELIMELECH, M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. The Royal Society of Chemistry. 2015

⁹ KUILA, T., BOSE, S., KHANRA, P., MISHRA, A. K., KIM, N. H., & LEE, J. H. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 4637-4648. 2011

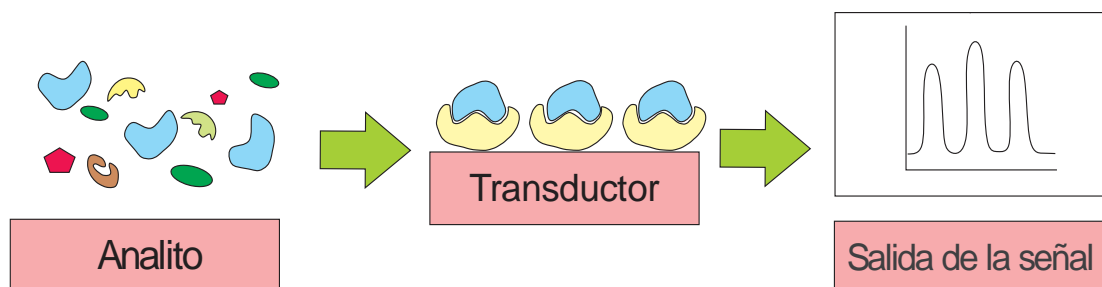
¹⁰ INNA S. ALPEEVA, M. N.-N. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 742-748. 2005

serigrafados de grafeno en busca de mejorar las propiedades de detección de los biosensores enzimáticos.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Biosensores Un biosensor se define normalmente como un dispositivo capaz de identificar y cuantificar un analito de interés desde una muestra compleja¹¹. Básicamente, los biosensores constan de tres componentes: un sistema biológico de reconocimiento, un transductor y un sistema de análisis de datos. Ver figura 1.

Figura 1. Configuración típica de un biosensor



El sistema biológico de reconocimiento se encuentra cercanamente integrado al transductor. Inicialmente, el funcionamiento del biosensor se encuentra determinado por el receptor biológico, el cual interactúa específicamente con un analito de la muestra generando una señal cuantificable¹². Esta señal es reconocida y procesada por el transductor y, finalmente un sistema de análisis de datos traduce la señal.

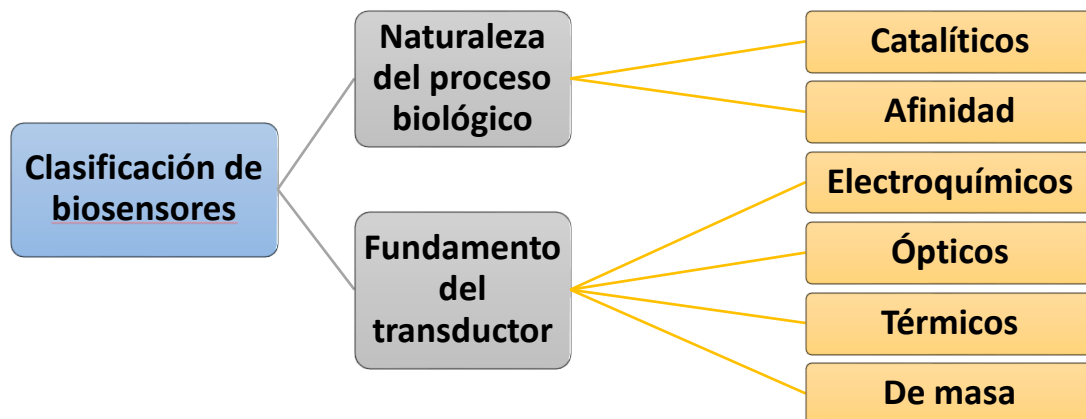
¹¹ SABINE BORGMANN, A. S. Amperometric Biosensors. *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. 2011

¹² J. A. GOODE, J. V. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *American Chemical Society*. 2014

Los dispositivos de detección pueden ser clasificados en dos formas: según el tipo de bioreceptor o de acuerdo al método de transducción de la señal. En la figura 2 se muestra los criterios bajo los cuales se clasifican los biosensores.

La clasificación que se desarrolla en torno al tipo de bioreceptor genera dos grandes categorías: biosensores catalíticos que utilizan enzimas y, biosensores de afinidad que utilizan proteínas o nucleótidos de unión incluyendo inmunosensores¹³.

Figura 2. Clasificación de biosensores



Por otro lado, los biosensores se pueden clasificar según el fundamento físico del transductor en: electroquímicos, ópticos, térmicos, de masa, etc. Aunque se han desarrollado una gran variedad de métodos de transducción, los más comunes son los transductores electroquímicos y ópticos seguidos de los piezoeléctricos.

1.2.1.1 Transductores electroquímicos El diseño de biosensores es un área de desarrollo que avanza a un ritmo acelerado y genera una búsqueda continua de nuevos métodos analíticos. Estos dispositivos están siendo utilizados con gran

¹³ JOHN H.T. LUONG, K. B. Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*. ELSERVIER. 2008

éxito en química clínica, industria de alimentos, y medio ambiente¹⁴, generando expectativas de revolucionar metodologías analíticas.

En los últimos años, los transductores electroquímicos han generado un gran número de publicaciones, ligados al hecho de ser dispositivos de fabricación simple y económica en comparación al resto de los transductores. Tienen amplios intervalos de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos. Por otro lado, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potencióstatos y conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis¹⁵.

Dentro de la clasificación de biosensores que utilizan transductores electroquímicos encontramos tres grandes grupos; conductimétricos, potenciométricos y amperométricos, resumidos en la tabla¹⁶ 1.

Tabla 1. Tipos de transductores electroquímicos clasificados por el tipo de medición, con los analitos correspondientes medidos.

Tipo de medición	Transductor	Analito
Potenciométrico	Electrodos selectivos a iones (ISE)	K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻
	Electrodos de vidrio	H ⁺ , Na ⁺ , ...
	Electrodo de gas	CO ₂ , NH ₃
	Electrodo de metal	Especies redox
Amperométrico	Electrodo de metal o carbono	Azúcares, alcoholes, O ₂ ...
	Electrodos modificados químicamente (CME)	Azúcares, alcoholes, fenoles, oligonucleótidos

¹⁴ TELTING-DIAZ, E. B. *Electrochemical Sensors. American Chemical Society.* 2002

¹⁵ RUIZ, J. G. *Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria.* Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. 2006

¹⁶ DANIEL R. THÉVENOT, K. T. *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Biosensors & Bioelectronics. ELSEVIER.* 2001

Tipo de medición	Transductor	Analito
Conductimétrico/ impedimétrico	Electrodos interdigitados, electrodos metálicos	Urea, oligonucleótidos, especies cargadas

1.2.1.1.1 Biosensores Amperométricos. Los dispositivos amperométricos se basan en la medición de la corriente resultante de la oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva.

La medición se lleva a cabo mediante la aplicación de un potencial fijo sobre el electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o carbono, con respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de casos para completar la celda electroquímica¹⁷.

La corriente resultante se correlaciona directamente con la concentración de la especie electroactiva o tasa de producción o de consumo dentro de la capa biocatalítica adyacente del transductor.

Hoy día es fácil encontrar un sin número de electrodos con los que se puede construir una celda electroquímica. Sin embargo, la ingeniería electrónica desde hace más de cincuenta años proporciona la técnica de serigrafado, donde el sistema de tres electrodos se encuentra integrado en un circuito impreso en un solo elemento.

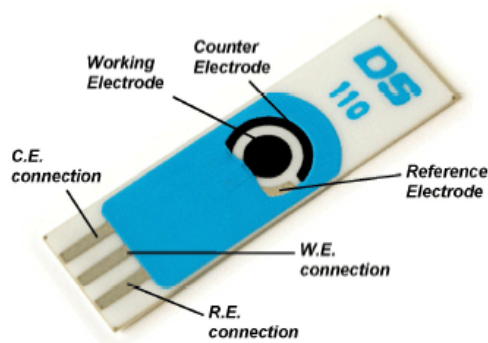
1.2.1.1.2 Electrodo serigrafado. En cualquier sensor el transductor juega un papel importante, así, a través del tiempo se han venido estudiando diferentes configuraciones y diseños de los mismo.

¹⁷ DANIELLE W. KIMMEL, G. L. Electrochemical Sensors and Biosensors. *American Chemical Society*. 2011

En los últimos años se están popularizando los electrodos serigrafiados como herramienta para reemplazar las celdas convencionales útiles en áreas medioambientales, clínica o agroalimentaria. Un electrodo serigrafiado es una pequeña tarjeta donde se encuentra un circuito eléctrico integrado, está fabricado de diferentes materiales como: carbono, oro, platino, plata, nanotubos de carbono o nanopartículas de oro.

Los electrodos de compuestos basados en formas alotrópicas de carbono son especialmente atractivos para la construcción de sensores electroquímicos: son en gran medida químicamente inertes y dan lugar a un amplio intervalo de potenciales de trabajo con una baja resistividad eléctrica. Además, tienen una estructura cristalina que genera bajas corrientes residuales y una alta relación señal-ruido. La principal ventaja de estos electrodos es su pequeño tamaño y facilidad de modificación lo que los hace idóneos para el manejo de pequeños volúmenes de muestra (μL).

Figura 3. Electrodo serigrafiado



El electrodo de trabajo y el auxiliar son de carbono mientras que el electrodo de referencia es de plata, al igual que los contactos eléctricos. El electrodo de trabajo es circular y presenta un diámetro de 4 mm.

Fuente: DROPSSENS [en línea] disponible en: <http://www.dropsens.com/inicio.html>

1.2.1.1.3 Modificación de electrodos El carbono presenta cualidades excepcionales como electrodo de trabajo, pero es relativamente inerte y difícil de modificar químicamente. Como consecuencia la capacidad de los electrodos serigrafados para retener material proteico es muy baja¹⁸. Para potenciar esta retención se hace necesaria la modificación de la superficie del electrodo. Una de las técnicas más usadas es la nanoestructuración del electrodo de trabajo, con la inserción de materiales electroconductores de tamaño nanométrico, como es el caso de nanotubos de carbono (CNT) y capas de grafeno.

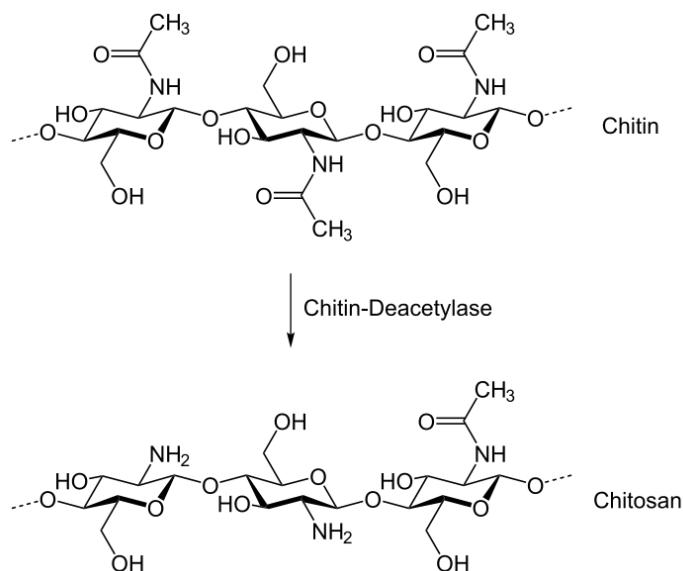
El éxito de la nanoestructuración mediante el uso de nanomateriales a base de carbono se basa en las propiedades únicas del nanomaterial, tales como la elevada relación área/superficie, alta energía superficial y relación de superficie/volumen, estabilidad térmica, fácil funcionalización y la posibilidad de actuar como cables electroconductores entre el electrodo y el centro activo redox de la biomolécula¹⁹.

Otra forma de modificar la superficie de los electrodos es mediante la inmovilización de biomoléculas, que para el interés de este trabajo aborda la coinmovilización de una enzima utilizando quitosano y glutaraldehído.

¹⁸ MENÉNDEZ, G. Á. Optimización de un inmunosensor electroquímico para la detección de cáncer de próstata. *Universidad de Oviedo*, 54 P. 2012

¹⁹ REYNALDO VILLALONGA, P. D. Supramolecular Immobilization of Xanthine Oxidase on Electropolymerized Matrix of Functionalized Hybrid Bold Nanoparticles/Single-Walled Carbon Nanotubes for the Preparation of Electrochemical Biosensors. *American Chemical Society*. 2012

Figura 4. Síntesis enzimática del quitosano



Fuente: WIKIMEDIA Chitosan Synthese [en línea] disponible en: wikimedia.org/wiki/File:Chitosan_Synthese.svg

El quitosano (CS) es un polisacárido catiónico natural, que se sintetiza a partir de N-desacetilación parcial de la quitina. Es un polímero biodegradable, no tóxico, biocompatible y semipermeable. Cuenta con grupos amina e hidroxilo en la cadena polimérica que a su vez son reactivos y le permiten realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como la reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas etc., de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, etc²⁰.

Por otro lado, el glutaraldehído (GA), aldehído altamente reactivo que ha sido ampliamente utilizado como fijador y entrecruzante en ensayos biológicos, reacciona reversiblemente con grupos amino de proteínas en un rango de pH entre 7-9, donde la reversibilidad observada es pequeña. El entrecruzamiento del

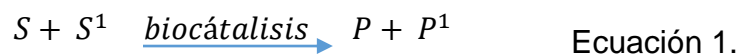
²⁰ LÁREZ VELÁSQUEZ, C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 91-109. 2003

GA con proteínas generalmente implica los grupos amino de residuos de lisina. Los residuos de lisina habitualmente no comprometen el sitio activo catalítico, permitiendo el entrecruzamiento moderado para preservar la conformación de la proteína y su actividad biológica.

Una vez descritas las posibles formas de transductores electroquímicos, es preciso detallar los elementos biológicos que reconocen el analito de interés.

1.2.1.2 Receptor biológico catalítico. Los biosensores catalíticos usan como receptores enzimas, tejidos o células. Son los biosensores mejor conocidos y los más aplicados. Utilizan biocatalizadores favoreciendo muy eficientemente los procesos biológicos adicionando especificidad y regioselectividad además de acelerar las reacciones químicas a través de la disminución de la energía de activación.

Estos biocatalizadores pueden ser sistemas que contienen enzimas o sistemas multienzimáticos aislados, orgánulos celulares, células completas o tejidos animales o vegetales. Uno o más analitos, generalmente llamados sustrato S y S¹ reaccionan en presencia de la enzima(s), células enteras o cultivo de tejidos; dando como resultado uno o varios productos, P y P¹, como se muestra en la reacción general:

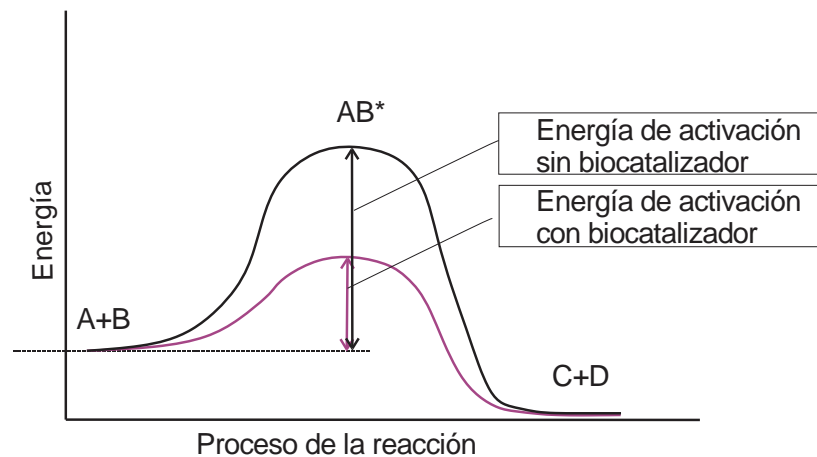


Algunas de las estrategias usadas para el monitoreo del progreso de la reacción son: (1) consumo de alguno de los sustratos que participan en la reacción, (2) detección de la aparición de algún producto P conocido, (3) detección del estado redox de la biocatalizador; (4) medición de transferencia de electrones.

1.2.1.2.1 Biosensores enzimáticos. Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, reduciendo el gasto de energía de una transformación desde reactivos a productos como se ilustra en la figura 5.

En una reacción catalizada por una enzima se produce la unión del sustrato en una región concreta de la enzima denominada centro activo, que comprende un sitio de unión y un sitio catalítico. Una vez formados los productos la enzima se recupera pudiendo comenzar un nuevo ciclo de reacción. En ocasiones puede ser necesaria la presencia de cofactores para que la enzima pueda regenerarse y estar activa nuevamente.

Figura 5. Las enzimas reducen la energía de activación.



La actividad enzimática está relacionada normalmente con el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de cofactores. Por otro lado, la estabilidad de las enzimas es un factor limitante para el tiempo de vida de un biosensor de tipo enzimático y se utilizan distintas técnicas para aumentarla, como estabilización química y/o inmovilización.

Entre las enzimas disponibles comercialmente las más utilizadas suelen ser las óxidoreductasas. Son enzimas muy estables que catalizan fenómenos de oxidación o reducción.

1.2.1.2.2 Oxidoreductasas. Las oxidorreductasas comprenden la gran clase de enzimas que catalizan reacciones biológicas de oxidación / reducción. Debido a la existencia de muchas transformaciones químicas y bioquímicas que implican este tipo de procesos, se ha generado una noción de desarrollo atractiva de aplicaciones prácticas biocatalíticas de enzimas oxidorreductasas.

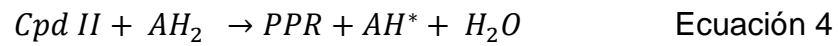
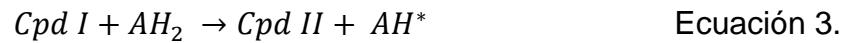
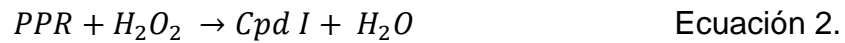
Una de las características más importantes para esta clasificación de enzimas, concierne la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de un dador (agente receptor) a un aceptor (agente oxidante) en el medio biológico de reacción, de tal forma que se modifique el estado de oxidación del sustrato.

Todas las oxidorreductasas requieren coenzimas, estas, pueden actuar en forma soluble o como grupos prostéticos, como por ejemplo, las coenzimas hemo con función redox que se encuentran en la cadena respiratoria, en la fotosíntesis y peroxidasas.

1.2.1.2.3 Peroxidasas. Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con un peso aproximado de 42 kDa, en las cuales la porción proteica corresponde a aproximadamente 34 kDa, el resto del peso está constituido por el grupo prostético (grupo hemo)²¹.

Las peroxidasas son generalmente enzimas de proteína de porfirina de hierro que catalizan muy eficientemente procesos biológicos. Estas catalizan la oxidación de diferentes sustancias electro donadoras (e.g. fenoles, aminas aromáticas) en presencia de peróxido de hidrógeno:

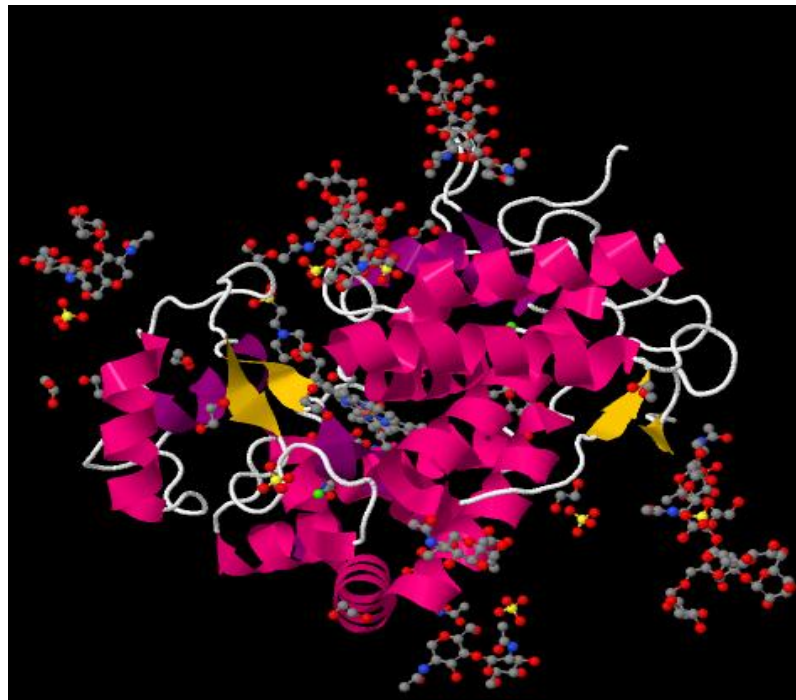
²¹ CASTILLO, J. J. Separación y caracterización de las isoenzimas de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*). *Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química*, 87P. 2001



Donde PPR es la enzima, Cpd I y Cpd II son los compuestos I y II correspondientes a intermediarios oxidados de la peroxidasa, y AH_2 y AH^* son el sustrato donante de electrones y el producto radical de su oxidación, respectivamente.

1.2.1.2.4 Peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*)

Figura 6. Visualización de la estructura cristalina de la peroxidasa de palma real mediante el software PyMOL.



Estructura cristalina de la Peroxidasa de Palma Real tomado de la base de datos Protein Data Bank código 3HDL

Las hojas de palma real presentan altos contenidos de enzimas peroxidasas, las cuales se mantienen constantes durante todo el año y en varias etapas de crecimiento.

La peroxidasa de palma real está compuesta por 304 residuos aminoacídicos rodeada de 586 moléculas de agua, es una glicoproteína de peso molecular 44.6 kDa incluyendo un grupo prostético hemo, ocho sulfatos y dos iones calcio; su peso molecular es alto en comparación con las otras peroxidasas debido a su alto grado de glicosilación. Posee un punto isoeléctrico pI: 3.5 y un máximo de absorción a los 403 nm como espectro característico de las hemo peroxidasas, también llamado pico de Soret²².

En la visualización de la estructura cristalina de la peroxidasa de palma real (figura 6) se observa la presencia de 18 hélices alfa y 4 plegamientos beta dentro de una misma cadena polipeptídica; además de alta glicosilación compuesta por nueve glicanos heterogéneos de N-acetil-D-glucosamina, α -L-fucosa, manosa y xilosa²³.

1.2.2 Técnicas electroquímicas utilizadas para el estudio de biosensores. La electroquímica se ocupa del estudio de los cambios y la transformación de la energía eléctrica en energía química, o el proceso inverso en que la corriente eléctrica se genera mediante una reacción química, como es el caso de una batería.

²² INNA S. ALPEEVA, M. N.-N. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 742-748. 2005

²³ LEANDRA WATANABE, P. R. Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of Structural Biology*, 226-242. 2010

Históricamente, muchas técnicas electroanalíticas se han desarrollado, estas, pueden ser clasificadas en cuatro principales categorías: potenciometría, voltamperometría, coulometría e impedanciometría²⁴.

1.2.2.1 Voltamperometría. La voltamperometría es un conjunto de técnicas basadas en la relación existente entre corriente y voltaje durante un proceso electroquímico. En voltamperometría, un potencial dependiente del tiempo se aplica a un electrodo de trabajo, cambiando su potencial con respecto al potencial fijo del electrodo de referencia²⁵.

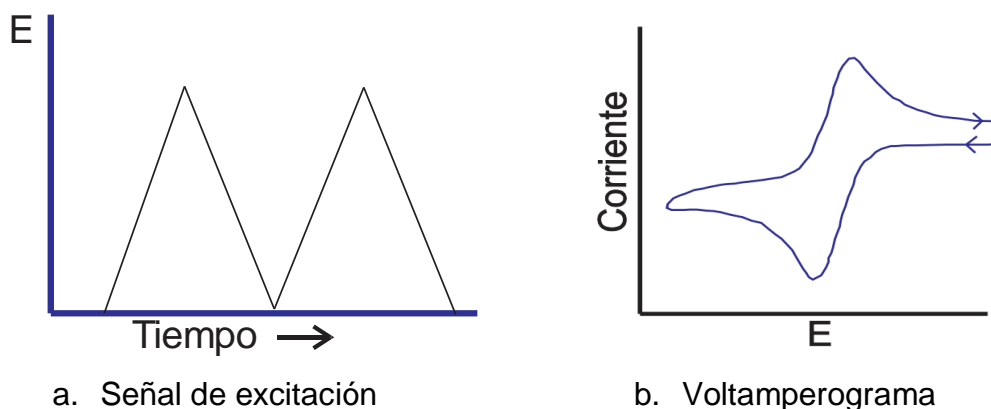
La corriente resultante, que fluye entre el electrodo de trabajo y un electrodo auxiliar, se mide como función del potencial; la gráfica resultante de la corriente en función del potencial aplicado se llama voltamperograma. Esta técnica fue desarrollada por primera vez por Jaroslav Heyrovsky en 1922, por el que fue galardonado con el Premio Nobel de Química en 1959.

1.2.2.2 Voltamperometría Cíclica. En las técnicas de voltamperometría se escanea el potencial en una dirección, ya sea a potenciales positivos o a potenciales negativos. En voltamperometría cíclica se contempla una exploración en ambas direcciones. La figura 7 a se muestra una señal típica de potencial de excitación.

²⁴ KISSINGER, P. T., & BOTT, A. W. Electrochemistry for the Non-Electrochemist. *Current Separations*. 2002

²⁵ HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. En D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry* (pág. 816). McGraw Hill Companies. 1999

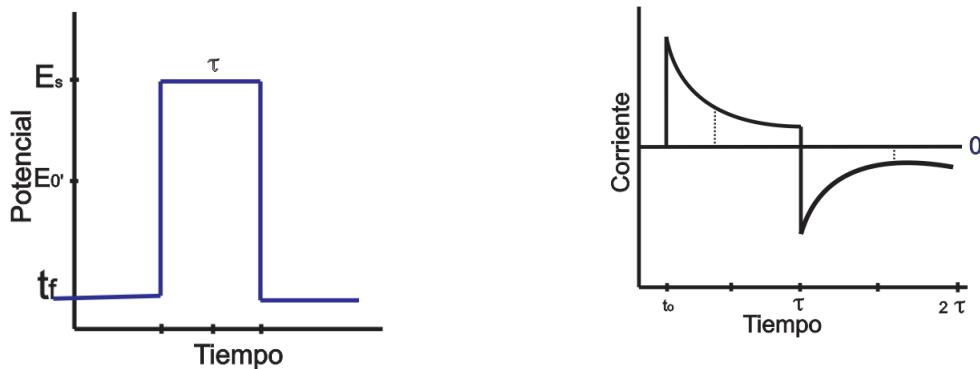
Figura 7. Voltamperometría Cíclica



Con la onda de forma triangular que se muestra en la figura, el potencial varía de forma cíclica entre dos valores, primero aumenta linealmente hasta un máximo y después disminuye linealmente con una pendiente del mismo valor numérico hasta su valor original. Este proceso se puede repetir numerosas veces, registrándose la intensidad de corriente en función del tiempo. Como resultado de la medición se obtiene una gráfica como se muestra en la figura 7 b donde se muestran los picos de corriente y de potenciales.

1.2.2.3 Cronoamperometría. La cronoamperometría es un método electroquímico en el que se aplica un salto de potencial como señal de excitación al electrodo de trabajo en régimen de reposo (Figura 8 a) y la corriente, i , que pasa entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se mide como una función del tiempo, t , (Figura 8 b).

Figura 8. Cronoamperometría. Aplicación de un pulso de potencial al sistema y estudio de la variación de la corriente contra el tiempo.



a. Pulso de potencial

b. Respuesta de corriente vs tiempo

El sistema experimental básico consta de un generador de señales, un potencióstato que impone dicho potencial al electrodo de trabajo respecto al electrodo de referencia, la celda electroquímica y un dispositivo para recoger la respuesta.

2. METODOLOGÍA

2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Peróxido de hidrógeno (30% p/v) y guayacol de J.T Baker, glutaraldehído y quitosano de Sigma-Aldich, sulfato de amonio y polietilenglicol (PM 10000) de Merck. Los reactivos utilizados para la preparación de soluciones buffers y otras soluciones fueron todos de grado analítico y proporcionado por J.T Baker. La peroxidasa de palma real (PPR) fue extraída y semi-purificada en el laboratorio perteneciente al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander (UIS)

Software NOVA (NOVA 1.10.1.9 software for Autolab instruments)

Electrodos de grafeno (Dropsens screen-printed electrodes 110D)

Espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU).

AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT

Purificador de proteínas Bio-RAD BioLogic LP

Celda electroquímica (DRP-CELL-70077) (Ver Figura. 9)

Figura 9. Celda electroquímica (DRP-CELL-70077)



2.2 ETAPA I: Extracción y semi-purificación.

2.2.1 Extracción La extracción de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) se llevó a cabo siguiendo una metodología similar a la de Sakharov y col.²⁶

Para tal fin, a un grupo de hojas de una planta de palma real se le sustrajo un penacho de hojas pinadas y a continuación se separaron del tallo y fueron despojadas de la nervadura central. Una vez preparadas las hojas fueron cortadas en pedazos no superiores a 5 cm y trituradas en un molino de granos. (Ver figura 13)

Una vez trituradas las hojas, se procedió a homogeneizar el material vegetal utilizando una solución buffer fosfato 10mM (pH 6.0). Para esto, se pesaron 50 gramos de triturado el cual fue dividido en dos porciones iguales. La primera porción fue homogeneizada en 120 mL de solución buffer fosfato 10mM (pH 6.0) e incubada por 12 horas en agitación constante. Terminado el tiempo de homogeneización, se filtró y centrifugó el extracto. El precipitado fue descartado y

²⁶ SAKHROV, I., VESGA, M., GALEWV, I., & SAKHAROVA, A. O. Peroxidase from royal palm tree *Roystonea regia*: Purification and properties. *Plant Science*. 2001

se conservó el sobrenadante para realizar la homogeneización de la segunda porción del material vegetal, repitiéndose el proceso anterior con el fin de concentrar la peroxidasa.

Al finalizar la extracción, se midió la concentración de proteínas y la actividad enzimática del extracto. El extracto enzimático se conservó a 4°C para experimentos posteriores.

2.2.2 Eliminación de pigmentos. La eliminación de pigmentos se realizó en medio acuoso mediante la formación de dos fases insolubles.

La formación de dos capas insolubles se consiguió adicionando lentamente y en constante agitación polietilenglicol (PEG 10000-15000 Da) a una concentración de 14% (p/v) al extracto enzimático. Adicionalmente, se introdujo sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ hasta alcanzar una concentración 10% (p/v); se agitó el sistema hasta conseguir una completa disolución.

La mezcla se dejó en reposo en un embudo de separación y a temperatura ambiente hasta que se logró la separación de dos capas insolubles (Ver figura 14). La PPR quedó contenida en la capa clara inferior, a la cual se le midió la concentración de proteínas y actividad enzimática. El extracto enzimático se conservó a 4°C.

2.2.3 Cromatografía Hidrofóbica. El proceso de purificación continuó mediante el uso de cromatografía hidrofóbica con ayuda del equipo Bio-RAD BioLogic LP (Ver figura 10). En primera instancia, se empacó y preparó una columna de 25 cm³ con Fenil-Sefarosa como soporte; el cual funciona como matriz apolar donde los residuos aminoacídicos hidrofóbicos expuestos superficialmente de la PPR se adsorben. El soporte fue equilibrado con una solución buffer fosfato 100mM (pH 6.5) que contenía sulfato de amonio 1.7 M.

Una vez equilibrada la columna, se aplicó el extracto enzimático de PPR a un flujo de 1 mL/min. Posteriormente, la muestra se eluyó mediante un gradiente salino que inició con una solución 1.7 M de sulfato de amonio, disminuyendo gradualmente la concentración hasta una concentración de 0.1 M.

Las fracciones eluidas fueron recolectadas en tubos de ensayos. Se midió actividad enzimática y las fracciones con contenido de peroxidasa fueron unidas y almacenadas a 4°C para la siguiente etapa de purificación.

Figura 10. Purificador de proteínas Bio-RAD BioLogic LP.



2.2.4 Cromatografía de permeación en gel. Para el desarrollo de esta cromatografía, se utilizó una columna de 25 cm³ empaquetada con Sephadex G-50, soporte que fue equilibrado con una solución buffer Tris 3mM (pH 8.3).

Una vez preparada la columna, se procedió a aplicar las fracciones resultantes de la cromatografía anterior, la elución se desarrolló con la misma buffer de equilibrio. Las nuevas fracciones resultantes se analizaron a modo de establecer la fracción con mayor actividad enzimática.

A esta última fracción, se le determinó la actividad enzimática y el contenido de proteínas. La fracción se almacenó a 4°C para los posteriores experimentos electroquímicos.

2.2.5 Determinación de Proteínas. La determinación de la concentración de proteínas en las diferentes etapas de semi-purificación de peroxidasa de palma real, se determinó por el método colorimétrico de Bradford²⁷, usando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón estándar.

La concentración de proteínas se obtuvo por interpolación con una curva de calibrado que relaciona la concentración de proteína con la absorbancia a 595 nm medidas en un espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU). La concentración de proteína se expresa en mg de proteína por mL de solución. Cada ensayo se realizó por triplicado.

2.2.6 Determinación de Actividad Enzimática. La actividad catalítica de la peroxidasa (PPR) se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción. Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU) usando como sustrato guayacol y determinando la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol con coeficiente de extinción molar de $5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

²⁷ BRADFORD., M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976

La reacción se realizó de la siguiente forma: 10 μL de PPR fue adicionada a 2.5 mL de solución buffer fosfato de potasio 10 mM (pH 6) que contenía 5 μL de guayacol y 4.4 mM de H_2O_2 , posterior, se cuantificó la variación de absorbancia a 470 nm.

Una unidad de actividad peroxidasa (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de guayacol por minuto bajo condiciones de pH 6.0 y temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. La actividad específica es expresada como unidades de actividad de peroxidasa por miligramo de proteína.

2.3 ETAPA II: MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS DE GRAFENO.

La modificación de los electrodos de grafeno se realizó mediante la coinmovilización de peroxidasa de palma real (PPR) y quitosano (CS) utilizando glutaraldehído (GA) como herramienta entrecruzante. La modificación de los electrodos se llevó a cabo siguiendo una metodología similar a la de Qingxiang y col.²⁸

Para tal caso, se tomaron 0.5 mg de CS y se disolvieron en 2 mL ácido acético 2%. Preparada la mezcla, se tomaron 10 μL de esta y se depositaron sobre el electrodo. El electrodo modificado (SPE/CS) se dejó en reposo por 12 horas a temperatura ambiente.

A continuación se preparó un mezcla GA 1% (p/v), se depositaron 10 μL de esta sobre la superficie del electrodo de trabajo previamente modificado con CS. El

²⁸ QINGXIANG WANG, B. Z. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 599-605. 2011

electrodo modificado (SPE/CS/GA) se dejó en reposo por 12 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, se adicionaron 10 μ L de PPR sobre el electrodo modificado (SPE/CS/GA/PPR), se dejó incubando por 12 horas a 4°C.

En cada paso de modificación se lavó el electrodo cuidadosamente con solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) con el fin de remover moléculas no adsorbidas.

2.4 ETAPA III: CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.

Para el desarrollo de las mediciones electroquímicas se utilizó el equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT. Los datos se procesaron mediante el software NOVA (NOVA 1.10.1.9 software for Autolab instruments)

El montaje de medición dispuso del dispositivo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT conectado a los tres electrodos integrados en el electrodo serigrafiado (DS D110 grafeno), el cual permanecía en contacto con la solución electrolítica mientras transcurrían las respectivas mediciones. Todo el sistema de medición se acopló a una computadora con el software NOVA para el respectivo procesamiento de datos (Figura 11, 12).

Figura 11. Representación del montaje experimental.

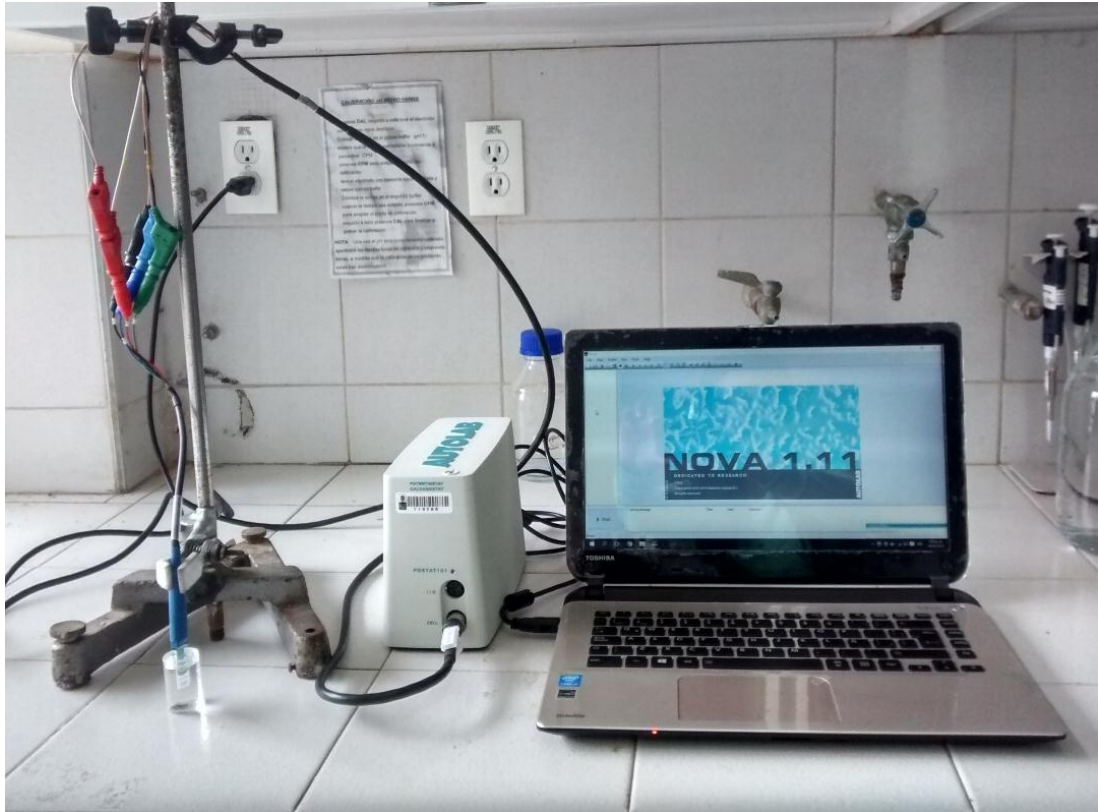
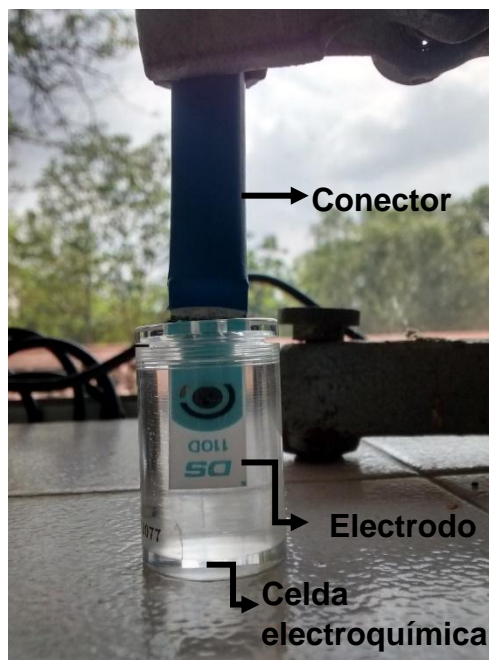


Figura 12. Partes del montaje experimental.



2.4.1 Caracterización de los electrodos usando ferrocianuro de potasio como electrolito modelo. Aprovechando las propiedades de transferencia de electrones del ferrocianuro de potasio, se realizaron mediciones por VC usándolo como electrolito modelo para la obtención de voltamogramas (VCs) bien definidos.

Para llevar a cabo la caracterización de los electrodos en ferrocianuro de potasio se preparó una solución 10mM $K_3[Fe(CN)_6]$ con 0.1 M KCl.

Preparado el montaje descrito en la figura 9, se tomaron 7 mL de 10mM $K_3[Fe(CN)_6]$ con 0,1 M KCl y se depositaron en la celda de reacción. Cada uno de los electrodos modificados y sin modificar fueron sumergidos en la celda y mediante la técnica de voltamperometría cíclica se tomaron VCs a una velocidad de barrido de 100 mV/s en un rango de potencial de 0.8 hasta -0.8 voltios.

Se analizaron cuatro controles, electrodo sin modificar (SPE), modificado con PPR (SPE/PPR), modificado con CS (SPE/CS) y modificado con CS más GA (SPE/CS/GA).

2.4.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo. Mediante VC se estudió la respuesta de los electrodos SPE, SPE/PPR y SPE/CS/GA/PPR a la detección de peróxido de hidrógeno comparando la respuesta de señal de corriente en ausencia y presencia de peróxido de hidrógeno.

Los electrodos se sumergieron en 7 mL de buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) con 0.1 M KCl como electrolito soporte, y se midieron los VCs en ausencia de H_2O_2 . Los siguientes voltamogramas se midieron en solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) con 0.1 M KCl y una concentración de 5 mM de H_2O_2 . Las mediciones se realizaron a 100 mV/s. El rango de potencial estudiado fue 0.1 hasta -1.5 voltios.

2.4.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno. La técnica de CV a diferentes velocidades de barrido se utilizó con el fin de estudiar la reversibilidad electroquímica del proceso redox que involucra la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 por la enzima PPR y el procesos de transporte de H_2O_2 a la superficie del electrodo.

El electrodo SPE/CS/GA/PPR se sumergió en 7 mL de buffer fosfato 10 mM con 0.1 M KCl y 5mM de H_2O_2 ; se tomaron VCs a velocidades de barrido comprendidas entre 50 – 500 mV/s. El rango de potencial estudiado fue 0.1 hasta -1.5 voltios.

2.4.4 Influencia del pH. Es de saber que las enzimas son dependientes del pH, razón por la cual fue de gran importancia determinar la dependencia de la respuesta del electrodo SPE/CS/GA/PPR en diferentes soluciones buffer que tamponan en pH 3 a 10.

Las buffer utilizadas fueron: 10mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), 10mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0), 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 7.0), 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 8.0) y 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0).

El procedimiento se realizó mediante VC en presencia de 1 mM H_2O_2 . Las mediciones se realizaron a 100 mV/s. El rango de potencial estudiado fue 0.1 hasta -1.5 V.

2.5 ETAPA IV: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS

Los parámetros analíticos, rango lineal, sensibilidad y límite de detección, se estudiaron mediante la construcción de curvas de calibración usando cronoamperometría a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Cada experimento se hizo se hizo por duplicado.

2.5.1 Respuesta cronoamperométrica del electrodo modificado. Mediante cronoamperometría se estudió la respuesta amperométrica del electrodo SPE/CS/GA/PPR en presencia de diferentes concentraciones de H_2O_2 utilizando un potencial fijo de -1.0 V , potencial al cual se observó un máximo de corriente catódica correspondiente a la reducción del H_2O_2 por la PPR mediante VC (Ver figura 20, 21).

En la celda de reacción se depositó 7 mL de buffer fosfato 10mM (pH 7.0) con 0.1M KCl bajo agitación. Antes de cualquier adición de H_2O_2 se dejó estabilizar el sistema hasta alcanzar la línea base correspondiente a la concentración cero de H_2O_2 . Posteriormente, se adicionaron volúmenes sucesivos de H_2O_2 cada 50 segundos aumentando en $500\ \mu\text{M}$ la concentración del analito en cada paso.

2.5.2 Estudio de la especificidad del electrodo modificado en presencia de sustancias interferentes. La especificidad del electrodo SPE/CS/GA/PPR fue evaluada en presencia de cuatro posibles sustancias interferentes: glucosa, ácido ascórbico, ácido cítrico y etanol mediante la técnica de cronoamperometría utilizando un potencial fijo de -1.0 V , potencial de trabajo del electrodo modificado al cual se observa la reducción del H_2O_2 .

Para tal propósito, en una celda de reacción se depositaron 22 mL de buffer fosfato 10mM (pH 7.0) con 0.1M KCl bajo agitación. Antes de la adición de cualquier sustancia, se dejó estabilizar el sistema hasta alcanzar una línea base.

Posteriormente, se adicionó 500 μM de peróxido de hidrógeno, generada y estabilizada la señal se añadió cada 50 segundos 500 μM de cada una de las sustancias interferentes.

2.5.3 Determinación del rango lineal. El rango lineal o intervalo dinámico lineal se refiere al intervalo de concentraciones sobre las cuales un analito puede ser determinado utilizando una curva de calibración lineal²⁹. La determinación del rango lineal para el electrodo SPE/CS/GA/PPR se realizó mediante la curva de respuesta de corriente contra diferentes concentraciones de H_2O_2 tomada del ítem anterior.

Las gráficas proporcionaron típicas ecuaciones de regresión lineal para curvas de calibración de la forma:

$$i(\mu A) = m * C \left(\frac{\mu mol}{L} \right) + b(\mu A) \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde i representa la corriente respuesta en μA , m la pendiente de la gráfica; C la concentración de H_2O_2 en μM y b el intercepto con el eje y .

La curva de calibración del ítem 2.5.1. proporcionó los límites del intervalo dinámico tanto superior como inferior donde las concentraciones o la pendiente de la curva se desviaron de la linealidad.

2.5.4 Sensibilidad. La determinación de la sensibilidad o medida de la capacidad del electrodo SPE/CS/GA/PPR para diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de H_2O_2 , se determinó mediante la curva de calibración del ítem

²⁹ SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., & CROUC, S. R. Fundamentos de Química Analítica. México: Cengage Learning. 2014

2.5.1. Se tomó la pendiente como valor de sensibilidad de calibrado según lo encontrado en Feng y col.³⁰

2.5.5 Límite de detección. La determinación de la concentración más baja de H₂O₂ que el electrodo SPE/CS/GA/PPR es capaz de detectar a un cierto nivel de confianza se determinó mediante la fórmula

$$LD = \frac{k * s_b}{m} \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde k es el llamado factor de confianza, ($K=3$.³¹), s_b corresponde a la desviación estándar de la determinación del blanco y m es la sensibilidad de calibrado.

³⁰ Feng, H., Wang, H., Zhang, Y., Yan, B., Shen, G., & Yu, R. (2007). A Direct Electrochemical Biosensing Platform Constructed by Incorporating Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles onto Redox Poly(thionine) Film. *Analytical Sciences*, 235-239.

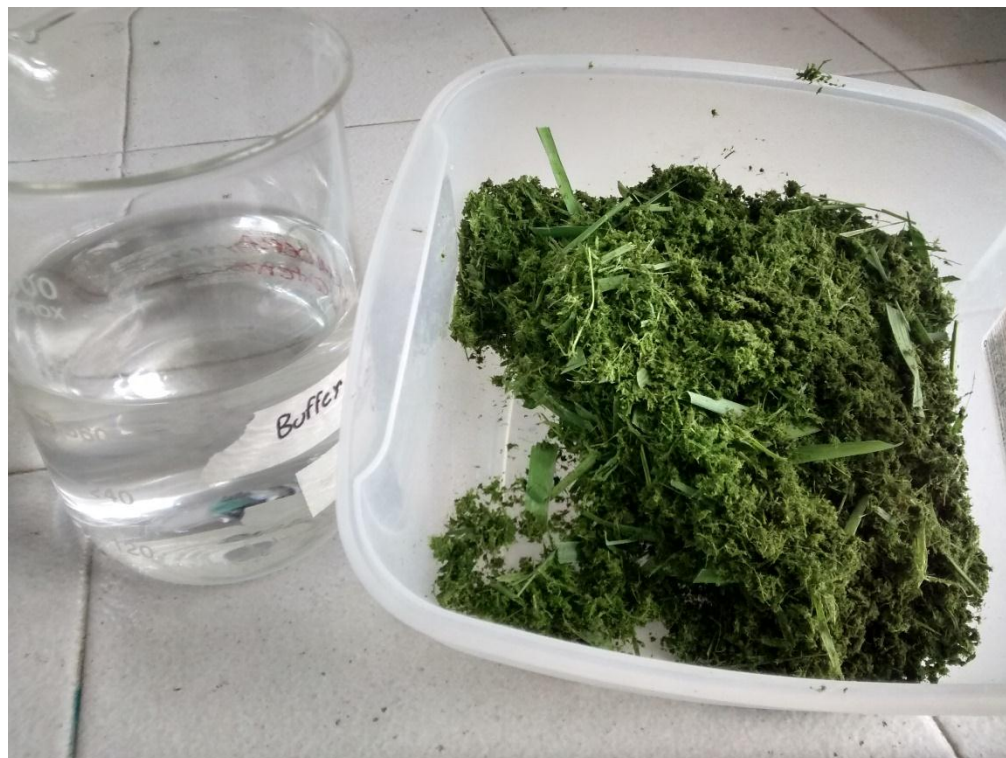
³¹ Gary L. Long, J. D. (1983). Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry*.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

3.1 EXTRACCIÓN Y SEMI-PURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*)

El desarrollo del objetivo principal inició con la extracción y semi-purificación de la enzima de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Este proceso partió con la recolección de hojas de palma. Una vez limpias y cortadas las hojas, se homogenizaron 50 gramos de hojas molidas en 120 mL una solución buffer de fosfato 10mM (pH=6.00), como se encontró en la metodología de Sakharov y col.³²

Figura 13. Material vegetal y solución buffer de extracción.



³² I.YU. SAKHAROV, M. V. Peroxidasa from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Science* 161, 853-860. 2001

Terminado el proceso de homogenización, el extracto obtenido se filtró al vacío con un embudo Büchner para eliminar partículas grandes y restos de material vegetal. El volumen colectado fue de 112 mL. La actividad específica fue 77 U/mg y la actividad total fue de 4559 U. El contenido de proteína registrado fue de 58 mg. A partir de los valores de actividad total y actividad específica se calculó el porcentaje de rendimiento de purificación y la relación de pureza respectivamente. Ver tabla 2.

El extracto presentó un color verde oscuro debido a la presencia de pigmentos, compuestos fenólicos y otros contaminantes de carácter vegetal. La eliminación de dichas sustancias es necesaria antes de realizar las etapas de purificación ya que modifican los soportes cromatográficos y además pueden llegar a inactivar la enzima de interés tal como se reporta por D. Platis y col.³³

Figura 14. Eliminación de pigmentos, formación de capas insolubles.



³³ D. PLATIS, N. L. Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. *Biotechnology Journal* 4, 1320-1327. 2009

La eliminación de pigmentos, compuestos fenólicos y otros contaminantes contenidos en el extracto se realizó en medio acuoso mediante la formación de dos fases insolubles o sistema de partición de dos fases acuosas generadas por la adición de polietilenglicol 14% y sulfato de amonio 10% como método de pre-purificación y concentración de la muestra.

Durante este proceso, se observó la formación de una capa color oscuro en la parte superior y una capa de color clara en la parte inferior. Al separar las dos capas y medir la actividad de cada una de estas, se determinó que la peroxidasa precipitó por la acción del sulfato de amonio ubicándose en la capa clara o fase acuosa de sal, mientras que los pigmentos fueron atrapados por el polietilenglicol y agrupados en la capa superior, o capa oscura.

Al finalizar este proceso, la actividad específica de la PPR aumentó 2.5 veces con un valor de 196 U/mg. El volumen total del extracto se redujo un 30%, volumen final 46 mL. El contenido de proteína determinado fue de 12 mg.

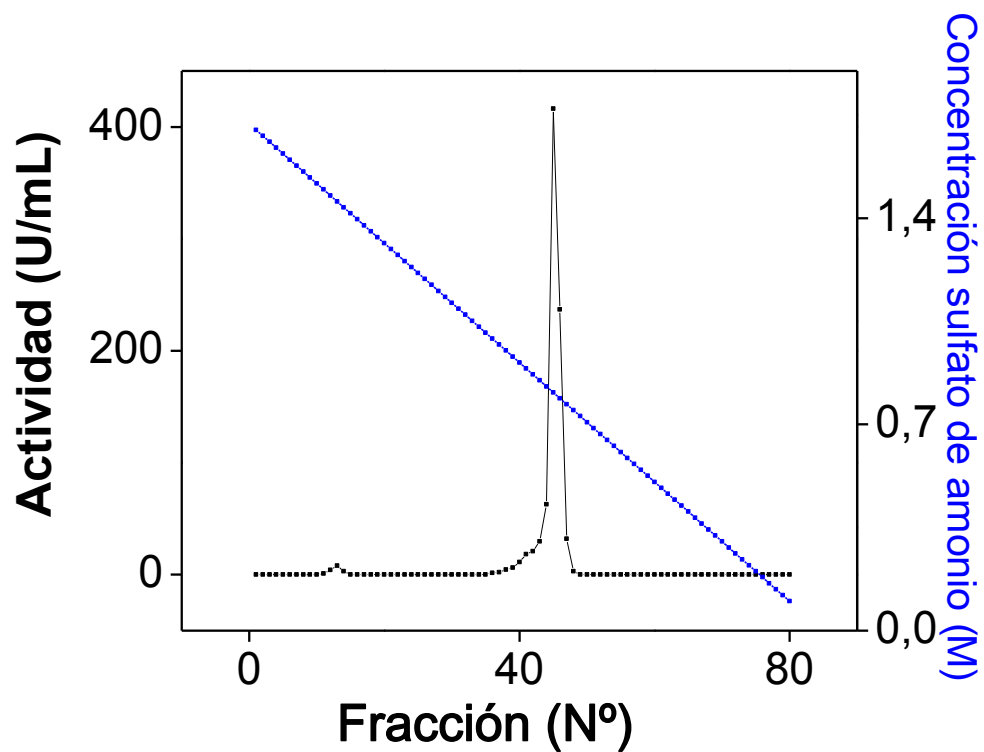
Seguidamente, la fracción con contenido enzimático se aplicó en una columna de 50 cm³ que contenía una matriz de Fenil-Sefarosa como soporte cromatográfico. La columna se equilibró inicialmente con una solución buffer fosfato 100mM (pH 6.5) sulfato de amonio de 1.7 M.

El proceso cromatográfico involucró la absorción de la peroxidasa sobre el soporte de Fenil-Sefarosa mediante interacciones hidrofóbica entre los aminoácidos superficiales de la enzima tales como tirosina, fenil alanina y triptófano y los residuos apolares del soporte cromatográfico. Para la desorción de la peroxidasa se utilizó un gradiente lineal descendente de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ desde 1,7 M hasta 0,1 M generando el fenómeno de “*salting out*”.

Terminada la corrida de la cromatografía hidrofóbica sobre fenil sefarosa, se determinó la actividad de cada una de las fracciones resultantes. Como se puede observar en la figura 15 dos picos presentaron actividad.

Para efectos de este estudio, se unieron solo las fracciones N° 44, 45 y 46, las cuales presentaron mayor actividad. La actividad específica aumentó 3.4 veces con un valor de 259 U/mg. La actividad total fue de 1372 U. El volumen total obtenido fue de 14.8 mL. El contenido de proteínas determinado fue de 5.29 mg.

Figura 15. Cromatografía hidrofóbica de la peroxidasa de palma real sobre fenil sefarosa.

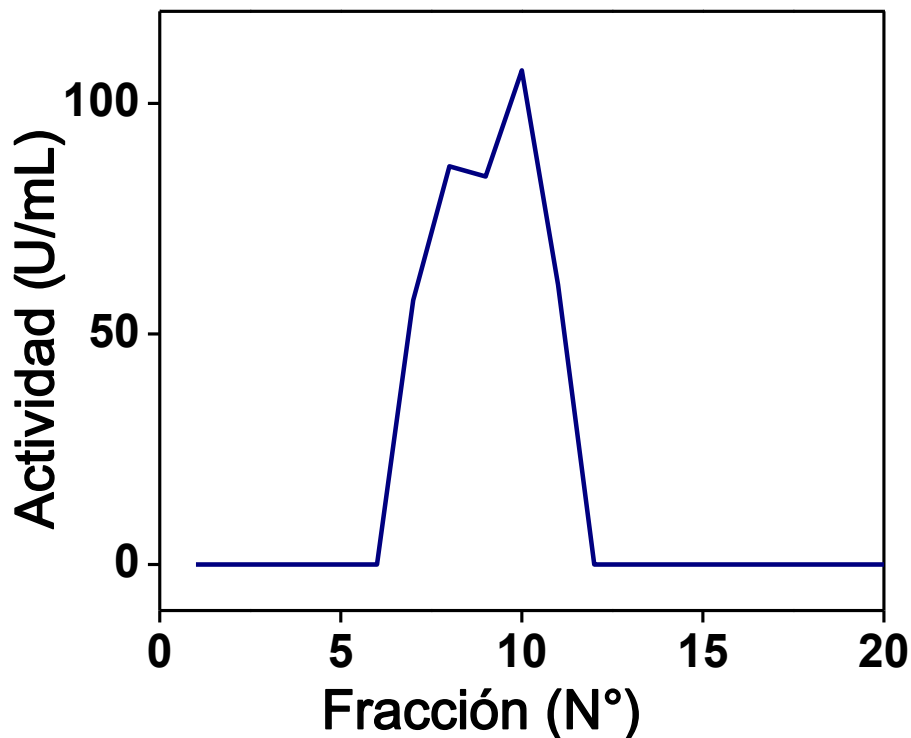


Posteriormente las fracciones con contenido de PPR fueron utilizadas en el siguiente proceso de semi-purificación por cromatografía por exclusión de tamaño.

En este caso la fracción analizada anteriormente se depositó en una columna de 50cm³ que contenía Sephadex G-50 como soporte cromatográfico. El soporte Sephadex G-50 garantiza la exclusión de moléculas con peso molecular superior a 30 kDa. La columna cromatográfica se equilibró con 50 mL de solución buffer Tris 3 mM (pH 8.3).

La elución de la peroxidasa se realizó con una solución buffer Tris 3mM (pH 8.3) tal como se reportó en Castillo y col.³⁴. Las fracciones obtenidas fueron analizadas determinándoseles la actividad como se muestra en la figura 16.

Figura 16. Cromatografía de permeación en gel de la peroxidasa de palma real sobre Sephadex G-50.



³⁴ CASTILLO, J. J. Separación y caracterización de las isoenzimas de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*). *Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química*, 87P. 2001

Las fracciones 7, 8, 9,10 y 11 fueron colectadas en un mismo recipiente para un volumen total de 20 mL que correspondió a un 20% del volumen inicial.

La actividad específica resultante de la unión de estas fracciones fue de 504 U/mg, correspondiente a un aumento de 6.5 veces. La actividad total fue de 2505 U. El contenido de proteína determinado fue 4.97 mg. El rendimiento de purificación aumentó a 55%.

El proceso de semi-purificación de la PPR se resumió en la tabla 2. En cada uno de los pasos de purificación se observó un aumento de la actividad específica, parámetro que relaciona el valor de actividad total (U) y proteína total (mg).

Tabla 2. Etapas de semi-purificación de la peroxidasa de palma real.

Procedimiento	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad total (U)	Rendimiento (%)	Pureza
Extracción	112	58.86	77.47	4559.42	100.0	1.00
Eliminación de pigmentos	46	12.76	196.94	2512.03	55.1	2.54
Cromatografía Hidrofóbica	14.8	5.29	259.65	1372.63	30.1	3.35
Cromatografía Gel	20	4.97	504.34	2505.42	55.0	6.51

3.2 MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS.

Se realizó la modificación de la superficie de los electrodos serigrafados de grafeno mediante coimmobilización de la peroxidasa de palma real (PPR) semi-purificada con quitosano (CS) y glutaraldehído (GA) utilizado como herramienta entrecruzante.

La determinación de peróxido de hidrógeno es una práctica que ha tomado gran interés en diferentes campos. Sin embargo, el análisis electroquímico de peróxido de hidrógeno es muy difícil mediante el uso de electrodos desnudos hechos de carbono vítreo, grafito u oro³⁵. Razón por la cual la modificación de la superficie del electrodo mediante la introducción de biomoléculas, tales como la enzima de PPR, se presenta como una alternativa de solución permitiendo la construcción de biosensores enzimáticos.

No obstante, la inmovilización de esta enzima PPR sobre la superficie del electrodo representó un paso crucial durante la fabricación de los electrodos modificados que requirió el desarrollo de una metodología de coinmovilización mediante la formación de enlaces covalentes entre quitosano, glutaraldehído y PPR similar a la utilizada por Qingxiang y col.³⁶

La metodología implicó el uso de quitosano como matriz y primer contacto con la superficie del electrodo. Para tal caso, se tomaron 0.5 mg de CS y se disolvieron en 2 mL ácido acético 2%. Seguidamente, 10 µL de esta solución se depositaron sobre el electrodo de trabajo del dispositivo serigrafiado (SPE) dejándose en reposo por 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el electrodo SPE/CS se lavó con cuidado con solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) con el fin de remover el CS no adsorbido.

La superficie de los electrodos de grafeno, material a nanoescala, posee la más alta área superficial específica de todos los materiales.³⁷ Este recubrimiento de

³⁵ JING-JUAN XU, D.-M. Z.-Y. A Reagentless Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Coimmobilization of Thionine and Horseradish Peroxidase by Their *Cross-Linking* with Glutaraldehyde on Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*, 713-716. 1998

³⁶ QINGXIANG WANG, B. Z. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 599-605. 2011

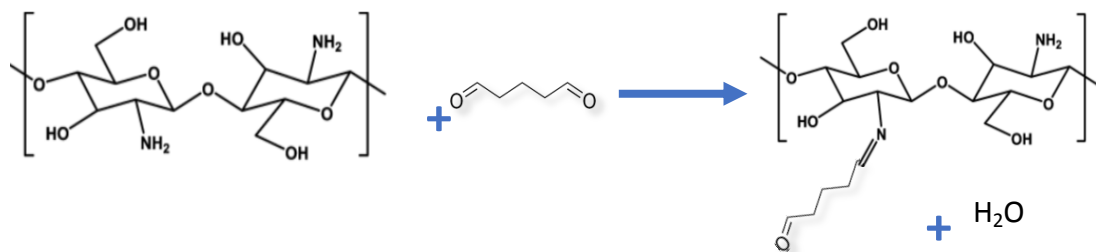
³⁷ PERREAULT, F., FARIA, A. F., & ELIMELECH, M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. *The Royal Society of Chemistry*. 2015

grafeno le confirió al electrodo una alta área superficial que le hizo ideal para el procedimiento de reacción de superficie con el CS.

Las interacciones del CS con la superficie del electrodo se vieron favorecidas gracias a los diferentes grupos reactivos amino e hidroxilo en las cadenas lineales de poliglucosamina susceptibles a modificaciones químicas.

A partir del electrodo modificado SPE/CS se construyó el electrodo modificado SPE/CS/GA mediante la adición de 10 μ L de GA 1% (p/v). Este electrodo se dejó en reposo durante 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente el electrodo fue lavado cuidadosamente con solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) para eliminar el GA no enlazados. En este paso del procedimiento se formaron los enlaces covalentes entre el CS y el GA, donde se vieron involucrados un grupo amino del CS y carboxilo del GA dando lugar a la formación de un enlace imina y como subproducto de reacción una molécula de agua por cada grupo imina formado, tal como se muestra en la figura 17.

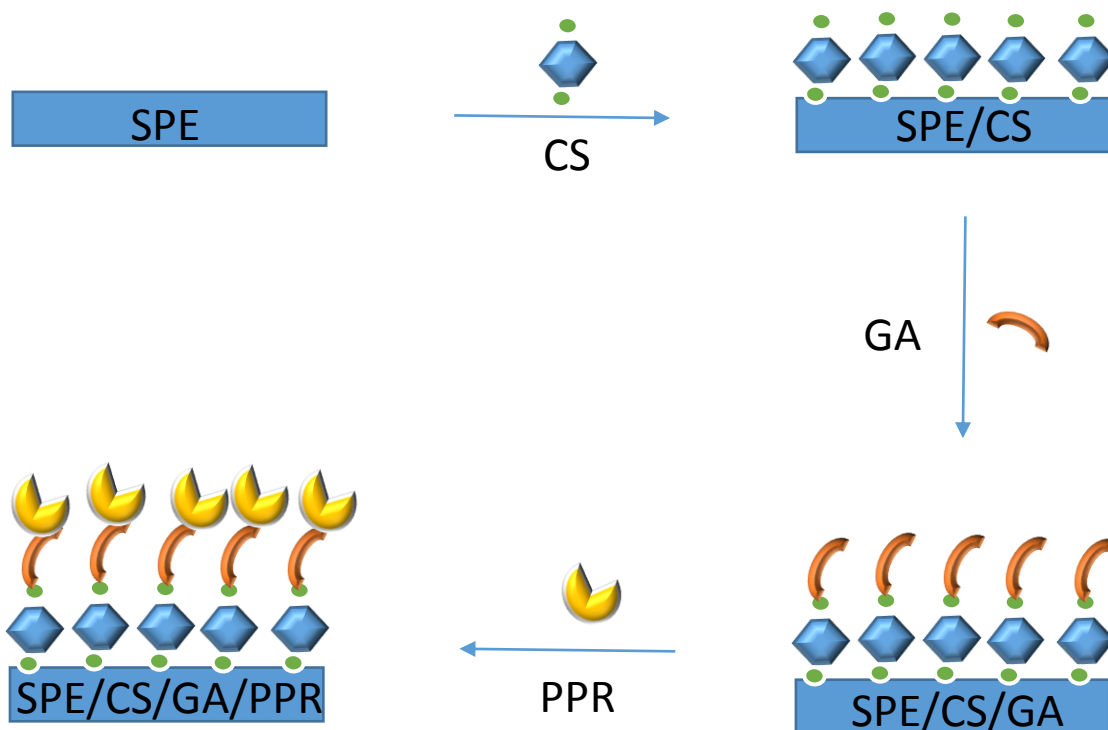
Figura 17. Posible mecanismo de reacción entre CS y GA.



La construcción del electrodo de interés terminó con la adición de 10 μ L de PPR, obteniéndose el electrodo SPE/CS/GA/PPR, figura 18. La incubación se realizó a 4 ° C durante 12 horas para conservar la enzima. Posteriormente el electrodo fue lavado cuidadosamente con solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0). En este caso la enzima se unió covalentemente al hidroxilo libre del GA mediante la formación

de un enlace imina involucrando un grupo amino proporcionado por residuos lisina³⁸. Los residuos aminoácidos de lisina se encuentran presentes en la superficie de la enzima PPR y son accesibles para reaccionar con un agente bifuncional como el glutaraldehído.³⁹

Figura 18. Diagrama esquemático de la construcción del electrodo modificado.



La comprobación de la modificación de la superficie del electrodo SPE/CS/GA/PPR se realizó mediante la técnica de VC en ferrocianuro de potasio como electrolito modelo.

³⁸ PALANISAMY, S., UNNIKRIISHNAN, B., & CHEN, S.-M. An amperometric biosensor based on direct immobilization of horseradish peroxidase on electrochemically reduced graphene oxide modified screen printed carbon electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 7935-7947. 2012

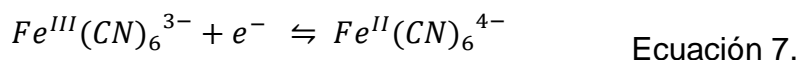
³⁹ RUEDA ARANGO, N. Preparación de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) usando albúmina de suero bovino como fuente proteica. *Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias*, 82. 2007

3.3 CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

3.3.1 Caracterización de los electrodos usando ferrocianuro de potasio como electrolito modelo. La modificación de la superficie del electrodo SPE/CS/GA/PPR se verificó utilizando voltamperometría cíclica (VC). Cada paso de modificación se monitoreó mediante la caracterización en solución de ferrocianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$ usado como electrolito modelo con el objetivo de obtener voltamogramas bien definidos. Adicionalmente se analizaron tres controles, electrodo sin modificar (SPE), modificado con CS (SPE/CS) y modificado con CS más GA (SPE/CS/GA).

En la figura 19 se muestra los voltamogramas cíclicos (VCs) del electrodo SPE/CS/GA/PPR y sus respectivos controles tomados en 7 mL de solución acuosa 10 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ con 0.1 M KCl (electrolito soporte) a una velocidad de barrido de 100 mV/s con un barrido de potencial desde 800 mV hasta -800 mV (vs Ag).

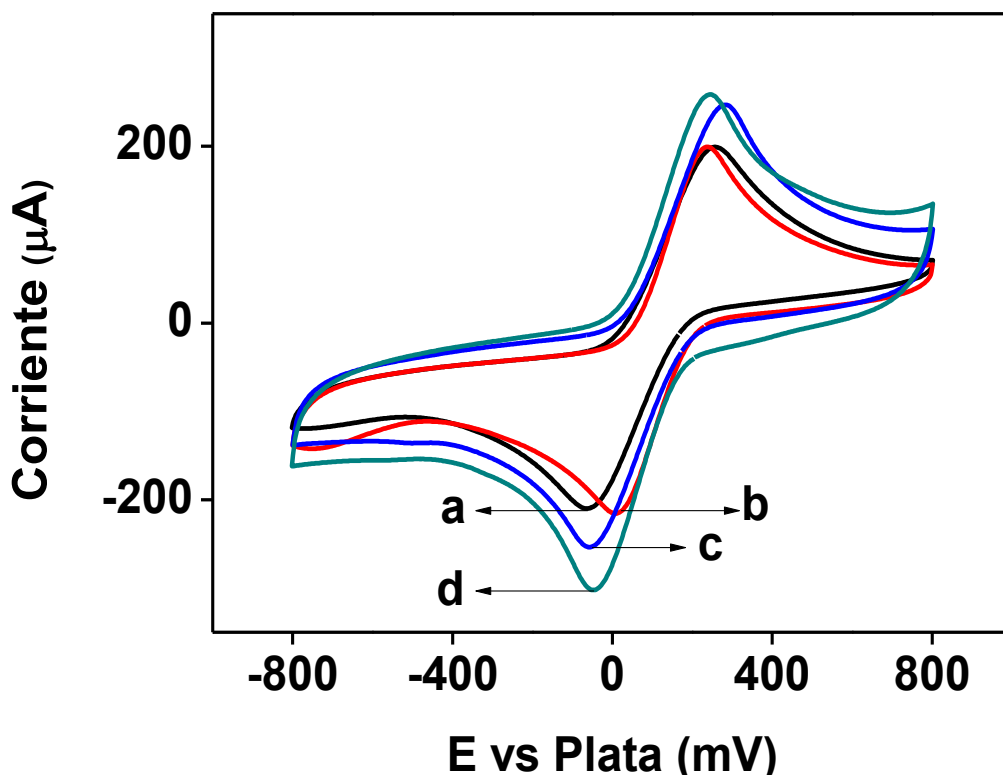
La forma que presentaron las diferentes curvas de los voltamogramas fue similar a las reportadas en la literatura.^{40, 41} Este conducta se asocia al comportamiento electroquímico reversible de la pareja redox ferricianuro/ferrocianuro (ecuación 7), sustancia comúnmente usada para demostrar el principio de VC debido a que intercambia reversible un electrón entre sus especies y la superficie del electrodo.



⁴⁰ PAULIUKAITE, R. G.-F. Comparative Study of Different *Cross-Linking* Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite-Epoxy Composite Electrode. *Analytical Chemistry*, 5364–5372. 2009

⁴¹ AMEUR, Z. O., & HUSEIN, M. M. Electrochemical behavior of potassium ferricyanide in aqueous and (w/o) microemulsion systems in the presence of dispersed nickel nanoparticles. *Separation Science and Technology* 48, 681-689. 2013

Figura 19. Comparación de VCs para los electrodos a) SPE, b) SPE/CS c) SPE/CS/GA y d) SPE/CS/GA/PPR (solución 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ con 0.1 M de KCl, velocidad de barrido 100 mV/s).



El transporte de las especies reaccionantes hacia la superficie del electrodo puede efectuarse de tres modos principalmente: difusión, migración y convección. En electroanálisis, la forma de transporte de migración se considera indeseable, razón por la cual se añadió un exceso de electrolito soporte, (0.1 M KCl) especie no electroactiva iónica que minimiza su efecto, con lo que se facilita la conductividad de la disolución al disminuir la resistencia de la celda electroquímica.⁴²

Los experimentos se realizaron sin agitación o movimiento mecánico, eliminando el transporte por convección. Así, el proceso fue controlado por difusión mediante

⁴² ALMAGRO HUERTAS, V. Cinética Electroquímica. *Universidad de Murcia*, 317-340.

el movimiento de las especies redox bajo la influencia de un gradiente de concentración.

Cada voltamograma mostró picos típicos bien definidos y cuasi-reversibles limitados por difusión con valores de delta de potencial (ΔE) de 318, 231, 340 y 290 mV para los electrodos a) SPE, b) SPE/CS, c) SPE/CS/GA y d) SPE/CS/GA/PPR respectivamente. El valor absoluto de la relación de corriente de los picos de reducción/oxidación (P_{red}/P_{ox}) fue de 1.05, 1.06, 1.02 y 1,16 en el orden anteriormente mencionado. Este último factor indica que el número de especies reducidas fue aproximadamente igual a la cantidad de especies oxidadas sobre la superficie de los diferentes electrodos. Ver tabla 3.

Se aprecia que los voltamogramas lucen diferente con cada modificación de la superficie del electrodo, lo que indicó que la adición de las sustancias modificadoras cambia la reactividad de la superficie del mismo. Por ejemplo, la modificación con quitosano SPE/CS (Figura 19 b), no presentó una mejora significativa en comparación con la señal obtenida del electrodo SPE, sin embargo se puede observar que el ΔE disminuye, siendo el más bajo en comparación con los demás electrodos, aportando reversibilidad al sistema.

No obstante, el electrodo SPE/CS/GA (Figura 19 c) mostró una respuesta de intensidad de corriente mayor a la del electrodo sin modificar y a su vez a la del electrodo SPE/CS. Como consecuencia la adición de GA al sistema hace la superficie del electrodo más reactiva a la transferencia de electrones.

Finalmente, el electrodo SPE/CS/GA/PPR (Figura 19 d) presentó la señal de corriente más elevada en comparación a los otros electrodos estudiados. Indicando que a pesar del número de modificaciones la superficie electroquímica del electrodo tiene una excelente capacidad y reactividad a la transferencia de electrones. La estrategia de coinmovilización mediante el uso de CS y GA

favoreció el proceso de transferencia de electrones haciendo que la enzima no interrumpa el mismo.

Los potenciales de los picos de oxidación/reducción ($E_{p_{ox}}$, $E_{p_{red}}$) y la relación de corriente de los picos de reducción/oxidación ($I_{p_{red}}/I_{p_{ox}}$) fueron colectados en la tabla 3.

Tabla 3. Diferencia de potencial y relación de corriente entre los picos de oxidación y reducción para los electrodos estudiados.

Electrodo	Corriente (μA)			Potencial (mV)		
	$I_{p_{ox}}$	$I_{p_{red}}$	$I_{p_{red}}/I_{p_{ox}}$	Oxidación	Reducción	ΔE
SPE	200	-209	1.05	256	-62	318
SPE/CS	200	-215	1.06	237	6.4	231
SPE/CS/GA	247	-253	1.02	284	-56	340
SPE/CS/GA/PPR	260	-302	1.16	245	-45	290

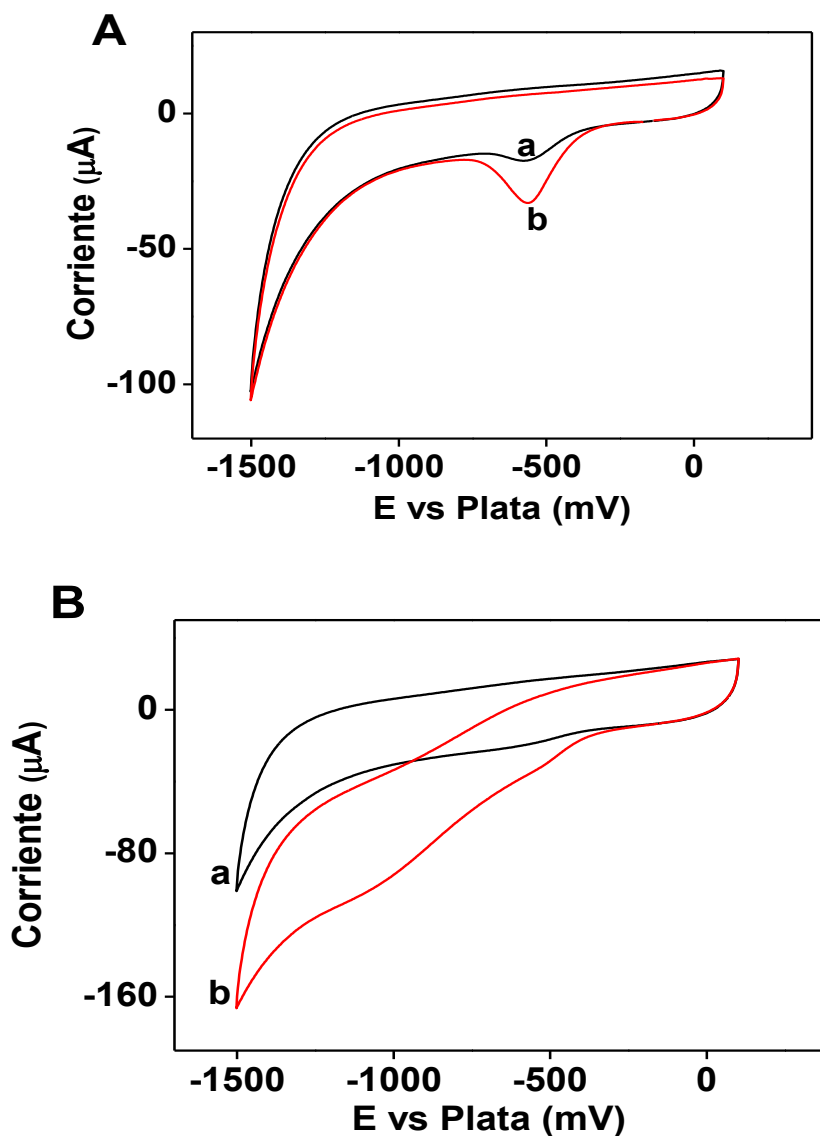
3.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta enzimática del electrodo. La respuesta del electrodo SPE/CS/GA/PPR hacia el peróxido de hidrógeno se estudió usando VC haciendo un monitoreo de las corrientes catódicas para confirmar la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por la enzima PPR. Este procedimiento se realizó en solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) con KCl 0.1 M en ausencia y presencia de peróxido de hidrógeno. Las mediciones se realizaron a 100 mV/s. El rango de potencial estudiado fue 100 hasta -1500 mV (vs Ag). Adicionalmente se analizaron dos controles, electrodo (SPE) y modificado con PPR (SPE/PPR).

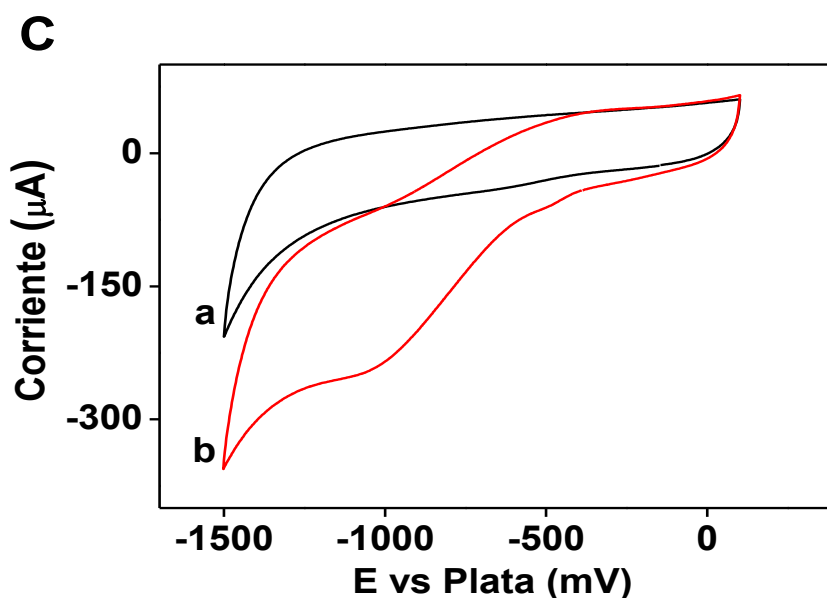
La VC es utilizada como herramienta para la caracterización inicial de potenciales redox de una molécula⁴³. Los resultados de este procedimiento arrojaron una medida cualitativa de la capacidad de los electrodos hacia la detección de

⁴³ GONZÁLES GARCÍA, I. A. Medidor de oltametría cíclica para dispositivos de transmitancia controlable. *Universidad Carlos III de Madrid Escuela Politécnica Superior*, 1-156. 2010

peróxido de hidrógeno, dando idea del valor de potencial al que se reduce el H_2O_2 sobre la superficie del electrodo.

Figura 20. VCs para los electrodos (A) SPE, (B) SPE/PPR y (C) SPE/CS/GA/PPR en ausencia (cuervas a) y presencia (cuervas b) de peróxido de hidrógeno 5 mM (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s)





En la figura 20 se muestra los VC's en solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) con KCl 0.1 M de los electrodos (A) sin modificar, SPE, (B) modificado SPE/PPR y (C) modificado SPE/CS/GA/PPR, en ausencia (curvas a) y presencia (curvas b) de 5mM de peróxido de hidrógeno.

En la figura 20 A se muestra la respuesta de corriente que se generó por el electrodo SPE en ausencia (curva a) y presencia (curva b) de peróxido de hidrógeno. Obsérvese que ambas curvas presentan un pico de corriente a un potencial cercano de -500 mV, sin embargo esta señal no corresponde a la detección de peróxido de hidrógeno si no a una respuesta propia e inherente del electrodo de carbono utilizado, un resultado similar se reportó en Chan y col.⁴⁴ Esto se confirmó más adelante por el método de cronoamperometría, donde al aplicar el potencial anterior no se vio favorecida la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno. Con base a estos resultados, se confirmó que el electrodo SPE no es sensible frente a la presencia del peróxido de hidrógeno. (Anexo 5)

⁴⁴ CHAN, K., LIM, H., SHAMS, N., JAYABAL, S., PANDIKUMAR, A., & HUANG, N. Fabrication of graphene/gold- modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen. *Materials Science and Engineering C*, 666- 674. 2016

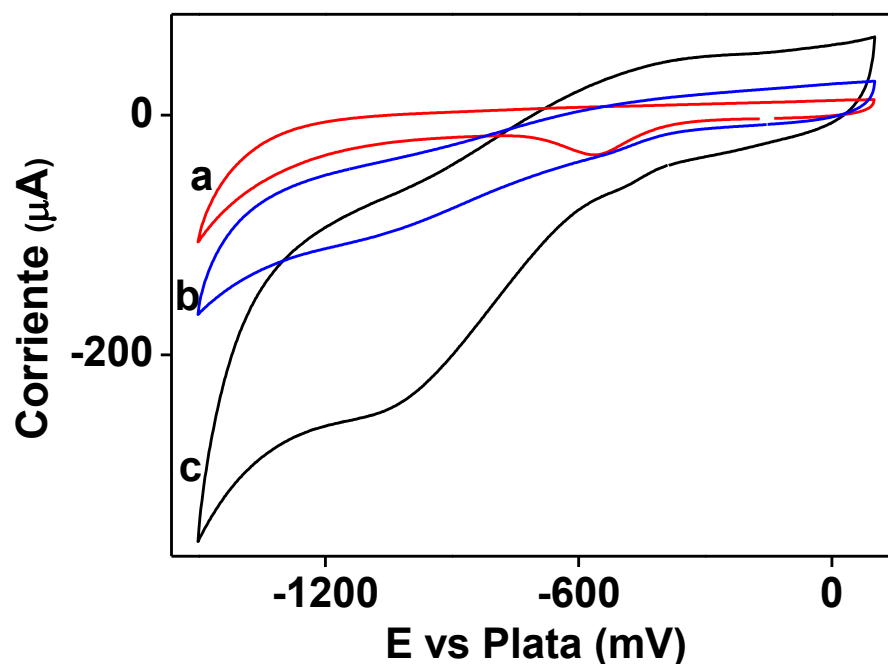
En la figura 20 B se encuentra la respuesta de corriente del electrodo control modificado con la enzima PPR mediante adsorción, electrodo SPE/PPR. La curva a muestra un perfil similar a la curva a de la figura 20 A o electrodo SPE, sin embargo es notorio el ensanchamiento del voltamograma para el electrodo SPE/PPR, lo que indicó que la corriente capacitiva aumentó una vez se modificó la superficie del electrodo, un resultado similar se observó en Chan y col.⁴⁵ La curva b mostró un aumento en la corriente catódica, con un máximo de pico a un potencial de -1000 mV (vs Ag). Esta variación de corriente se asoció a la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima PPR. Así mismo, se confirma la adsorción de la enzima sobre la superficie del electrodo en vista a la capacidad adquirida para detectar peróxido de hidrógeno una vez modificado en comparación con el electrodo SPE (Figura 20 A, curva b).

La figura 20 C, muestra las respuestas de corriente para el electrodo SPE/CS/GA/PPR. La curva a fue semejante con la curva a de la figura 20 B, sin embargo el ensanchamiento del voltamograma fue aún mayor. La presencia de peróxido de hidrógeno generó un aumento en la corriente catódica (curva b), observándose nuevamente un máximo de pico a -1000 mV (vs Ag) correspondiente a la reducción bioelectrocatalítica del mismo.

Por otro lado, la gráfica 20 C presentó una mejora en la forma del pico, haciéndolo más apreciable y pronunciado. Este resultado reveló la importancia de la modificación de la superficie del electrodo mediante la introducción de la enzima PPR en la matriz compuesta de CS y GA. Las capas modificadoras mejoraron la comunicación electroquímica directa entre el electrodo y le centro activo de la enzima PPR permitiéndole entregar una mejor señal de respuesta a la detección de H₂O₂.

⁴⁵ CHAN, K., LIM, H., SHAMS, N., JAYABAL, S., PANDIKUMAR, A., & HUANG, N. Fabrication of graphene/gold- modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen. *Materials Science and Engineering C*, 666- 674. 2016

Figura 21. Comparación de los VCs para los electrodos a) SPE, b) modificado con enzima SPE/PPR y c) SPE/CS/GA/PPR en presencia de 5 mM de H₂O₂ (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s)

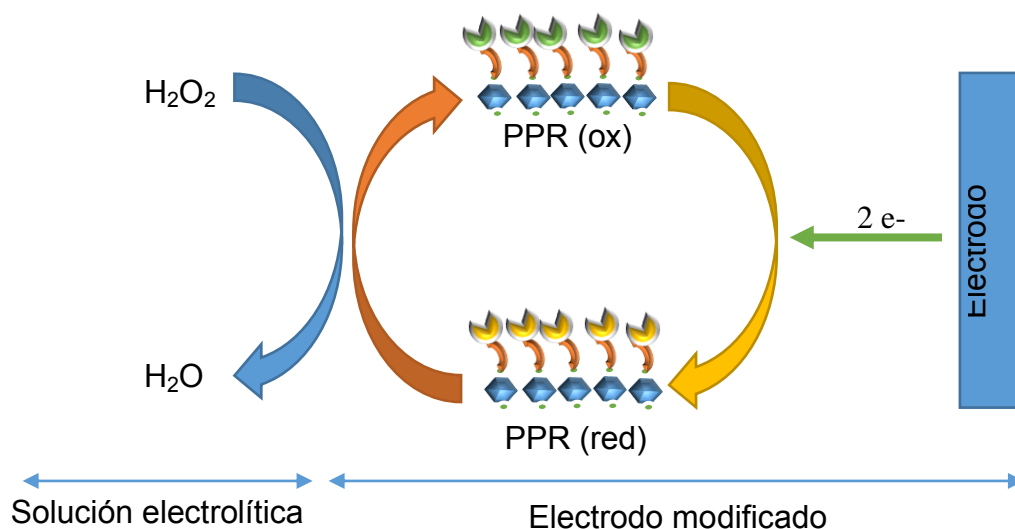


La figura 21 muestra la comparación de los VCs para los electrodos a) SPE, b) SPE/PPR y c) SPE/CS/GA/PPR tomados en solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl en presencia de 5 mM de H₂O₂. De acuerdo con la figura, se demostró que en presencia de H₂O₂, la corriente catódica incrementa rápidamente para las gráficas b) y c), lo que indicó que la reducción de H₂O₂ se dio en la superficie del electrodo. El proceso de reacción se muestra en la figura 22. La PPR inmovilizada sobre los electrodos modificados reaccionó con el H₂O₂ para formar un primer intermediario (Compuesto I) que es una forma oxidada de dos-equivalentes que contiene un grupo hemo oxiferril (Fe⁴⁺=O) y un catión radical porfirínico π. El compuesto I muestra actividad catalítica, y es el radical porfirínico quien sustrae un electrón desde el electrodo para formar un segundo intermediario (Compuesto II), que luego se reduce de nuevo a la PPR nativa mediante la aceptación de un electrón

desde el electrodo⁴⁶ (Ver ecuación 2, 3 y 4). Por lo tanto, en presencia de H₂O₂, el cambio de la corriente catódica en los electrodos modificados tiene una relación directa con la concentración del mismo.

A pesar de que los electrodos modificados (curva b y c) dan respuesta al peróxido de hidrógeno, es muy notorio la superioridad de la señal de corriente del electrodo SPE/CS/GA/PPR. Se da por entendido que a pesar del número de sustancias modificadoras contenidas en el electrodo SPE/CS/GA/PPR, la transferencia de carga entre la enzima y el electrodo no se vio afectada por el número de capas modificadoras, ver figura 22.

Figura 22. Posible mecanismo para la reducción bioelectrocatalítica del H₂O₂ por la PPR para el electrodo SPE/CS/GA/PPR.

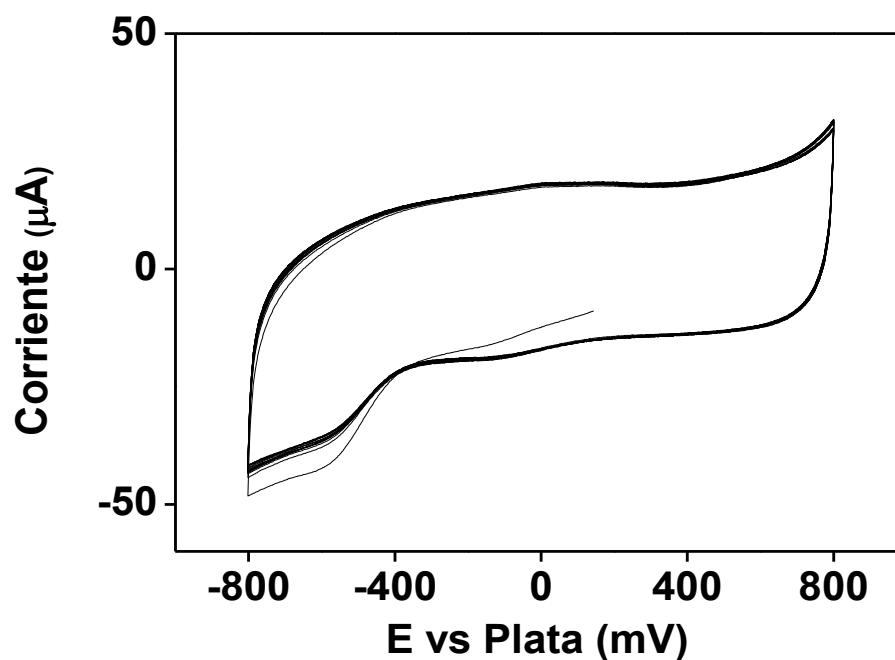


Este hecho también indica que la estrategia de coinmovilización de la enzima PPR con CS y GA no comprometió el sitio activo catalítico de la enzima, permitiendo la preservación de la conformación de la proteína y su actividad biológica.

⁴⁶ BIN KANG, X., CHANG PANG, G., YI LIANG, X., WANG, M., LIU, J., & MING ZHU, W. Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase /GNPs-thionine/chitosan. *Electrochimica Acta*, 327-334. 2012

Por otro lado, la matrix compuesta por CS y GA tuvo un efecto significativo en la respuesta de corriente, mejorando la forma del pico haciéndole más apreciable. Así, el CS cumplió la importante función de anclar la enzima a la superficie del electrodo fijada y entrecruzada por acción del GA, sin obstaculizar la transferencia directa de electrones brindando un microambiente favorable para la enzima PPR.⁴⁷

Figura 23. Voltamograma cíclico para el electrodo SPE/CS/GA/PPR (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s) Número de ciclos 20.



La estabilidad del electrodo SPE/CS/GA/PPR se comprobó utilizando VC. En la figura 23 se enseña el VC para el electrodo SPE/CS/GA/PPR tomado en solución buffer fosfato 10 mM KCl con 0.1 M a una velocidad de barrido de 100 mV/s sometido a 20 ciclos consecutivos. Nótese que el sistema se estabiliza en el tercer

⁴⁷ PAULIUKAITE, R. G.-F. Comparative Study of Different *Cross-Linking* Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite-Epoxy Composite Electrode. *Analytical Chemistry*, 5364–5372. 2009

ciclo manteniéndose constante hasta terminar el vigésimo. Este resultado confirmó que el uso de la matriz formada con CS y GA no permite que la enzima se desorba de la superficie del electrodo, haciendo que continúe trabajando en forma reproducible incluso para el ciclo número 20.

3.3.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno. La reversibilidad electroquímica del electrodo SPE/CS/GA/PPR para la detección de peróxido de hidrógeno se estudió por VC utilizando diferentes velocidades de barrido. La figura 24 A muestra los VCs del electrodo SPE/CS/GA/PPR tomados en solución buffer fosfato 10 mM con 0.1 M KCl en presencia de 5mM de H₂O₂. El rango de potencial fue 100 hasta -1500 mV.

Obsérvese que a medida que aumenta la velocidad de barrido los picos de corriente catódica aumentaron linealmente, como se muestra en la figura 24 B, indicando un proceso controlado superficialmente tal como se reporta por Wang y col.⁴⁸ Es decir, a mayor velocidad de barrido la reducción del peróxido de hidrógeno se da en regiones cada vez más próximas al electrodo.

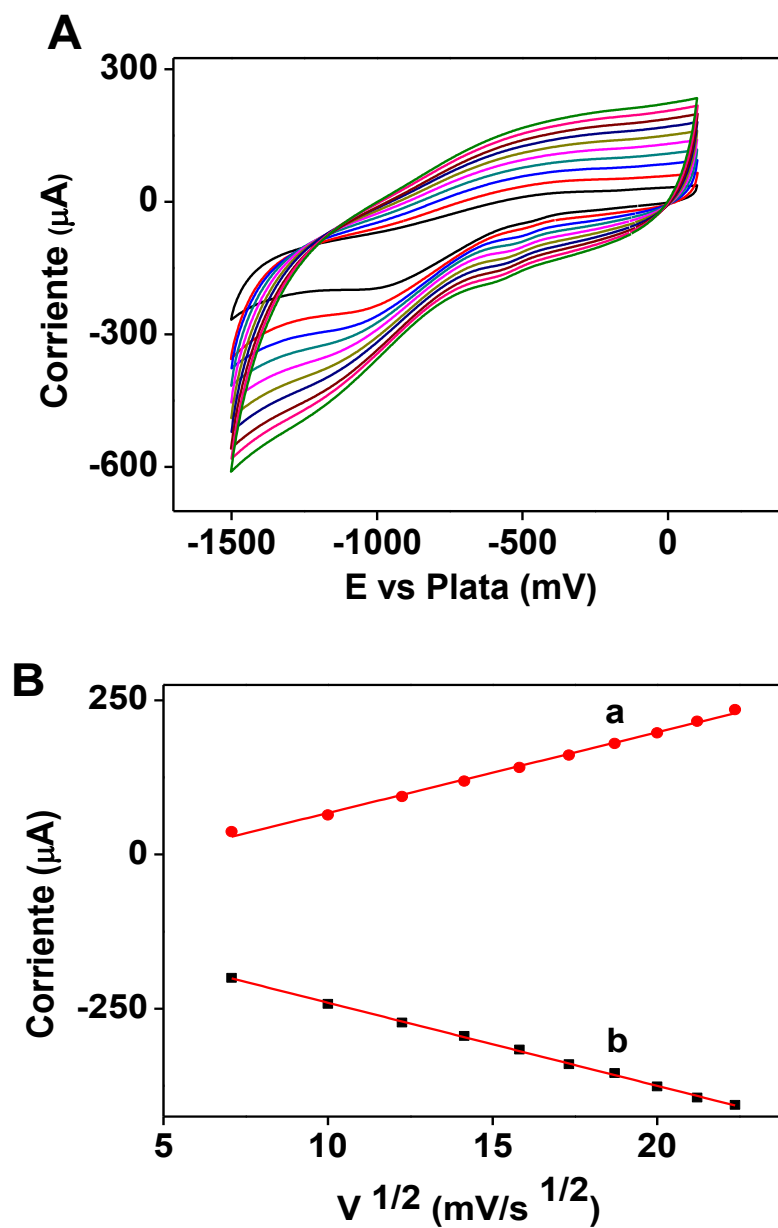
Estudios similares se pueden observar en Bin Kang y col.⁴⁹ y Ma y col.⁵⁰ donde se evalúan electrodos de diferentes naturalezas a velocidades de barrido entre 25 - 250 mV/s con la finalidad de determinar los rangos lineales de velocidad de barrido donde los procesos electroquímicos son confinados a la superficie del electrodo.

⁴⁸ WANG, Y., DU, J., LI, Y., SHAN, D., ZHOU, X., XUE, Z., & LU, X. An amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62-67. 2012

⁴⁹ BIN KANG, X., CHANG PANG, G., YI LIANG, X., WANG, M., LIU, J., & MING ZHU, W. Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase /GNPs-thionine/chitosan. *Electrochimica Acta*, 327-334. 2012

⁵⁰ MA, L., YUAN, R., CHAI, Y., & CHEN, S. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA-silver nanohybrids and PDDA-protected gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 215-220. 2009

Figura 24. (A) Voltamogramas cíclicos del electrodo SPE/CS/GA/PPR a diferentes velocidades de barrido (de interior a exterior): 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mV/s (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl, velocidad de barrido 100 mV/s) en presencia de 5 mM de H₂O₂. (B) Diagrama de los picos de corriente (a) catódica y (b) anódica versus raíz cuadrada de la velocidad de barrido.



La figura 24 B enseña la relación lineal entre las corrientes de pico de oxidación (curva a) y reducción (curva b) y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, mostrando que la linealidad se cumple desde 50 hasta 500 mV/s. Las ecuaciones de las rectas que se obtuvieron fueron:

Corrientes anódicas

$$\begin{aligned} &\text{Ecuación 8.} \\ i(\mu A) &= 13.089 (v^{1/2}) - 63.550 \\ r^2 &= 0.9959 \end{aligned}$$

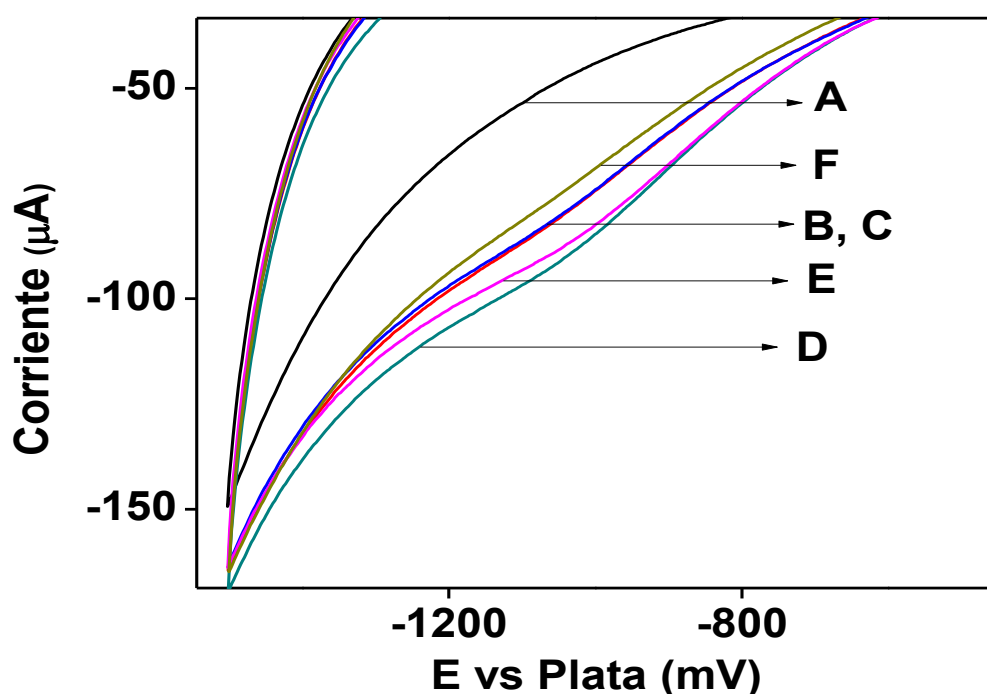
Corrientes catódicas

$$\begin{aligned} &\text{Ecuación 9.} \\ i(\mu A) &= -13.476 (v^{1/2}) - 105.650 \\ r^2 &= 0.9989 \end{aligned}$$

Donde i corresponde a la corriente en μA y v la velocidad de barrido en mV/s .

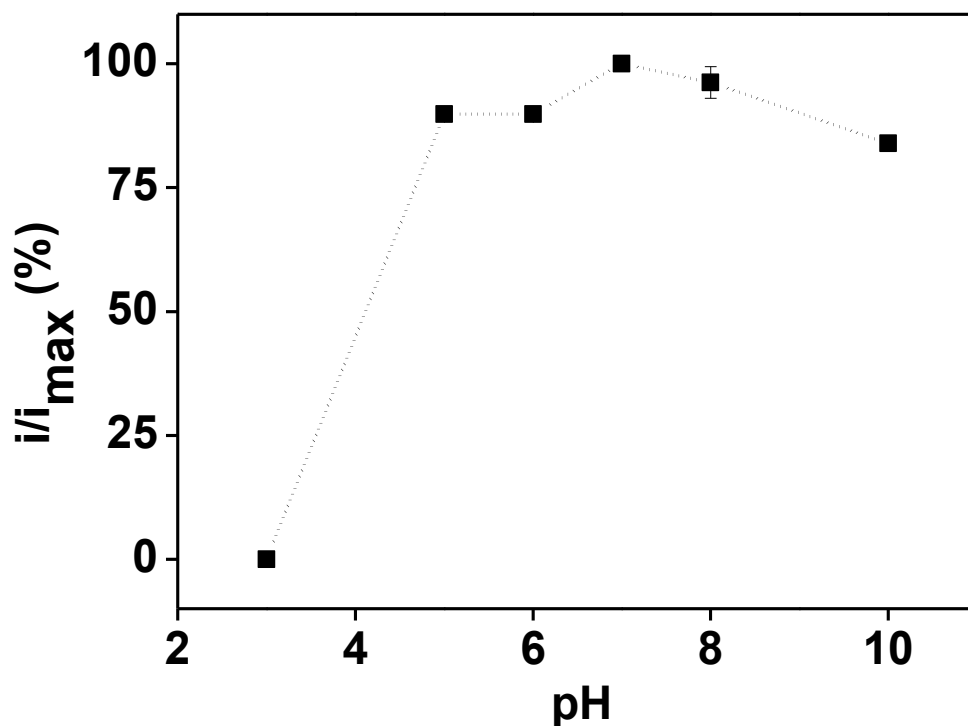
3.3.4 Influencia del pH. La influencia del pH sobre la intensidad de pico de reducción del H_2O_2 se examinó para una concentración de 1 mM utilizando el electrodo SPE/CS/GA/PPR. Las soluciones buffer utilizadas fueron: 10mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), 10mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0), 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 7.0), 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 8.0) y 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0). Las mediciones se realizaron a 100 mV/s. El rango de potencial estudiado fue 100 hasta -1500 mV.

Figura 25. VCs efecto del pH sobre la respuesta del electrodo SPE/CS/GA/PPR tomados en solución buffer A) 10mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), B) 10mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), C) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0), D) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 7.0), E) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 8.0) y F) 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0), en presencia de 1mM de H₂O₂, velocidad de barrido 100mV/s.



El pH influyó notablemente en la actividad enzimática de la PPR coinmovilizada en el electrodo, tal como se observa en la figura 25 donde se muestran los VCs para el electrodo SPE/CS/GA/PPR en soluciones buffer de diferente pH con presencia de 1mM de H₂O₂. (Ver figura 26)

Figura 26. Efecto del pH sobre la respuesta de corriente del biosensor SPE/CS/GA/PPR. (Barras de error= \pm D.E. y n=2.)



Nótese que el electrodo no tiene la capacidad de detectar H_2O_2 a pH 3.0 (Figura 25 A). A pHs tan bajo las cargas de los aminoácidos de la proteína aumentan haciendo que se pierda la estructura terciaria (desnaturalización) y por ende la actividad enzimática.

Los VCs tomados en las soluciones buffer de pH 5 y 6 (Figura 25 B y C) tuvieron una respuesta de corriente similar, siendo posible la detección de H_2O_2 a un potencial de -1000 mV (vs Ag). Por otro lado, los electrodos puestos en las soluciones buffer de pH 7 y 8 (Figura 25 D y E) mostraron picos de respuesta de corriente catódica de mayor intensidad y mejor resolución de pico al mismo potencial anteriormente descrito. A este resultado podemos asociar que los pH que brindan mejor respuesta de señal a la detección de H_2O_2 son los

comprendidos entre 7 y 8 donde las cargas son las justas y necesarias para la afinidad con el sustrato y para la actividad catalítica.

Finalmente, el VC para pH 10 (Figura 25 F), muestra una señal de corriente débil a la detección de H_2O_2 , lo que indica que a pesar de que se esté detectando el analito, la enzima está sufriendo una posible desnaturalización o inactivación a causa de pH muy básicos.

Como se ha visto, el pH influye en la conformación de las enzimas y su actividad; esta dependencia al pH a su vez puede variar según la fuente de la enzima; así, la construcción de electrodos enzimáticos requiere el estudio del efecto del pH sobre la respuesta de biosensores. En la literatura se pueden encontrar muchos ejemplos al respecto, tal como se reporta en Shu-Xia y col.⁵¹ donde se usa una matrix sol-gel de tetraetilo de silicona para la inmovilización de enzima HRP sobre nanotubos de carbono multicapa en electrodos de carbón vítreo. En este estudio, la respuesta del biosensor al pH fue estudiada entre 5.8 y 8.5. La respuesta de corriente incrementó desde pH 5.8 hasta 7.0 mostrando un máximo en pH 7.0. La respuesta de corriente decreció desde pH 7.0 hasta 8.5. Este comportamiento se asoció a la dependencia de la metamorfosis de la proteína al pH. A pH altos y bajos la actividad de la HRP decrecería debido a la desnaturalización de la enzima asociada al decrecimiento de la señal de corriente. Análisis similares se pueden encontrar en Luo y col.⁵² y Wang y col.⁵³

⁵¹ SHU-XIA XU, J.-L. L.-L.-X. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol-gel thin film on a multi-wall carbon nanotube modified electrode. *The Royal Society of Chemistry*. 2014

⁵² LUO, X., QIU, Z., WAN, Q., SHU, H., & YANG, N. Graphene nanoplatelets and horseradish peroxidase based biosensor. *Physica Status Solidi A*, 2795-2800. 2014

⁵³ WANG, Y., DU, J., LI, Y., SHAN, D., ZHOU, X., XUE, Z., & LU, X. An amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62-67. 2012

3.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS.

Experimentos cronoamperométricos para evaluar la sensibilidad y la linealidad de la respuesta del electrodo SPE/CS/GA/PPR hacia el H_2O_2 se realizaron utilizando un potencial fijo de -1000 mV (vs Ag).

Cada experimento se realizó en una celda con 7 mL de buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) con 0.1 M KCl bajo agitación suave y continua. Antes de cualquier adición de H_2O_2 se dejó estabilizar la corriente hasta alcanzar la línea base correspondiente a la concentración cero de H_2O_2 . Posteriormente, se añadió a la celda una cantidad conocida de H_2O_2 la cual generó un aumento en la intensidad de corriente, como consecuencia de la reducción del H_2O_2 producida enzimáticamente. Una vez la corriente alcanzó el estado estacionario donde la intensidad se mantuvo constante se realizó una nueva adición de H_2O_2 que dio lugar a otro incremento en la intensidad de corriente, alcanzando de nuevo el estado estacionario y así sucesivamente.

Para hacer los experimentos reproducibles las adiciones de H_2O_2 se realizaron cada 50 segundos aumentando en 500 μM la concentración del mismo.

La figura 27 A muestra una típica curva cronoamperométrica para sucesivas adiciones de H_2O_2 . Hay una relación lineal entre la respuesta de corriente y la concentración de H_2O_2 en un intervalo de rango de 500 μM a 5000 μM ($r^2 = 0.9934$)

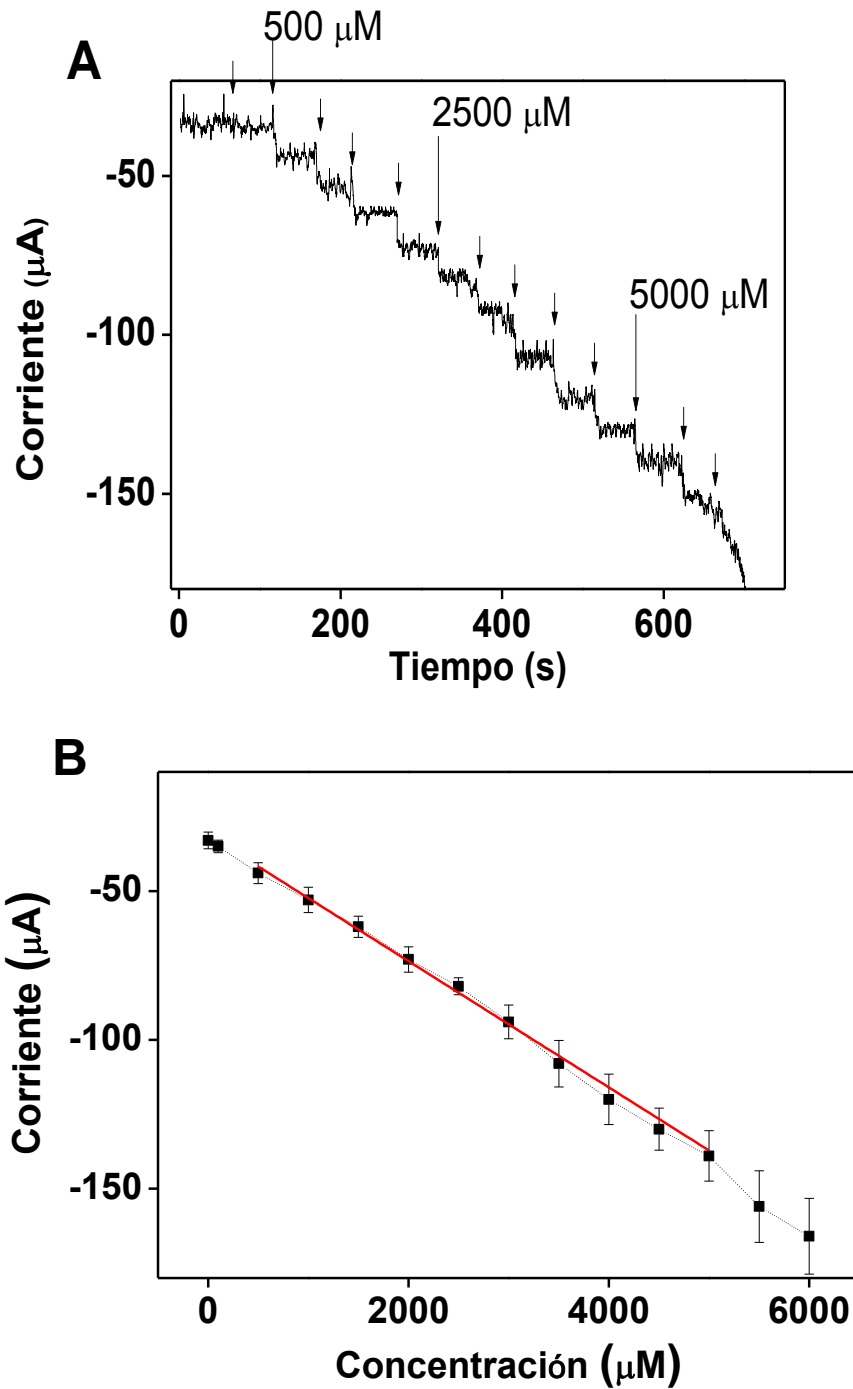
En la figura 27 B se muestra la curva de calibración para la determinación de H_2O_2 , fueron presentados puntos adicionales, obtenidos en la región no lineal. La gráfica presentó la siguiente ecuación

$$i(\mu A) = -0.021 * (H_2O_2 \mu M) - 31.170 \quad \text{Ecuación 10.}$$
$$r^2 = 0.9934$$

El cambio en la señal de respuesta por unidad de cambio en la concentración de H₂O₂, mejor conocida como la sensibilidad de calibrado, corresponde entonces a la pendiente de la recta de calibrado (Ecuación 9). Para el electrodo SPE/CS/GA/PPR la sensibilidad de calibrado correspondió a $0.021 \mu A * \frac{L}{\mu mol}$.

La menor concentración de H₂O₂ que puede ser reportada a un cierto nivel de confianza predeterminado se conoce como límite de detección (LD). Para esta técnica analítica, el LD fue de 404 μM .

Figura 27. (A) Perfil amperométrico Corriente vs Tiempo para la adición de H_2O_2 (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl). Potencial aplicado -1.0 V vs Ag. (B) Curva de calibración para la determinación de H_2O_2 . (Barras de error= \pm D.E. y n=2.)



La especificidad del electrodo SPE/CS/GA/PPR fue evaluada en la presencia de: glucosa, ácido ascórbico, ácido cítrico y etanol. En la figura 28 se muestra la influencia de estos compuestos en la respuesta de corriente del electrodo modificado, indicando que el electrodo tiene una excelente especificidad hacia el H_2O_2 .

Como se puede observar, la adición inicial de $500 \mu M$ de H_2O_2 (flecha a) mostró un aumento de la corriente, el cual correspondió a la reducción de H_2O_2 por la enzima PPR coinmovilizada en el electrodo. En contraste, las adiciones de glucosa, ácido ascórbico, ácido cítrico y etanol (flechas b-e) no causaron ningún aumento de la corriente. Sin embargo, cuando se volvió a adicionar H_2O_2 , la señal de corriente aumentó nuevamente (flechas f y g) tal como se esperaba.

Una última adición de glucosa se realizó (flecha h), esta vez se alcanzó una concentración de $900 \mu M$, sin embargo, tal como se puede apreciar el rendimiento de la señal de corriente no se vio afectada por la adición de esta sustancia.

Figura 28. Perfil amperométrico Corriente vs Tiempo del electrodo SPE/CS/GA/PPR para a) 500 μM de H_2O_2 , b) 500 μM de glucosa, c) 500 μM de ácido ascórbico, d) 500 μM de ácido cítrico, e) 500 μM de etanol, f) 1000 μM de H_2O_2 , g) 1500 μM de H_2O_2 y h) 900 μM de glucosa (solución fosfato (pH 7.0) con 0.1 M KCl). Potencial aplicado -1.0 V vs Ag.

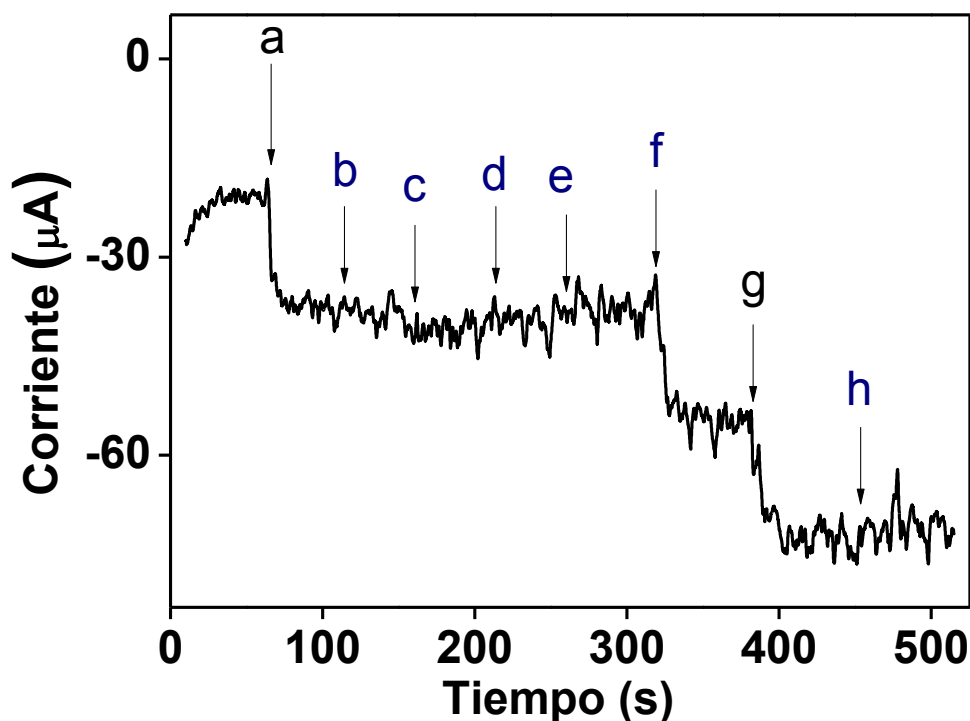


Tabla 4. Diferentes tipos de biosensores de peróxido de hidrógeno.

Enzima/ electrodo	Forma de inmovilización	Detección	Características analíticas	Referencia
PPR/SPE Grafeno	Coinmovilización de PPR usando quitosano y glutaraldehído en electrodos serigrafados de grafeno	Amperométrica (E= -1 V vs Ag)	Rango lineal: 5x10 ⁻⁴ M – 5x10 ⁻³ M LD:4.04x10 ⁻⁴ M	Este trabajo
HRP/AuE	Asociación de coloides de Au con monocapas de cisteamina sobre la superficie de electrodos de oro. HRP	Amperométrica (E= -0.3 V)	Rango lineal: 1.4x10 ⁻⁶ M– 2.8x10 ⁻³ M LD: 5.8x10 ⁻⁷ M	(Yi, Huang- Xian, & Hong-Yuan, 2000)

Enzima/ electrodo	Forma de inmovilización	Detección	Características analíticas	Referencia
	inmovilizada sobre coloides de oro.			
HRP/CPE	Inmovilización de HRP usando una matrix sol-gel hibrida con quitosano en electrodos de pasta de carbono.	Amperométrica (E= -0.1 V vs. SCE.)	Rango lineal: 2.5x10 ⁻⁴ M- 3.4x10 ⁻³ M LD: 3x10 ⁻⁶ M	(Miao & Tan, 2001)
HRP/GCE	Incorporación covalente de CNTs y nAu sobre recubrimiento poli(tionina) depositados por electropolimerización sobre GCE	Amperométrica (E= -0.4 V vs. SCE)	Rango lineal: 5.0x10 ⁻⁶ M – 7.0x10 ⁻³ M LD: 3.0x10 ⁻⁶ M	(Feng, y otros, 2007)
HRP/GCE	Electropolimerización p-ABSA sobre GCE mediante VC. Adsorción de tionina y ensamble de capas de oro para la inmovilización de HRP	Amperométrica (E= -0.45 V)	Rango lineal: 2.6x10 ⁻⁶ M – 8.8x10 ⁻³ M LD: 6.4x10 ⁻⁷ M	(Gao, y otros, 2007)
HRP/AuE	Adsorción de HRP en CNT funcionalizados sobre electrodos de oro usando L-cisteína.	Amperométrica (E= -0.35 V)	Rango lineal: 1.0x10 ⁻¹² M – 1.0 x10 ⁻¹¹ M LD: 2.1x10 ⁻¹³ M	(Wang, y otros, 2012)
HRP/ITOE	Uso de nanopartículas de oro dispersas en un film de quitosano y dentrímeros para la inmovilización de HRP en electrodos ITO	Amperométrica (E= -0.28 V vs NCE)	Rango lineal: 1.65x10 ⁻⁴ M – 1.5625 x10 ⁻³ M LD: 2.0x10 ⁻⁴ M	(Farzana, Ganesh, & Berchmans, 2013)

Abreviaturas: AuE: electrodo de oro; CNT: nanotubos de carbono; SBP: peroxidasa de soya; VC: voltamperometría cíclica; GCE: electrodo de carbón vítreo; HRP: peroxidasa de rábano picante; LD: límite de detección; p-ABSA: ácido sulfónico p-aminobenceno; SCE: electrodo saturado calomel; PEGDGE: polietileno glicol diglicidil éter; CPE: electrodo de pasta de carbono; ITOE: electrodo de óxido de indio estaño

El aporte del biosensor propuesto en este trabajo de grado se comparó con una muestra representativa de los biosensores de peróxidos de hidrógeno publicados a lo largo de estos últimos años.

En la tabla 4 se muestran las características de estos biosensores amperométricos, mencionando el nombre de la enzima empleada, tipo de electrodo, sistema de inmovilización utilizado, potencial de reducción, así como las propiedades analíticas: rango lineal y límite de detección.

Como se indicó anteriormente, el biosensor propuesto fue sensible al peróxido de hidrógeno en un rango lineal de 5×10^{-4} M a 5×10^{-3} M, mostrando una sensibilidad de calibrado de 4.04×10^{-4} M. Sin embargo, tal como se muestra en la tabla 4, existen biosensores con un rango lineal de mayor capacidad, incluso en varias órdenes de magnitud, como el reportado por Wang y col.⁵⁴ y capaces de detectar concentraciones de peróxido de hidrógeno en el orden de picomolar. No obstante, el biosensor presentado en este trabajo es útil para detectar peróxido de hidrógeno a concentraciones superiores a las reportadas por Miao y col.⁵⁵ y Farzana y col.⁵⁶ cubriendo en gran medida el intervalo superior del rango lineal en ambos casos, 4×10^{-3} M y 1.5625×10^{-3} M, respectivamente.

Nótese que el electrodo propuesto presentó el potencial de reducción de peróxido de hidrógeno más negativo entre los biosensores de comparación. Lo que a simple vista supone una gran ventaja a la hora de utilizar el electrodo en la monitorización amperométrica de peróxido de hidrógeno en muestras reales.

⁵⁴ WANG, Y., DU, J., LI, Y., SHAN, D., ZHOU, X., XUE, Z., & LU, X. An amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62-67. 2012

⁵⁵ MIAO, Y., & TAN, S. Amperometric hydrogen peroxidase biosensor with silica sol-gel/chitosan film as immobilization matrix. *Analytica Chimica Acta*, 87-93. 2001

⁵⁶ FARZANA, S., GANESH, V., & BERCHMANS, S. A sensign platform for direct electron transfer study of horseradish peroxidase. *Journal of the Electrochemical Society*, 573-580. 2013

Los potenciales de reducción bajos (más negativos) son ideales para evitar una gran cantidad de interferencias cuando se analizan muestras reales. Tal como se reporta en Peña y col.⁵⁷ donde se escogió el valor de potencial más bajo posible al cual ocurría la reducción del peróxido de hidrógeno de los electrodos bienzimáticos propuestos, con el objeto de obtener una respuesta sensible y capaz de minimizar las posibles interferencias.

Por otro lado, como se puede observar en la tabla 4 y demás reportes de la literatura, la mayoría de trabajos de electrodos enzimáticos usan la enzima HRP como elemento de reconocimiento biológico para la detección de peróxido de hidrógeno. Cabe destacar que este trabajo hace un aporte novedoso mediante el empleo de la enzima PPR, extraída de hojas de palma real, planta presente en nuestra región y que actualmente no tiene un valor agregado ni utilidad más que la ornamental. Esta enzima ha reportado pocas aplicaciones y como tal, nunca había sido utilizada anteriormente en el desarrollo de electrodos enzimáticos, aplicación en la que ha mostrado resultados interesantes.

A nivel nacional el desarrollo de electrodos enzimáticos es nulo. Hasta el momento no existen estudios relacionados con el diseño de biosensores basados en peroxidasas provenientes de fuentes colombianas para la detección de peróxido de hidrógeno. Dicho de otra manera, el presente trabajo de grado concreta la importancia de estudiar la biodiversidad presente en nuestro país, a fin de descubrir nuevas fuentes de enzimas que podrían ser potenciales herramientas de bioconocimiento para la fabricación de nuevos electrodos enzimáticos utilizando nuestras propias enzimas.

⁵⁷ PEÑA GARCIA, N., & PINGARRÓN CARRAZÓN, J. M. Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos. *Universidad Complutense de Madrid*, 1-379. 2003

4. CONCLUSIONES

Fue posible desarrollar un biosensor amperométrico mediante coinmovilización con quitosano y peroxidasa de palma real usando glutaraldehído como herramienta entrecruzante sobre electrodos serigrafiados de grafeno para la detección de peróxido de hidrógeno.

El método de extracción y semi-purificación de la peroxidasa de palma real empleado tuvo un factor de purificación de 6.5 y un rendimiento del 55%. En cada etapa del proceso se cumplió el objetivo, hecho que se afirma por el aumento de la actividad específica.

La modificación de la superficie del electrodo de grafeno se realizó mediante coinmovilización de la peroxidasa de palma real usando una matrix de quitosano y glutaraldehído. La caracterización de la superficie del electrodo se llevó a cabo mediante voltamperometría cíclica empleando ferrocianuro de potasio como electrolito, confirmando que la matrix compuesta por quitosano y glutaraldehído aportan significativamente al mejoramiento de las propiedades electroquímicas del electrodo.

El electrodo SPE/CS/GA/PPR fue sensible a la detección de peróxido de hidrógeno, con transferencia directa de electrones desde el sitio catalítico de la enzima al electrodo. La reducción del peróxido de hidrógeno se observó como un aumento de la corriente catódica hacia -1 V (vs Ag).

Los estudios por voltamperometría cíclica para el electrodo SPE/CS/GA/PPR arrojaron una respuesta estable a partir del 3 ciclo de barrido. El efecto de la

variación de la velocidad de barrido demostró que la reducción de peróxido de hidrógeno es un proceso reversible controlado superficialmente.

El pH al cual el electrodo SPE/CS/GA/PPR presentó la mejor respuesta de corriente a la detección de peróxido de hidrógeno fue 7. A pH 3 la respuesta fue nula y la mínima respuesta fue a pH 10.

El método analítico presentó una relación lineal entre la respuesta de corriente del electrodo SPE/CS/GA/PPR y la concentración de peróxido de hidrógeno en un intervalo de rango de 500 μM a 5000 μM ($r^2 = 0.9934$) con una sensibilidad de calibrado de $0.0203 \mu\text{A} * \frac{\text{L}}{\mu\text{mol}}$ y un límite de detección de 404 μM .

El electrodo mostró una excelente especificidad hacia el peróxido de hidrógeno frente la presencia de sustancias interferentes como glucosa, ácido ascórbico, ácido cítrico y etanol.

5. RECOMENDACIONES

Estudiar el efecto de la temperatura, la carga enzimática y el potencial aplicado para el electrodo SPE/CS/GA/PPR a la respuesta de peróxido de hidrógeno.

Realizar un estudio de la efectividad del electrodo SPE/CS/GA/PPR en la detección de peróxido de hidrógeno en muestras reales.

BIBLIOGRAFÍA

ALMAGRO HUERTAS, V. Cinética Electroquímica. Universidad de Murcia, 317-340. 1965

AMEUR, Z. O., & HUSEIN, M. M. Electrochemical behavior of potassium ferricyanide in aqueous and (w/o) microemulsion systems in the presence of dispersed nickel nanoparticles. Separation Science and Technology 48, 681-689. 2013

BARBOSA JAIMES, L. O. Elaboración de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química, 95P. 2006

BIN KANG, X., CHANG PANG, G., YI LIANG, X., WANG, M., LIU, J., & MING ZHU, W. (). Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase /GNPs-thionine/chitosan. Electrochimica Acta, 327-334. 2012

BORGMANN, S., SCHULTE, A., NEUGEBAUER, S., & SCHUHMANN, W. Amperometric Biosensors. Advances in Electrochemical Science and Engineering. 2011

BRADFORD., M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976

CASTILLO, J. J. Separación y caracterización de las isoenzimas de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química, 87P. 2001

CHAN, K., LIM, H., SHAMS, N., JAYABAL, S., PANDIKUMAR, A., & HUANG, N. Fabrication of graphene/gold- modified screen-printed electrode for detection of carcinoembryonic antigen. *Materials Science and Engineering C*, 666- 674. 2016

D. PLATIS, N. L. Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. *Biotechnology Journal* 4, 1320-1327. 2009

DANIEL R. THÉVENOT, K. T. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*. ELSEVIER. 2001

DANIELLE W. KIMMEL, G. L. *Electrochemical Sensors and Biosensors*. American Chemical Society. 2011

FARZANA, S., GANESH, V., & BERCHMANS, S. A sensign platform for direct electron transfer study of horseradish peroxidase. *Journal of the Electrochemical Society*, 573-580. 2013

FENG, H., WANG, H., ZHANG, Y., YAN, B., SHEN, G., & YU, R. A Direct Electrochemical Biosensing Platform Constructed by Incorporating Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles onto Redox Poly(thionine) Film. *Analytical Sciences*, 235-239. 2007

G. JONSSON, L. G. An Electrochemical Sensor for Hydrogen Peroxida Based on Peroxidase Adsorbed on a Spectrographic Graphite Electrode. *Electroanalysis*, 465-468. 1989

GAO, F., YUAN, R., CHAI, Y., CHEN, S., CAO, S., & TANG, M. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on nano-Au/Thi/poly (p-aminobenzene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 407-413. 2007

GARY L. LONG, J. D. Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry* . 1983

GONZÁLES GARCÍA, I. A. Medidor de oltametría cíclica para dispositivos de transmitancia controlable. Universidad Carlos III de Madrid Escuela Politécnica Superior, 1-156. 2010

HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. En D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry* (pág. 816). McGraw Hill Companies. 1999

I.YU. SAKHAROV, M. V. Peroxidasa from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Science* 161, 853-860. 2001

INNA S. ALPEEVA, M. N.-N. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 742-748. 2005

J. A. GOODE, J. V. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. American Chemical Society. 2014

JOHN H.T. LUONG, K. B. Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*. ELSERVIER. 2008

KISSINGER, P. T., & BOTT, A. W. Electrochemistry for the Non-Electrochemist. *Current Separations*. 2002

KUILA, T., BOSE, S., KHANRA, P., MISHRA, A. K., KIM, N. H., & LEE, J. H. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 4637-4648. 2011

LÁREZ VELÁSQUEZ, C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 91-109. 2003

LEANDRA WATANABE, P. R. Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea Regia*). *Journal of Structural Biology*, 226-242. 2010

LELAND C. CLARK, J. A. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals New York Academy of Sciences*. 1962

LUO, X. L., XU, J. J., ZHANG, Q., YANG, G. J., & CHEN., H. Y. Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through nanoparticles self-assembly. *Biosensors & Bioelectronics*, 190-196. 2005

LUO, X., QIU, Z., WAN, Q., SHU, H., & YANG, N. Graphene nanoplatelets and horseradish peroxidase based biosensor. *Physica Status Solidi A*, 2795-2800. 2014

MA, L., YUAN, R., CHAI, Y., & CHEN, S. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA-silver nanohybrids and PDDA-protected gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 215-220. 2009

MEHMET SENEL, E. C. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 444-450. 2010

MENÉNDEZ, G. Á. Optimización de un inmunosensor electroquímico para la detección de cáncer de próstata. Universidad de Oviedo, 54 P. 2012

MIAO, Y., & TAN, S. Amperometric hydrogen peroxidase biosensor with silica sol-gel/chitosan film as immobilization matrix. *Analytica Chimica Acta* , 87-93. 2001

PALANISAMY, S., UNNIKRISHNAN, B., & CHEN, S.-M. An amperometric biosensor based on direct immobilization of horseradish peroxidase on electrochemically reduced graphene oxide modified screen printed carbon electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 7935-7947. 2012

PAULIUKAITE, R. G.-F. Comparative Study of Different Cross-Linking Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite-Epoxy Composite Electrode. *Analytical Chemistry*, 5364–5372. 2009

PEÑA GARCIA, N., & PINGARRÓN CARRAZÓN, J. M. Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos. Universidad Complutense de Madrid, 1-379. 2003

PERREAULT, F., FARIA, A. F., & ELIMELECH, M. (). Environmental applications of graphene-based nanomaterials. The Royal Society of Chemistry. 2015

QINGXIANG WANG, B. Z. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 599-605. 2011

REYNALDO VILLALONGA, P. D. Supramolecular Immobilization of Xanthine Oxidase on Electropolymerized Matrix of Functionalized Hybrid Bold Nanoparticles/Single-Walled Carbon Nanotubes for the Preparation of Electrochemical Biosensors. American Chemical Society. 2012

RUEDA ARANGO, N. Preparación de agregados entrecruzados de peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) usando albúmina de suero bovino como fuente proteica. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias , 82. 2007

RUIZ, J. G. Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. 2006

SAKHROV, I., VESGA, M., GALEWV, I., & SAKHAROVA, A. O. Peroxidase from royal palm tree *Roystonea Regia*: Purification and properties. Plant Science. 2001

SHU-XIA XU, J.-L. L.-L.-X. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol-gel thin film on a multi-wall carbon nanotube modified electrode. The Royal Society of Chemistry. 2014

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., & CROUC, S. R. Fundamentos de Química Analítica. México: Cengage Learning. 2014

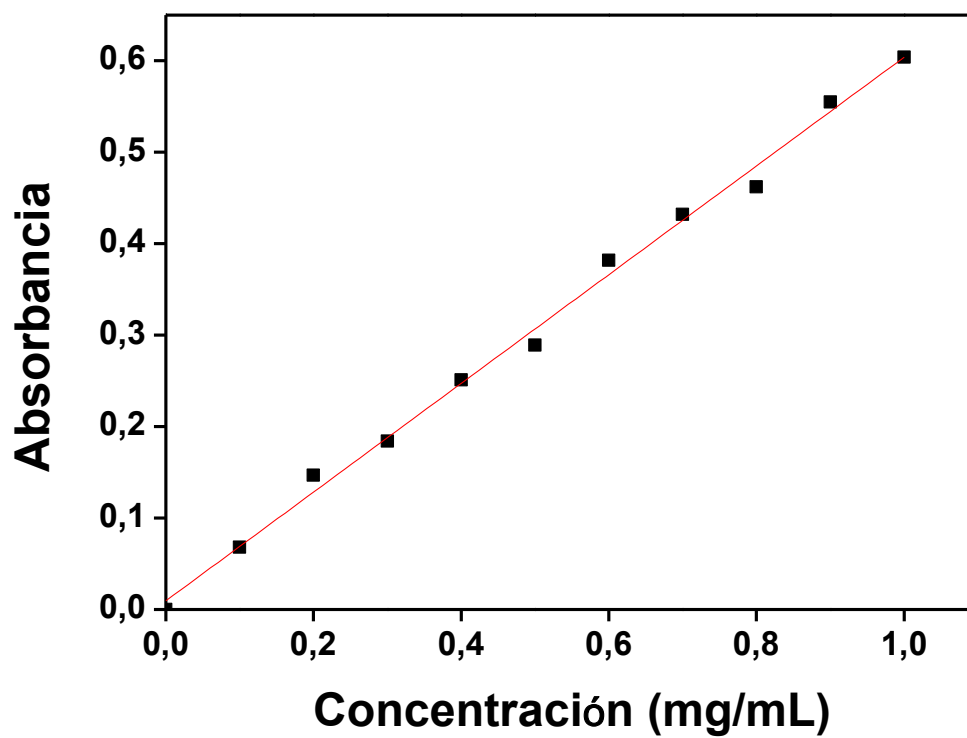
TELTING-DIAZ, E. B. Electrochemical Sensors. American Chemical Society. 2002

WANG, Y., DU, J., LI, Y., SHAN, D., ZHOU, X., XUE, Z., & LU, X. An amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 62-67. 2012

YI, X., HUANG-XIAN, J., & HONG-YUAN, C. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on a Colloidal cysteamine-Modified Gold Electrode. *Analytical Biochemistry* , 22-28. 2000

ANEXOS

ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE BRADFORD



$$Absorbancia = 0.595 \left(Concentración \frac{mg}{mL} \right) + 0.009$$

$$R^2 = 0.9951$$

ANEXO B. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PPR SOLUBLE

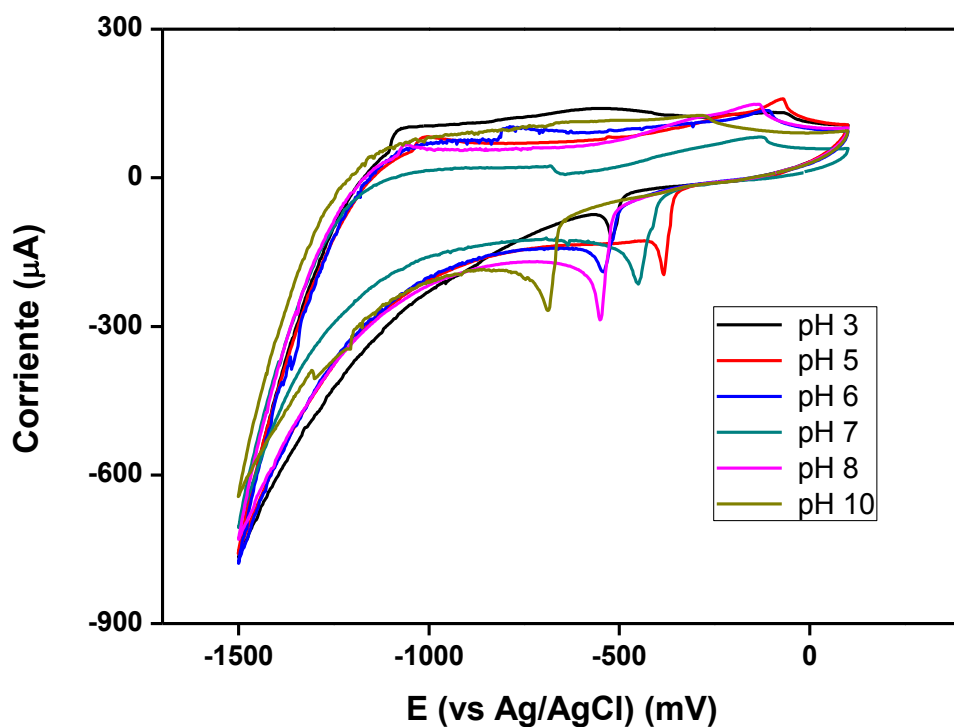
La actividad específica de la peroxidasa soluble se determinó de la siguiente manera

$$\text{actividad específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = m * \frac{10^6}{\epsilon_{\text{producto}}} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{d}{C_{\text{proteína}}}$$

Donde:

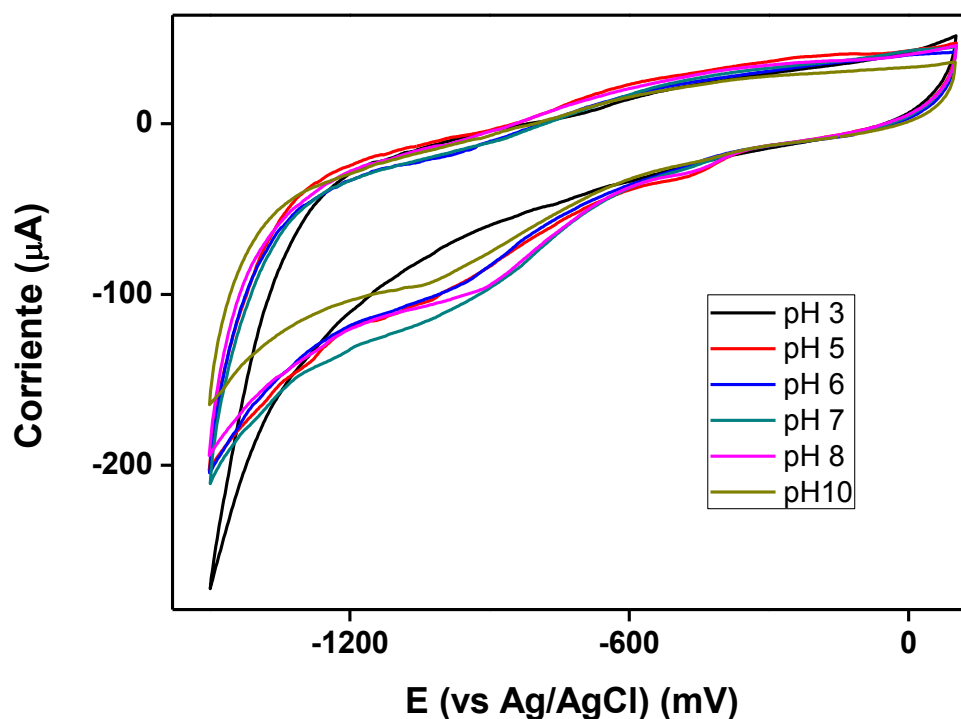
m	Pendiente (mol/L*min)
ϵ	Coeficiente de extinción molar de guayacol, 5200 M ⁻¹ cm ⁻¹
V_t	Volumen total de reacción (mL)
V_m	Volumen de extracto enzimático (mL)
d	factor de dilución de la solución enzimática
$C_{\text{proteína}}$	Concentración de proteína en la solución enzimática
U	Se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de guayacol por minuto bajo condiciones de pH 6.0 y temperatura de 25 °C

**ANEXO C. VOLTAMOGRAMAS DEL ELECTRODO SPE EN SOLUCIONES
BUFFER DE DIFERENTES pH.**



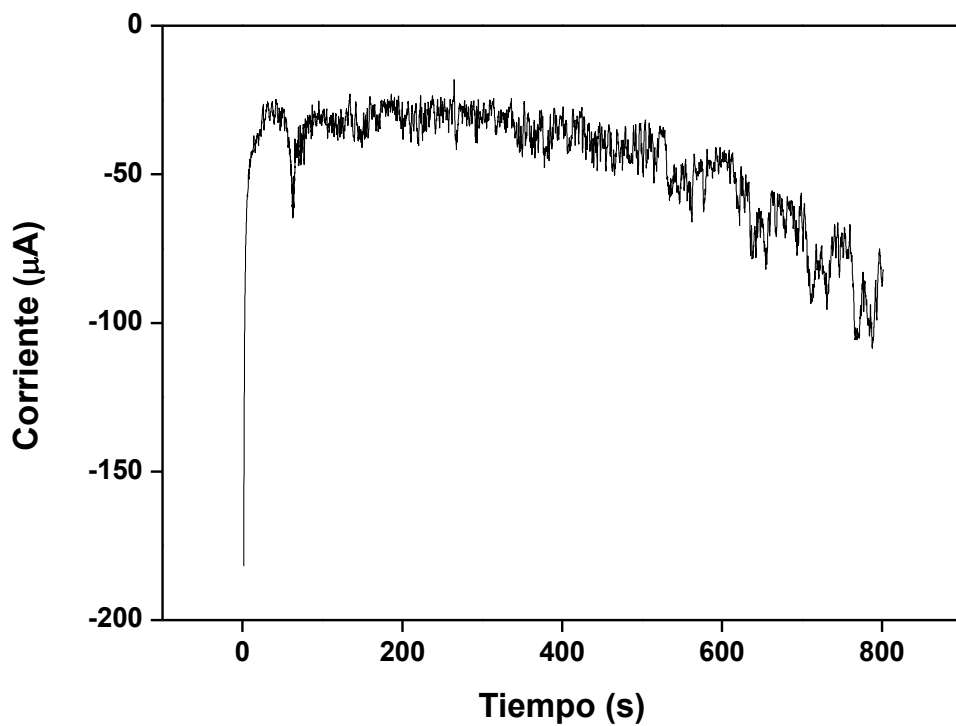
VCs efecto del pH sobre la respuesta del electrodo SPE tomados en solución buffer A) 10mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), B) 10mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), C) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0), D) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 7.0), E) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 8.0) y F) 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0), en presencia de 1mM de H_2O_2 , velocidad de barrido 100mV/s.

**ANEXO D. DUPLICADO VOLTAMOGRAMAS DEL ELECTRODO
SPE/CS/GA/PPR EN SOLUCIONES BUFFER DE DIFERENTES pH.**



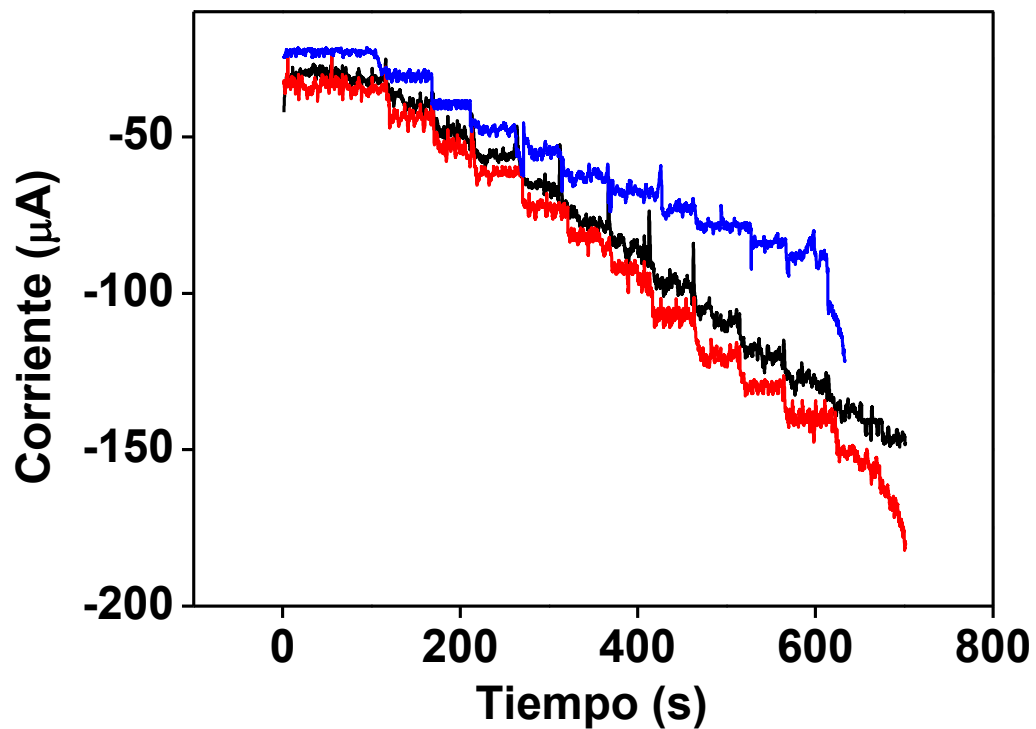
Duplicado VCs efecto del pH sobre la respuesta del electrodo SPE/CS/GA/PPR tomados en solución buffer A) 10mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), B) 10mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), C) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0), D) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 7.0), E) 10mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 8.0) y F) 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0), en presencia de 1mM de H₂O₂, velocidad de barrido 100mV/s.

ANEXO E. CRONOAMPEROMETRÍA DEL ELECTRODO SIN MODIFICAR, SPE



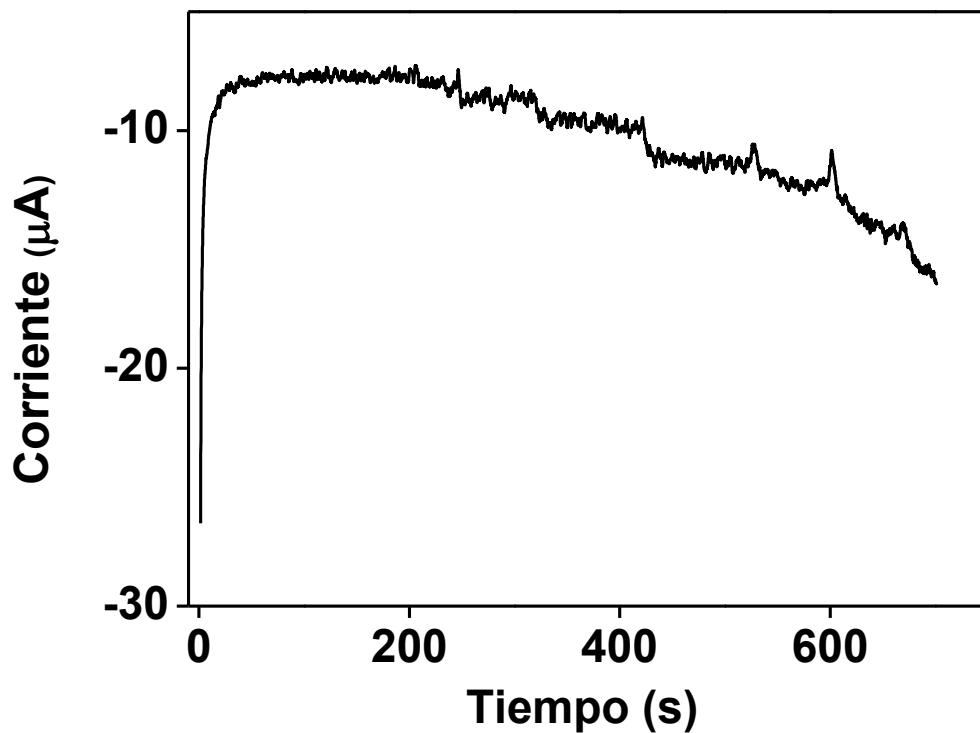
Perfil amperométrico Corriente vs Tiempo para la adición de H_2O_2 tomado en solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) KCl 0.1 M para el electrodo SPE. Potencial aplicado -0.5 V vs Ag.

ANEXO F. CRONOAMPEROMETRÍA PARA EL ELECTRODO SPE/CS/GA/PPR



Perfil amperométrico Corriente vs Tiempo para la adición de H₂O₂ tomado en solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) KCl 0.1 M para el electrodo SPE/CS/GA/PPR. Potencial aplicado -1.0 V vs Ag. n=3

ANEXO G. CRONOAMPEROMETRÍA PARA EL ELECTRODO SPE/CS/GA/PPR



Perfil amperométrico Corriente vs Tiempo para la adición de H_2O_2 tomado en solución buffer fosfato 10 mM (pH 7.0) KCl 0.1 M para el electrodo SPE/CS/GA/PPR. Potencial aplicado -0.5 V vs Ag.