

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR BASADO EN ELECTRODOS DE
NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PASTO
GUINEA (*Panicum maximum*) PARA LA DETERMINACIÓN DE TRICLOSAN**

ANGIE ESTEFANY ORDUZ NAVAS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2017**

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR BASADO EN ELECTRODOS DE
NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PASTO
GUINEA (*Panicum maximum*) PARA LA DETERMINACIÓN DE TRICLOSAN**

ANGIE ESTEFANY ORDUZ NAVAS

**trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de
químico**

Director

John Jairo Castillo León, Doctor en Química

Codirectores

Jorge Andrés Gutiérrez Cifuentes, Doctor en Ciencias Químicas

Sergio Ismael Blanco, Doctor en Ingeniería

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que nunca soltó mi mano y lleno mi vida de bendiciones y esperanza. A mi abuela Carmen Estupiñan, quien con su personalidad intachable soporto toda dificultad, amándome y recordándome que todo sacrificio tiene su recompensa. A mis padres, Floralba Navas y Jairo Orduz por su apoyo incondicional, por todas y cada una de las palabras de aliento que siempre marcaron en mi la diferencia y por formar la persona que soy hasta ahora, pues todo se lo debo a ellos. A mi hermana Karen Orduz, que me motiva día a día ser un ejemplo de vida para ella. A Martin Prada, por ser mi presente y futuro, por enseñarme a soñar despierta, pero siempre con los pies en la tierra, gracias amor porque has sido un apoyo y ejemplo integro.

A el profesor John Jairo Castillo León, a quien expresó mi profundo agradecimiento por su orientación, dedicación y paciencia para culminar satisfactoriamente este proyecto. A mis codirectores Jorge Gutiérrez y Sergio Blanco que hicieron aportes importantes tanto a mi vida como a el presente trabajo. A mi amigo más antiguo, Jhon Valencia quien con su humildad y apoyo me ha demostrado que los amigos para siempre si existen. A Todos mis amigos que con sus variadas personalidades me aportaron un poco de ellos, en especial a Silvia Pedraza y Felix Muñoz quienes siempre creyeron en mí sin importar que la situación demostrase lo contrario. A mis compañeros del GIBIM por compartir su conocimiento y por su amistad, en especial a Marlon Cáceres, Jennifer Ruiz, Paula Uribe y Carolina Chacín con quienes compartí la mayor parte del tiempo en el laboratorio.

A mis profesores, quienes permitieron que con cada uno de los conocimientos yo fuese una mejor persona y a el proyecto 8854 de Colciencias por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCION	19
1. MARCO DE REFERENCIA.....	23
1.1 MARCO DE ANTECEDENTES.....	23
1.2 MARCO TEORICO.....	30
1.2.1 <i>Electrodos serigrafiados</i>	30
1.2.1.1 <i>Nanotubos de carbono</i>	31
1.2.2 <i>Biosensor</i>	31
1.2.2.1 <i>Biosensores amperometricos</i>	33
1.2.2.2 <i>Biosensores catalíticos</i>	33
1.2.3 <i>Enzimas</i> 33	
1.2.3.1 <i>Oxidoreductasas</i>	34
1.2.3.1.1 <i>Peroxidasas</i>	35
1.2.4 <i>Peroxidasa de pasto guinea</i>	36
1.2.5 <i>Inmovilización de enzimas sobre superficies electródicas</i>	37
1.2.6 <i>Técnicas electroquímicas</i>	38
1.2.6.1 <i>Voltamperometría cíclica</i>	38
1.2.6.2 <i>Cronoamperometría</i>	39
1.2.6.2 <i>Impedancia</i>	40
2. METODOLOGIA	42
2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO.....	42
2.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE PPG	42
2.2.1 <i>Extracción</i>	42
2.2.2 <i>Eliminación de pigmentos</i>	43
2.2.3 <i>Cromatografía por permeación en gel</i>	43
2.2.4 <i>Concentración del extracto enzimático</i>	44
2.2.5 <i>Determinación de proteínas mediante el método de Bradford</i>	44
2.2.6 <i>Determinación de actividad enzimática</i>	44
2.3 MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS CON EL EXTRACTO ENZIMÁTICO	45
2.4 CARACTERIZACION POR METODOS ELECTROQUIMICOS	46
2.4.1 <i>Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferricianuro de potasio como electrolito</i>	47
2.4.2 <i>Efecto de H₂O₂ y TCS sobre la respuesta enzimática del electrodo</i>	48

2.4.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrogeno	48
2.4.4 Influencia del pH	48
2.5 CRONOAMPEROMETRIA DE ELECTRODOS MODIFICADOS Y SIN MODIFICAR	49
2.5.1 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	49
2.5.2 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de TCS	50
2.6 DETERMINACION DE PARAMETROS ANALITICOS.....	50
2.6.1 Rango de linealidad	50
2.6.2 Sensibilidad.....	51
2.6.3 Límite de detección.....	51
2.7 IMPEDANCIA DE ELECTRODOS.....	52
3. ANÁLISIS Y RESULTADOS	53
3.1 EXTRACCION Y SEMIPURIFICACIÓN DE PPG	53
3.2. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS CON LA PEROXIDASA DE PASTO GUINEA.	56
3.3. CARACTERIZACION POR METODOS ELECTROQUÍMICOS DEL ELECTRODO MODIFICADO Y SIN MODIFICAR	58
3.3.1 Efecto de H ₂ O ₂ y TCS sobre la respuesta enzimática del electrodo.....	61
3.3.2 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrogeno.....	65
3.3.3 Influencia del pH	67
3.4. ANÁLISIS CRONOAMPEROMÉTRICO DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS	69
3.4.1 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	69
3.4.2 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de TCS	72
3.5. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA DE ELECTRODOS	76
4. CONCLUSIONES	79
5.RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	82
ANEXOS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posible mecanismo de ciclo catalítico de las POD en presencia de TCS (Adaptado de la referencia 29).....	27
Figura 2. Electrodo serigrafiado.....	30
Figura 3. Formación de un SWCNT a partir de una lámina de grafeno.	31
Figura 4. Reducción de energía de activación de reacciones catalizadas por enzimas. Fuente: AUTOR.....	34
Figura 5. Fotografía de pasto guinea. Fuente: Bryan Harry - Plantas of Kaloko – Honokohau National Historical Park - National Park Service - USA	36
Figura 6. magnitudes de un voltamperograma cíclico, E_{pi} = potencial del pico catódico E_{pa} = Potencial de pico anódico i_{pi} = intensidad de corriente de pico catódico i_{pa} = intensidad de corriente de pico anódico.	39
Figura 7. A) Forma de la onda de potencial para la técnica. B) Curva i-t resultante	40
Figura 8. Componente real (Z') e imaginario (Z'') de la impedancia total (Z) para un circuito en paralelo resistencia (R)-capacitancia (C), que considera la resistencia de la solución (R_{sol}), a diferentes frecuencias ($R_{sol} = 1 \text{ ohm}$, $R = 1' \text{ ohm}$, $C = 0.0001 \text{ F cm}^{-2}$, $f \text{ ma}$).....	41
Figura 9. Electrodo serigrafiados de SWCNT antes y después de ser modificados con la PPG.....	46
Figura 10. Montaje experimental de las mediciones electroquímicas realizadas en el presente trabajo.	47
Figura 11. Inmersión del electrodo DRP 110SWCNT en la celda acrílica durante las mediciones electroquímicas.....	47
Figura 12. Paso a paso del proceso de extracción de la PPG.....	53
Figura 13. Eliminación de pigmentos por el método de reparto bifásico.....	54
Figura 14. Actividad volumétrica de las fracciones recolectadas en la cromatografía por permeación en gel.	55

Figura 15. Posible Mecanismo de reacción de EDC con la superficie del electrodo serigrafado de SWCNT y grupos aminos disponibles en la enzima (Adaptado de la referencia 49).....	57
Figura 16. CV de electrodos modificados (rojo) y sin modificar (negro) en solución $K_4[Fe(CN)_6]$ 10 mM a una velocidad de barrido de 50 mV/s y en un rango de potencial de 480 mV hasta -320 mV.	59
Figura 17. CVs de electrodos modificados (rojo) y electrodos sin modificar (negro) en solución buffer fosfato 30mM pH 8 (A) solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H_2O_2 5 mM a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.	61
Figura 18. CVs de electrodos modificados (rojo) y electrodos sin modificar (negro) en solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H_2O_2 5 mM a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.....	62
Figura 19. CVs de electrodos modificados (rojo) y electrodos sin modificar (negro) en solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H_2O_2 5mM + TCS 1mM (C) a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.....	62
Figura 20. Comparación del comportamiento del electrodo modificado con la PPG en los diferentes sistemas planteados: PBS 30 mM pH 8 (negro), PBS 30 mM pH 8 + H_2O_2 5mM (rojo), PBS 30mM pH 8 + H_2O_2 5mM + TCS 1Mm (Azul) a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.....	65
Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de electrodo modificado con PPG en solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H_2O_2 5 mM a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V. (13 Ciclos).....	65
Figura 22. CVs de electrodos modificados con PPG en solución PBS 30 mM pH 8 con H_2O_2 5 mM a diferentes velocidades de barrido desde 40 mV/s hasta 150 mV/s y en un rango de potencial de 1.0 a -1.0 V.....	66
Figura 23. Diagrama de picos de corrientes catódicas (negro) y anódica (rojo) versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.	67
Figura 24. Dependencia de la corriente relativa vs pH	68

Figura 25. Cronoamperometría para adiciones sucesivas de H ₂ O ₂ a un potencial de -800 mV en electrodo modificado (negro) y electrodo si modificar (rojo).	71
Figura 26. Curva de calibración obtenida con los datos de cronoamperometría para diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno.....	71
Figura 27. Cronoamperometría para adición sucesiva de soluciones de TCS a un potencial de 300 mV en electrodo modificado (negro) y electrodo si modificar (rojo).	72
Figura 28. Curva de calibración obtenida con los datos de cronoamperometría para TCS.....	73
Figura 29. Diagrama de Nyquist para electrodo sin modificar (rojo) y electrodo modificado con PPG (azul)	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las enzimas	35
Tabla 2. Etapas de purificación de la PPG	56
Tabla 3. Valores de picos de oxidación y reducción para los electrodos estudiados	60
Tabla 4. Diferentes tipos de biosensores para peróxido de hidrogeno.	74

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Imagen SEM de superficie de nanotubos de carbono en estudio.	91
Anexo B. EDAX para zona brillante (A) zona oscura (B)	93
Anexo C. Espectro Raman de SWCNT	94

ABREVIATURAS

A	Amperios
BSA	Albumina de suero bovino
CV	Voltamperometría cíclica
CVs	Voltamperogramas cíclicos
Da	Dalton
EDC	hidrocloruro de 1-etil-3-[3dimetilamonipropil] carbodiimida
g	Gramos
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IES	Impedancia electroquímica
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
L	Litro
LD	límite de detección
μ A	Microamperio
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
M	Molar
mA	Milimolar
mg	Miligramo
mV	Milivoltio
MWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple
nM	Nanomolar
NTC	Nanotubos de carbono
OCP	Potencial de circuito abierto
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular

POD	Peroxidasa
PPG	Peroxidasa de pasto guinea
RMN	Resonancia magnética nuclear
SBP	Peroxidasa de haba de soja
SWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple
TCS	Triclosan
U	Unidad de actividad peroxidasa
V	Voltios

RESUMEN

TITULO: DESARROLLO DE UN BIOSENSOR BASADO EN ELECTRODOS DE NANOTUBOS DE CARBONO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*) PARA LA DETERMINACIÓN DE TRICLOSAN.*

AUTOR: ANGIE ESTEFANY ORDUZ NAVAS**

PALABRAS CLAVE: BIOSENSOR, PEROXIDASA DE PASTO GUINEA, NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED SIMPLE, PERÓXIDO DE HIDROGENO, TRICLOSAN.

DESCRIPCION

Recientes estudios han demostrado que el triclosan (TCS) posee efectos toxicológicos en fauna y células humanas, por esta razón la comunidad científica está en la búsqueda de métodos que permitan de manera rápida económica y sencilla la detección de este compuesto. Además, La Peroxidasa de pasto guinea (PPG) es una enzima que requiere del H_2O_2 para llevar a cabo su función catalítica frente a aminas y fenoles. Eventualmente la PPG podría oxidar sustratos de naturaleza fenólica, como triclosan (TCS). Por ello en el presente trabajo se desarrolló un biosensor enzimático modificando la superficie de electrodos serigrafiados de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT, por sus siglas en inglés) con peroxidasa de pasto guinea (PPG) para la detección de TCS.

Para tal fin, el trabajo se desarrolló en cuatro etapas: la primera consistió en la extracción y purificación parcial de la enzima, obteniendo una actividad específica de 609 U/mg. La segunda etapa consistió en la inmovilización del extracto enzimático sobre electrodos serigrafiados SWCNT usando como agente entrecruzante el hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC).

* Trabajo de Grado

** Facultad de ciencias, Escuela de Química, director: John Jairo Castillo León, Doctor en química.

La tercera etapa fue la caracterización del electrodo mediante técnicas electroquímicas tales como voltamperometría, cronoamperometría y espectroscopia de impedancia electroquímica.

Finalmente, en la cuarta etapa se realizó la evaluación de los parámetros analíticos donde el biosensor presento una relación lineal entre la señal de corriente y la concentración de TCS en el rango de 20- 80 μM y un límite de detección de 3 Mm

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR BASED ON CARBON NANOTUBES MODIFIED WITH PEROXIDASE OF PASTO GUINEA (*Panicum maximum*) FOR THE DETERMINATION OF TRICLOSAN.*

AUTHOR: ANGIE ESTEFANY ORDUZ NAVAS.**

KEY WORDS: BIOSENSOR, GUINEA GRASS PEROXIDASE, SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES, HYDROGEN PEROXIDE, TRICLOSAN.

DESCRIPTION

Recent studies have demonstrated that triclosan (TCS) has toxic effects on fauna and human cells, for this reason the scientific community is in the search of methods for a rapid, easy and low-cost detection of this compound. In addition, guinea grass peroxidase (PPG) is an enzyme that requires H_2O_2 to carry out its catalytic function against amines and phenols. Eventually PPG could oxidize phenolic substrates, such as triclosan (TCS). Therefore, in this work is an enzymatic biosensor based on single walled carbon nanotubes (SWCNT) with peroxidase from guinea grass (PPG) for the detection of TCS was developed.

This study was developed in four stages: the first was the extraction and partial purification of the enzyme, obtaining a specific activity of 609 u/mg. The second stage consisted in the immobilization of the enzymatic extract on the surface of SWCNT electrodes using 1-ethyl-3- [3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) as a crosslinker agent. The third stage was the characterization of the modified and unmodified electrode by electrochemical techniques such as

* Grade Project

** Faculty of Sciences, School of Chemistry, Manager: John Jairo Castillo León, Doctor of Chemistry.

voltamperometry, chronoamperometry and spectroscopy of electrochemical impedance.

Finally, the analytical parameters were evaluated, and the biosensor exhibited a linear relationship between the current signal and the TCS concentration in the range of 20-80 μM and a detection limit of 3 μM .

INTRODUCCION

Diferentes avances sociales y económicos conllevan a la identificación de problemas ambientales y de salubridad, por lo cual surge la necesidad de explorar métodos de detección rápida y sencilla de los principales causantes de estos problemas. En la actualidad, se ha reportado que el triclosan (TSC), compuesto aromático policlorado, es un precursor de sustancias tóxicas como las dioxinas¹ las cuales a largo plazo generan enfermedades ginecológicas como la endometriosis², también se ha encontrado que pueden generar resistencia cruzada con la función de antibióticos y causar alteraciones en el sistema endocrino³. El TCS es de uso frecuente en el entorno cotidiano debido a sus propiedades antibacteriales encontrándose en productos como champú, cosméticos, jabones, juguetes, etc.⁴ la bioacumulación en organismos acuáticos y la no remoción en aguas residuales genera que el TCS regrese al ecosistema y a un posterior consumo humano donde este compuesto no se elimina con facilidad acumulándose en los tejidos⁵.

¹ DANN B, Andrea y HONTELA, Alice. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*. 2011. 285-311.

² IGARASHI M, Toshio, *Et al.* Dioxin may promote inflammation-related development of endometriosis. 2008. 89:1287-1298.

³ SCHWEIZER P, Herbert. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. 2001. 202.

⁴ RODRICKS V, Joseph. *Et al.* Triclosan: A critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. 2010. 40:422-484.

⁵ HUANG, Chu-Long; ABASS K, Olusegun y YU, Chang-Ping. Triclosan: A review on systematic risk assessment and control from the perspective of substance flow analysis. *Sci Total Environ*. 2016. 566-567:771-785.

Los métodos de detección más utilizados como la espectrometría de masas (EM), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), resonancia magnética nuclear (RMN), entre otros, a pesar de ser bastante efectivos y precisos poseen una alta complejidad dificultando su portabilidad y generando así elevados costos. Este tipo de dificultades se pueden solventar por medio de biosensores electroquímicos, los cuales a través de su miniaturización y portabilidad generan un menor tiempo de análisis y menor costo.

Gracias a estas características los biosensores que incorporan enzimas en su estructura se han transformado en una herramienta con amplio uso respecto a la detección *in situ* y específica de diferentes analitos de tipo ambiental o biomédico. Aunque actualmente existe una gran cantidad de técnicas analíticas de laboratorio como las mencionadas anteriormente para la identificación de TCS, la mayoría implica un elevado consumo de tiempo y necesidad de personal capacitado, dada la obligación de realizar pretratamientos de la muestra que resultan costosos y laboriosos, es por ello por lo que una alternativa para abordar el análisis de TCS de un modo económico, rápido y fiable se da mediante el uso de biosensores electroquímicos.

Un tipo especial de biosensores son los biosensores amperométricos de peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), los cuales han ganado popularidad debido a la disponibilidad comercial y a las propiedades fisicoquímicas presentadas por la enzima⁶⁷. Sin embargo la HRP presenta inconvenientes

⁶ BAYKAL, Abdulhadi, *et al.* A novel amperometric phenol biosensor based on immobilized HRP on poly (glycidylmethacrylate) -grafted iron oxide nanoparticles for the determination of phenol derivatives. *Sensors Actuators B Chem.* 2012. 173:396-405.

⁷ CHEKIN, Fereshteh; GORTON, Lo y TAPSOBEA, Issa. Direct and mediated electrochemistry of peroxidase and its electrocatalysis on a variety of screen-printed

relacionados con una baja estabilidad en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y otros hidroperóxidos y cuando se trabaja en condiciones no habituales, como altas temperaturas y pH extremos⁸. Es por eso que la búsqueda de nuevas plantas tropicales presentes en nuestro medio que contengan peroxidasa (POD) se convierte en una motivación para el desarrollo y construcción de nuevos biosensores. Por tanto, en este estudio se planteó la extracción y purificación parcial de la peroxidasa del pasto guinea (*Panicum maximum*) como fuente de POD para ser inmovilizada sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT, por sus siglas en inglés), dando de esta manera un valor agregado a una planta que se considera como maleza en las zonas urbanas.

Los electrodos de nanotubos de carbono (NTC) han sido de gran interés en los últimos años debido a sus propiedades características tales como su fuerte resistencia mecánica, su excelente conductividad eléctrica y su gran área superficial específica⁹. Además, la posibilidad de ser funcionalizados le postulan como un electrodo ideal para la inmovilización de enzimas. La modificación de la superficie de los electrodos de SWCNT con la PPG potencializa la facultad del electrodo en

carbon electrodes: amperometric hydrogen peroxide and phenols biosensor. *Anal bioanalytical Chem.* 2015. 439-446.

⁸ CASTILLO, John Jairo; VILLAMIZAR N, Erika y RIOS A, Carlos. A Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Immobilization of the Highly Stable Royal Palm Tree Peroxidase (*Roystonea regia*) with Chitosan and Glutaraldehyde on Screen-printed Graphene Electrodes. *J Mex Chem Soc.* 2016. 60:135-140.

⁹ BARSAN M. Madalina; GHICA M. Emilia y BRETT A. Christopher. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer / carbon nanotube modified electrodes: A review. *Anal Chim Acta.* 2015. 881:1-23.

cuanto a la transferencia de electrones desde el centro activo de la peroxidasa y la superficie del electrodo, facilitando el proceso de detección de fenoles⁷.

El grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) está realizando estudios en donde se evidencian potenciales y prometedoras propiedades biocatalíticas y fisicoquímicas de la PPG en comparación con la HRP¹⁰. De este modo se desarrolló un biosensor para la inmovilización de PPG basado en electrodos serigrafados modificados con SWCNT aprovechando sus propiedades para la identificación de TCS en tiempo real y en concentraciones de orden de los micromoles para su posible aplicación a muestras de interés ambientales.

¹⁰ CENTENO, Diana Alejandra; SOLANO, Xuxan y CASTILLO, John Jairo. A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry*. 2017. 116:33-38.

1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 MARCO DE ANTECEDENTES

En los últimos años se han reportado diferentes fuentes de extracción de POD en la búsqueda de nuevas alternativas que reemplacen y mejore las características fisicoquímicas de la HRP la cual es la más usada y asequible comercialmente¹¹. Esta búsqueda incluye diferentes frutas y semillas como la manzana¹², brócoli¹³, cilantro¹⁴, almendra¹⁵ y haba de soja¹⁶. En el año 2014 X. Peng *et al.*, extrajeron y estudiaron dos tipos de peroxidasa del caldo fermentado de *Phanerochaete chrysosporium*, peroxidasa de lignina (LiP) y peroxidasa de manganeso(MnP), las cuales fueron extraídas a partir de una metodología basada en el uso de micelas inversas. El estudio de la estabilidad de las PODs a diferentes pHs mostró, que la

¹¹ VEITCH C, Nigel. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. 2004. 65:249-259.

¹² TRUJILLO FERNANDEZ, Pablo J. *Et al.* Peroxidase Activity and Superficial Scald Development in Apple Fruit. *J Agric Food Chem.* 2003. 51:7182-7186.

¹³ DUARTE VASQUEZ, Miguel A. Broccoli Processing Wastes as a Source of Peroxidase. *J Agric Food Chem.* 2007. 55:10396-10404.

¹⁴ LARIBI, Bochra; *Et al.* Coriander (*Coriandrum sativum* L) and its bioactive constituents. *Fitoterapia.* 2015. 103:9-26.

¹⁵ DOURADO, Fernando. *et al.* Purification , structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of *Prunus dulcis* seeds. *Carbohydr Res.* 2004. 339:2555-2566.

¹⁶ STEEVENSZ, Aaron. *Et al.* A simple lab-scale extraction of soybean hull peroxidase shows wide variation among cultivars. *Ind Crop Prod.* 2013. 48:13-18.

LiP es más estable a pH 3 mientras que la MnP es más estable a pH 4¹⁷. Posteriormente en un estudio similar Mangesh D. y Virendra K utilizaron un sistema de tres fases compuesto por sulfato de amonio y t-butanol para la purificación de la POD de cascara de naranja, la caracterización de esta peroxidasa permitió determinar que su masa molecular era de alrededor de los 26 kDa. Concluyendo así que esta alternativa de purificación es atractiva para la purificación de enzimas de nuevas fuentes¹⁸. En la actualidad la búsqueda de nuevas fuentes de POD se ha intensificado con el consecuente avance en el desarrollo de novedosos sensores enzimáticos¹.

El concepto de biosensor surge a partir de la configuración de medida introducida por Clark y Lyons en 1962 y se caracteriza por la combinación espacial directa de una sustancia biológicamente activa, el llamado receptor, unida a una matriz, con un dispositivo electrónico para la transducción de la señal¹⁹. Los biosensores de peroxidasa son denominados biosensores enzimáticos, estos son los más usados comúnmente puesto que combinan las ventajas de la especificidad para reconocer moléculas particulares con la transducción directa de la velocidad de reacción en una corriente²⁰.

¹⁷ PENG, Xing. *Et al.* Synchronous extraction of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* fermentation broth. 2014. *Sep Purif Technol.* 123:164-170.

¹⁸ VETAL D, Mangesh; y RATHOD K, Virendra. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). *Food Bioprod Process.* 2014. 94:284-289.

¹⁹ LYONS C, Champ y LELAND C, Clark Jr. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Anal New York Acad Sci.* 1962. 102:29-45.

²⁰ RECHNITZ A, Garry. Biosensors into the 1990s. *Electoanalysis.* 1991. 3:73-76.

El TCS posee propiedades desinfectantes, antioxidantes y plaguicidas, por ello, se usa principalmente en la fabricación de medicamentos, pigmentos, explosivos, papel y en las industrias petroquímicas²¹. El control ambiental que genera la detección de TCS es debido a la enorme variedad de usos, fuentes de origen y elevada producción, donde en los últimos años el número de análisis efectuados para detección de compuestos fenólicos ha reportado la presencia de TCS en distintos tipos de muestras ambientales, tales como: aguas de diversas procedencias (de mar, de bebida, manantiales, de lluvia, subterránea)^{22,23} sedimentos²⁴, organismos vivos (algas, moluscos, peces, aves) y fluidos biológicos (orina y plasma humanos)²⁵. Por tanto, se han empleado diferentes métodos de análisis para la detección de TCS: Álvarez, A. y Castillo A.²⁶ usaron Microextracción

²¹ TOMASKO David. *Et al.* Human Impacts on Seagrasses: Eutrophication, Sedimentation and contamination. *seagrasses: biology, ecology and conservation*: 2006. 567-593.

²² CLAY S, A. y KOSKINEN C, William. Factors Affecting Atrazine Fate in North Central U.S. Soils. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 151st ed. New York, NY: Springer; 1997. 117-165.

²³ CHRISTIAN, Leuenberger; LIGOCKI P, Mary y PANKOW F, James. Trace Organic Compounds in Rain. 4. Identities, Concentrations, and Scavenging Mechanisms for Phenols in Urban Air and Rain. *Environ Sci Technol*. 1985, 19(11):1053-1058.

²⁴ OIKARI, A. y ÅNÄS E.B. Chlorinated Phenolics and Their Conjugates in the Bile of Trout (*Salmo gairdneri*) Exposed to Contaminated Waters. *Environ Contam Toxicol*. 1985. 35:802-809.

²⁵ DONALD F, Goerlitz. *et al.* Migration of Wood-Preserving Chemicals in Contaminated Groundwater in a Sand Aquifer at Pensacola, Florida. *Environ Sci Technol*. 1985, 19:955-961.

²⁶ PEÑA ÁLVAREZ, Araceli y CASTILLO ALANÍS, Alejandra. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por

en fase sólida acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (MEFS-CG-EM) utilizando una fibra de polietilenglicol (PEG), obteniendo mayores rendimientos de identificación a pH 4 y límites de cuantificación en niveles de ng/L. Otro método de detección planteado es a través de sensores, los cuales sobre una superficie de oro han sido ensamblados capa por capa y analizados por espectroscopia de impedancia, esta superficie fue modificada con óxido de grafeno y quitosano, detectando trazas de TCS en solución acuosa en el rango de micromolar a nanomolar²⁷.

El uso de la HRP con fines analíticos en los biosensores se ha limitado debido a la inestabilidad de la enzima a altos valores de pH e inactividad en presencia de altas concentraciones de peróxidos⁸. Se planteó el estudio y desarrollo de un biosensor electroquímico basado en nanotubos de carbono modificados con PPG para la detección de triclosan donde se aprovechó un recurso natural y renovable a corto plazo tomado como maleza. El fundamento para el desarrollo del biosensor se hizo referenciando el grupo de investigación GIBIM (Grupo de investigación de Bioquímica y microbiología) donde se realizaron previas extracciones de PPG y se encontró una alta respuesta de actividad enzimática¹⁰.

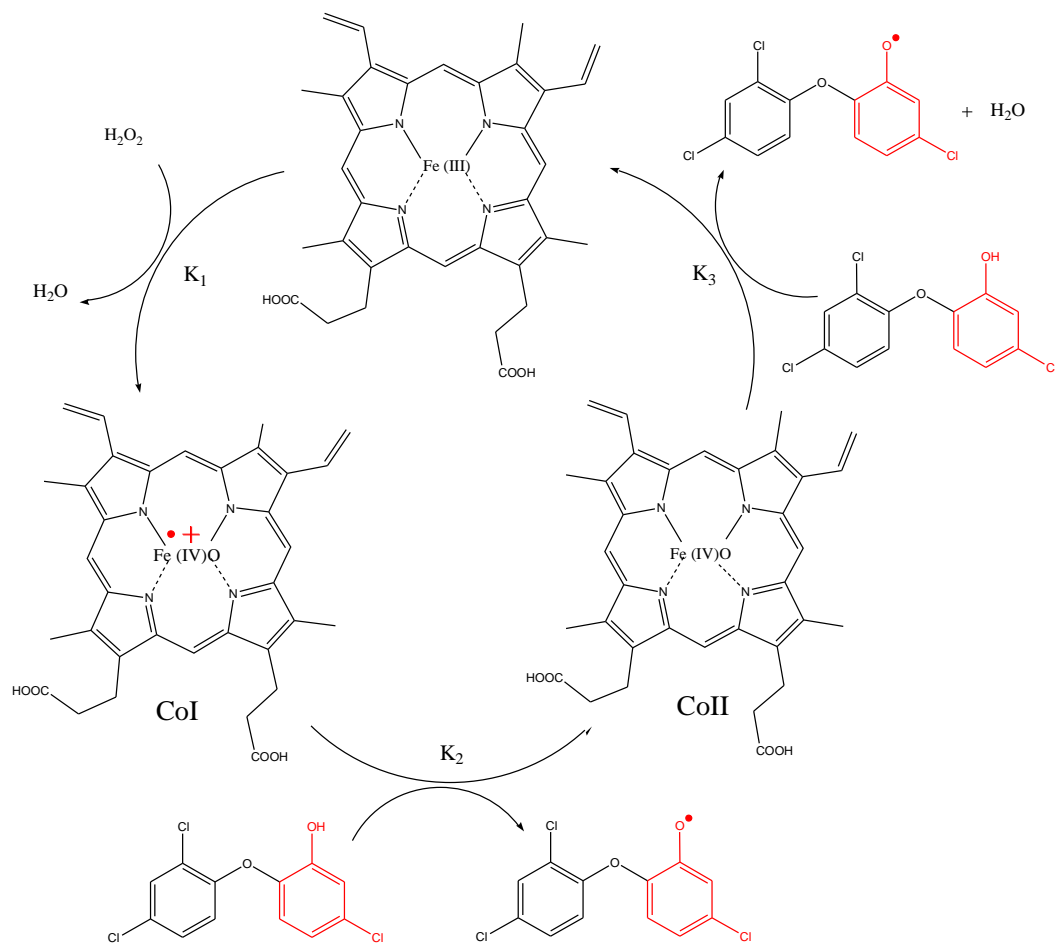
El uso de peroxidasa para la detección de triclosan se podría dar en principio, debido a que la enzima en su centro catalítico posee un grupo porfirínico hierro (III), el cual

microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *TIP Rev Espec en Ciencias Quím.* 2015. 18(1):29-42

²⁷ MARQUES, Ines, *Et al.* Detection of traces of triclosan in water. *Appl Surf Sci J.* 2017. 421:142-147.

a través de transferencia de electrones puede oxidar sustratos tipo aminas y fenoles, en este caso el TCS²⁸.

Figura 1. Posible mecanismo de ciclo catalítico de las POD en presencia de TCS (Adaptado de la referencia 29)



²⁸ LI Jianhua; *Et al.* Removal of triclosan via peroxidases-mediated reactions in water: Reaction kinetics, products and detoxification. *J Hazard Mater.* 2016. 310:152-160.

Colin *Et al.*²⁹, lograron detectar fenoles policlorados (TCS) usando peroxidasa de haba de soja (SBP). Con la ayuda de modelamiento matemático y análisis de la identificación de productos Jianhua Li *Et al.*²⁸, plantearon un posible mecanismo de la oxidación de TCS por la POD como se muestra en la Figura 1 donde el posible mecanismo se da de la siguiente manera: La POD es oxidada por el H₂O₂, creando un intermediario catalíticamente activo denominado Comp I, que con la transferencia de electrones oxida TCS formando un radical fenoxi y otro intermediario conocido como Comp II, el cual es capaz de oxidar otra molécula de triclosan para llevar así a la enzima a su forma nativa y formar otro radical libre. La transferencia de electrones presentada en el ciclo catalítico puede ser detectada mediante técnicas electroquímica tal como lo demostró J. Yang. *Et al.*, quienes estudiaron el comportamiento electroquímico del TCS utilizando electrodos de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTC, por sus siglas en inglés) mostrando que el proceso de oxidación de la molécula tenía un comportamiento irreversible.

Esto se vio reflejado por la presencia de un pico de oxidación que involucra la transferencia de un electrón y demostrando que es un método electroquímico sensible para la detección de triclosan. Con esta metodología se obtuvieron tiempos cortos de análisis, además de ser un método sencillo comparado con otros métodos tales como HPLC³⁰, En el 2015 la superficie de MWNTC fue modificada con nanopartículas de óxido de zinc con el propósito de mejorar los valores en el límite de detección del TCS siendo este de 1.3 µg/L. El biosensor desarrollado presentó

²⁹ FLOCK, Colin; BASSI, Amarjeet y GIJZEN, Mark. Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. *J Chem Technol Biotechnol.*1999. 74:303-309.

³⁰ JINQUAN, Yang; *Et al.* Electrochemical Sensor for Rapid Detection of Triclosan Using a Multiwall Carbon Nanotube Film. *J Agric Food Chem.*2009. 57:9403-9407.

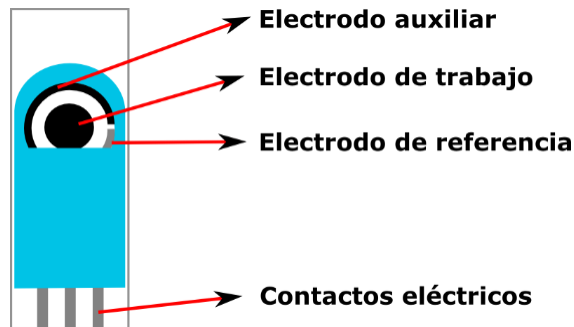
buena estabilidad, repetibilidad y reproducibilidad, además ofrece la posibilidad de ser utilizado como herramienta analítica para determinar la calidad de las aguas residuales domésticas e industriales³¹.

³¹ MOYO, Mambo; FLORENCE R, Lehutso y OKONKWO O, Jonathan. Improved electro-oxidation of triclosan at nano-zinc oxide-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Sensors Actuators B Chem.* 2015; 209:898-905.

1.2 MARCO TEORICO

1.2.1 Electrodo serigrafiado: Un electrodo serigrafiado es una pequeña tarjeta en donde se encuentra un circuito eléctrico integrado y está fabricado de diferentes materiales como: carbono, oro, platino, plata, nanotubos de carbono o nanopartículas de oro. En el circuito integrado, los transductores juegan un papel importante en el desarrollo de biosensores, por tal razón a través del tiempo se han venido estudiando diferentes configuraciones y diseños de los mismo siendo útiles en áreas ambientales y biomédicas.

Figura 2. Electrodo serigrafiado³²



Como se muestra en la Figura 2 **Error! Reference source not found.**, el electrodo de trabajo y el auxiliar generalmente son de carbono mientras que el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.

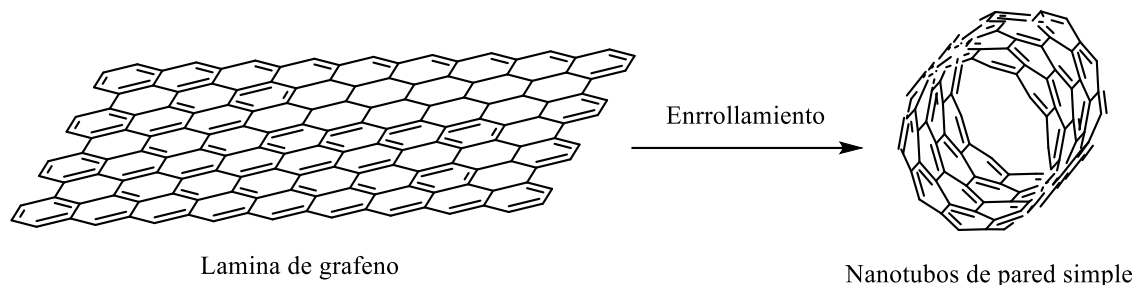
Los electrodos serigrafiados de compuestos basados en formas alotrópicas de carbono son especialmente atractivos para la construcción de sensores electroquímicos: son en gran medida químicamente inertes y dan lugar a un amplio intervalo de potenciales de trabajo con una baja resistividad eléctrica. Además,

³² Dropsens. <http://www.dropsens.com/inicio.html>.

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)³³.

1.2.1.1 Nanotubos de carbono: Los NTCs son sistemas unidimensionales únicos con propiedades física (mecánicas, térmicas, eléctricas y electrónicas) excepcionales y, por consiguiente, con promisorias aplicaciones en la Nanociencia. Su carácter unidimensional, particularmente notable en el caso de los SWCNT le confiere dimensiones de un átomo de grosor, unas decenas de átomos de circunferencia y, típicamente, varias micras de longitud, estos surgen al enrollarse una capa monoatómica de grafito tal como se observa en la Figura 3.

Figura 3. Formación de un SWCNT a partir de una lámina de grafito³⁴.



1.2.2 Biosensor: Los biosensores se están convirtiendo en una herramienta importante en medicina, en el control de calidad de los alimentos y en el control medioambiental. En principio, se puede diseñar un biosensor para cualquier tipo de

³³ LONG L, Gary. y WINEFORDNER J, D. Limit of Detection a closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem.* 1983. 55(7):712-714.

³⁴ GARCÍA GONZALEZ, Maria y ACOSTA GARCIA, Agustin. Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. In: *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia.* ;2010. 2010:197-222

compuesto que sea capaz de interactuar específicamente con un sistema biológico. Generalmente, el biosensor contiene una molécula biológica inmovilizada (enzimas, células, anticuerpos) próxima a un transductor que, en contacto con el analito, transformará la señal química producida en una señal eléctrica o de otro tipo (óptica, calorimétrica, acústica, etc.) La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semi-cuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor³⁵.

El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas particulares constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. La naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular de una determinada molécula de entre un conjunto o una mezcla de ellas. Este fenómeno de reconocimiento selectivo de especies obviamente puede ser aprovechado con fines analíticos para el diseño y preparación de sensores de dichas especies.

El transductor, en el cual se encuentra inmovilizado o retenido el material biológico, debe permitir la conversión de la interacción del analito con el receptor en una respuesta eléctrica, que luego es amplificada y procesada; la cual estará relacionada con la concentración de ese analito. Dicho transductor, por tanto, determina la eficacia en el procesado de la señal del biosensor, mientras que su selectividad viene principalmente definida por la particularidad de la interacción del componente biológico con el analito. Idealmente, los dispositivos de este tipo deben responder continua y reversiblemente al analito de interés sin perturbar la muestra, eliminando así la necesidad de su pretratamiento e incluso su recolección.

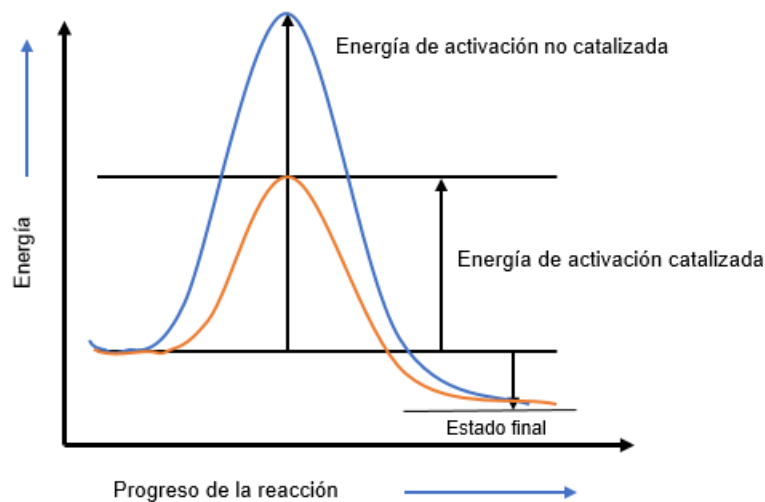
³⁵ THEVENOT R, Daniel. *Et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron.* 2001. 16:121-131.

1.2.2.1 Biosensores amperométricos: Los Biosensores amperométricos, sin duda alguna, son los más prometedores, sobre todo en términos de sensibilidad. En su construcción generalmente se usan enzimas purificadas específicas para cada analito, aunque en algunos casos se inmoviliza un tejido vegetal que contiene la enzima³⁴. 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, con respecto a un electrodo de referencia, un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de casos para completar la celda electroquímica³⁵.

1.2.2.2 Biosensores catalíticos: Los biosensores catalíticos usan enzimas como biorreceptor. La capa de enzima inmovilizada se interpone entre la superficie del electrodo y la disolución del analito, habiéndose utilizado tanto métodos físicos como químicos para preparar capas de enzimas inmovilizadas sobre diversos tipos de superficies electródicas.

1.2.3 Enzimas: Como se muestra en la Figura 4, las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, reduciendo la energía de activación de una transformación desde reactivos a productos. En una reacción catalizada por una enzima se produce la unión del sustrato en una región concreta de la enzima denominada centro activo, el cual 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.

Figura 4. Reducción de energía de activación de reacciones catalizadas por enzimas. Fuente: AUTOR



En la Tabla 1 se indica la clasificación de enzimas de acuerdo con la reacción química que catalizan. Destacando, entre las enzimas disponibles comercialmente, las de mayor uso, las Oxidorreductasas.

1.2.3.1 Oxidorreductasas: El fundamento de las oxidorreductasas se basa en la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de un dador (agente receptor) a un aceptor (agente oxidante) en el medio biológico de reacción, modificando así; el estado de oxidación del sustrato. Dentro de la clasificación de oxidorreductasas se encuentran las peroxidasas; enzimas ampliamente empleadas en la construcción de electrodos enzimáticos, ya que son capaces de utilizar el peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos.

Tabla 1. Clasificación de las enzimas

	Clase	Tipo de reacción	Ejemplo
1	Oxidoreductasas	Oxidación/reducción	Peroxidasas, dehidrogenasas, oxidasas
2	Transferasas	Transferencia de grupo	Transaldolasas
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrolisis	Esterasas, proteasas, carbohidrasas
4	Liasas	Reacciones de eliminación	Substrato grupo liasa
5	Isomerasas	Isomerización	Epimerasas, racemasas
6	Ligasas	Síntesis	Ligasas X-Y

1.2.3.1.1 Peroxidasas: Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con un peso molecular aproximado de 42000 Da, donde la porción proteica corresponde aproximadamente 34000 Da y el resto del peso molecular corresponde al grupo prostético (grupo hemo), dos iones calcio y algunos glicanos superficiales enlazados.

Como se muestra en la Tabla 1, en la reacción catalizada por la peroxidasa, el H_2O_2 es reducido a expensas de varias sustancias que actúan como donadores de electrones, este proceso comienza con una rápida reducción de un peróxido seguida por dos oxidaciones consecutivas de un segundo y tercer sustrato. Todas estas transformaciones son posibles por la disposición especial del grupo hemo en el sitio activo de las peroxidasas.

Aunque la reacción oxidativa de POD puede tener lugar en ausencia de peróxido de hidrógeno si se tiene presente O_2 y cofactores como Mn^{2+} y un fenol, la POD es altamente específica al peróxido, por lo tanto, su principal sustrato es H_2O_2 , aunque la enzima es inactivada por altas concentraciones de peróxido. La POD tiene una

baja especificidad por los sustratos donadores de hidrógeno, mientras la afinidad de la POD por el sustrato donador depende de la fuente de la enzima y del grado de pureza de ésta. Una gran variedad de compuestos puede actuar como donadores de electrones, incluyendo fenoles (p-cresol, guayacol, resorcinol) y aminas aromáticas (anilina, bencidina, o-fenildiamina, o-dianisedina).

1.2.4 Peroxidasa de pasto guinea: la fuente de peroxidasa que en este proyecto se propone es el pasto guinea. Esta planta gramínea perenne nativa de África es una especie con amplio rango de adaptación; desde el nivel del mar hasta los 1800 (msnm), crece bajo suelos de alta fertilidad y soporta niveles moderados de sequía. Como se observa en la Figura 5 las hojas son anchas, largas y su tallo es bastante rígido. La altura de la planta depende de la variedad; desde 0.80 m hasta más de 2.0 m.

Figura 5. Fotografía de pasto guinea. Fuente: Bryan Harry - Plantas of Kaloko – Honokohau National Historical Park - National Park Service - USA



El Pasto guinea por su naturaleza agresiva es clasificado como malezas, también es usado para el pastoreo y se puede encontrar en los bordes de carreteras, bordes de cerca y domina las zonas susceptibles a los incendios. El contenido de proteínas con base a materia seca son alrededor del 9% a los 35 días de edad y del 7% a los

45 días de edad³⁶, este es capaz de regenerarse rápidamente en comparación al pasto de pradera.

En el estudio realizado por Centeno D *et al*¹⁰ se evidencio que la PPG posee un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, también se mostró altamente termoestable alcanzando temperaturas de 66°C, para el rango de pH de 6-10 su actividad se mantiene relativamente estable teniendo una actividad optima a pH 8, la actividad específica reportada fue de 408 U/mg.

1.2.5 Inmovilización de enzimas sobre superficies electrónicas: Los avances en la biotecnología han demostrado que la inmovilización de enzimas y los procesos catalizados por esta son más frecuentes, gracias a las diferentes capacidades frente a los catalizadores convencionales no biológicos, como gran actividad catalítica, estereoselectividad, regioespecificidad, su gran estabilidad a temperatura ambiente y presión atmosférica; Por otro lado, El uso de estructuras nanoestructuradas como los NTCs se presenta gracias a sus propiedades características como estabilidad térmica alta relación área/superficie y una fácil funcionalización, permitiendo la movilidad electrónica entre el centro redox de la enzima y el conductor electrónico.

Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por micro encapsulación, y métodos químicos, ya sea mediante adsorción en la superficie, unión covalente o por entrecruzamiento (crosslinking)¹⁵. El atrapamiento es el método más de retención física más frecuente, donde la enzima se impregna sobre las cavidades internas de la matriz solida; para los métodos químicos la unión a soportes puede darse por adsorción iónica o por unión

³⁶ TUAH, K; BUADU, K y FIAGOME G, K. Studies on the nutritive value of giant star and guinea grass forages in the Ashanti forest belt of Ghana. *Ghana Jnl agric Sci.* 1979. 111(12):103-111.

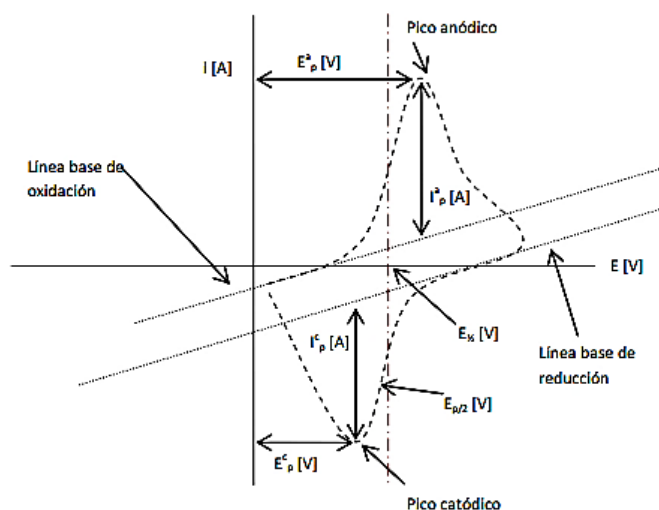
covalente, esta última tiende a poseer una mayor resistencia a cambios pues la estructura terciaria se encuentra estabilizada³⁷.

1.2.6 Técnicas electroquímicas: Los métodos electroquímicos conforman una de las principales divisiones de la química analítica instrumental. Mediciones eléctricas básicas de corriente, resistencia o voltaje se han utilizado sola o en combinación con fines analíticos. Históricamente, muchas técnicas electroanalíticas se han desarrollado, estas, pueden ser clasificadas en cuatro principales categorías: potenciometría, voltamperometría, cronoamperometría e impedanciometría²³. Para una visión general solo referenciaremos voltamperometría, cronoamperometría e impedancia.

1.2.6.1 Voltamperometría cíclica: En la voltamperometría cíclica (CV), la variación de potencial en un electrodo estacionario es producida por una señal de forma triangular. El potencial se varia linealmente desde un potencial inicial E_0 hasta un potencial final E_f , cuando se ha alcanzado este valor el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_0 , este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces lo requiera la experiencia. Los potenciales a los que tiene lugar la inversión se llaman potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio elegido para un experimento dado es aquel en el que tiene lugar la oxidación o reducción controlada por difusión de una o más especies. Dependiendo del tipo de estudio, la dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva. La respuesta consecuente se llama voltamperogramas cíclicos (CVs) y se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de voltamperogramas donde se señala las magnitudes físicas de este patrón de respuesta.

³⁷ ARROYO, Miguel. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharm.* 1998. 39:23-39.

Figura 6. magnitudes de un voltamperograma cíclico³⁸, E_p^i = potencial del pico catódico E_p^a = Potencial de pico anódico i_p^i = intensidad de corriente de pico catódico i_p^a = intensidad de corriente de pico anódico.

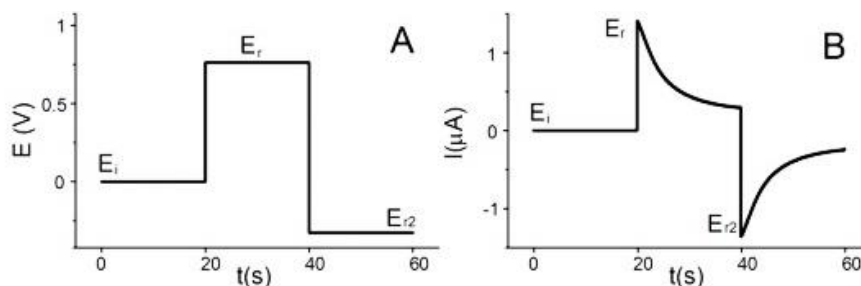


1.2.6.2 Cronoamperometría: Esta técnica electroquímica consiste en medir, en función del tiempo, la intensidad de corriente (I) que fluye por un electrodo de trabajo estacionario sumergido en una disolución y sometido a un potencial constante. Esta técnica lleva consigo, primero, la aplicación de un potencial inicial E_i , en el que no ocurre ninguna reacción de tipo faradaico. Una vez se alcanza el equilibrio, se produce un pulso de potencial hasta un potencial final, E_r , el cual provoca que se lleve a cabo la reacción redox del compuesto de interés. El potencial se mantiene durante un tiempo, t_r , determinado (Figura 7). Simultáneamente se registra la

³⁸ FOGG G, Arnold y WANG, Joseph. Terminology and convention for electrochemical stripping analysis (Technical Report). *Pure Appl Chem.* 1999. 71: 891-897.

intensidad generada en función del tiempo, dando lugar a una curva i-t como la que se muestra en la Figura 7B.

Figura 7. A) Forma de la onda de potencial para la técnica. B) Curva i-t resultante³⁹



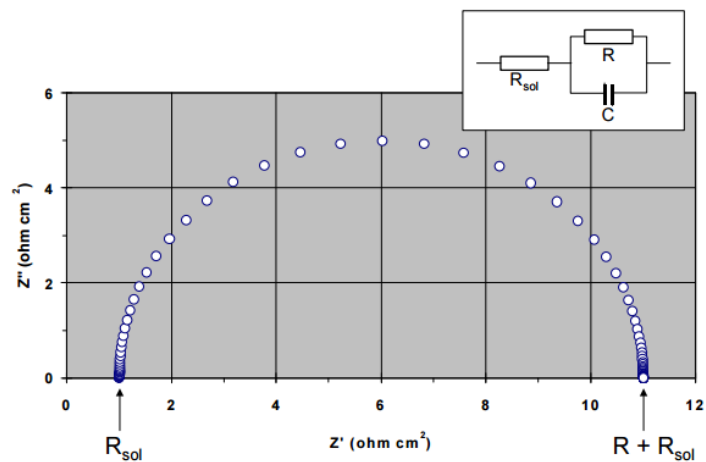
1.2.6.2 Impedancia: Esta técnica se emplea para reconocer la presencia de capas no conductoras en la superficie de los electrodos, que originan un aumento de la resistencia a la transferencia de carga. En el procedimiento experimental más comúnmente usado, se aplica una señal de potencial (E) a un electrodo y se mide su respuesta de corriente (I) a diferentes frecuencias. Es posible también aplicar una señal de corriente y medir la respuesta en potencial del sistema. Así el equipo electrónico usado procesa las mediciones de potencial, tiempo y corriente, dando como resultado una serie de valores de impedancia correspondientes a cada frecuencia estudiada. Esta relación de valores de impedancia y frecuencias se denomina “espectros de impedancia”.

Los espectros de impedancia obtenidos suelen ser analizados mediante circuitos eléctricos, compuestos por componentes tales como resistencias (R), Capacitores (C), inductancias (L), etc. Combinados de tal manera que reproduzcan los espectros

³⁹ AMEUR, Ouled Zied y HUSEIN, Maen M. Electrochemical behavior of potassium ferricyanide in aqueous and (w/o) macroemulsion systems in the presence of dispersed nickel nanoparticles. *Sep Sci Technol.* 2013. 48: 681-689.

de impedancia medidos. Estos circuitos eléctricos son denominados “circuitos eléctricos equivalentes”. En la Figura 8 se puede observar un ejemplo de un diagrama de impedancia de una reacción electroquímica, donde existe una resistencia en serie al circuito paralelo RC, la cual representa la resistencia de la solución, R_{sol} , esto tiene el efecto de transportar el semicírculo, a valores mayores en el eje de la impedancia real (Z') del gráfico. C es la capacitancia de la doble capa (C_{dl}), la cual está en paralelo con la impedancia de la reacción. Por tanto, R es la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}).

Figura 8. Componente real (Z') e imaginario (Z'') de la impedancia total (Z) para un circuito en paralelo resistencia (R)-capacitancia (C), que considera la resistencia de la solución (R_{sol}), a diferentes frecuencias ($R_{sol} = 1 \text{ ohm}$, $R = 1' \text{ ohm}$, $C = 0.0001 \text{ F cm}^{-2}$, $f \text{ ma}$)⁴⁰.



⁴⁰ MORALES PIRATOBA, Ulises; CAMARGO MARIÑO, Álvaro y OLAYA FLOREZ, John Jairo. Electrochemical impedance interpretation of typical diagrams with equivalent circuits. *dyna*. 2010. 77:69-75.

2. METODOLOGIA

2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPO

Merck: peróxido de hidrógeno H₂O₂ 30 % p/v, sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) 10% p/v y polietilenglicol PEG (peso molecular 15.000-20.000); J.T. Baker: guayacol; Los reactivos utilizados para las soluciones tampón fueron todos de grado analítico y proporcionados por J.T Baker. Ferricianuro de potasio K₃[Fe(CN)₆] 10 mM, Triclosan comercial con punto de fusión 56-58°C.

Software NOVA (NOVA 1.10.1.9 software for Autolab instruments), electrodos serigrafiados de nanotubos de carbono de pared simple (Dropsens screen-printed electrodes DRP 110SWCNT), espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU). AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT, Purificador de proteínas Bio-RAD BioLogic LP, Celda electroquímica (DRP-CELL-70077)

2.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE PPG

2.2.1 Extracción: Para la extracción de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) se empleó un método similar al descrito por (Sakharov y col)⁴¹ con algunas modificaciones. Se recolectaron hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*) de los alrededores de la universidad Industrial de Santander (UIS), se lavaron con agua destilada, para despojarlas de la nervadura central, siendo cortadas en pequeños trozos y trituradas en un molino de granos. Al terminar la trituración, se pesaron 100 g del triturado y se dividieron en dos porciones iguales, a una porción se le añadió 200 mL de buffer de fosfatos 30mM a pH 8 y se incubo

⁴¹ LEON CASTILLO, John; *Et al.* Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.*2002. 163:1011–1019.

por seis horas a 200 rpm. Concluido el tiempo de homogenización, el extracto se filtró usando tela de algodón. El precipitado se descartó y al sobrenadante se le añadió la segunda porción del triturado; para realizar la segunda homogenización, con el fin de concentrar la peroxidasa se repitió el proceso descrito anteriormente. Por último, el extracto se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min y 4°C con el fin de eliminar los sólidos. Al finalizar la extracción, se midió la concentración de proteínas y la actividad enzimática del extracto. El cual se conservó a 4°C para ensayos posteriores.

2.2.2 Eliminación de pigmentos: Siguiendo la metodología de reparto bifásico⁴², sobre el extracto crudo obtenido, se adicionaron lentamente, polietilenglicol (PEG, peso molecular 15.000-20.000) al 14% p/v y sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ al 10% p/v bajo constante agitación magnética hasta disolver todos los sólidos, La mezcla se dejó en reposo en un embudo de decantación a 25°C hasta conseguir la separación de las dos fases en donde la capa clara contenía la peroxidasa y la capa oscura los pigmentos polifenólicos. Se midió concentración de proteínas y la actividad enzimática. El extracto enzimático se conservó a 4°C para experimentos posteriores.

2.2.3 Cromatografía por permeación en gel: La cromatografía se realizó empleando como fase estacionaria Sephadex S-75, y equilibrando la columna con una buffer TRIS-básica de 3mM a pH 8.3 con un flujo de 1ml/min, la elución se desarrolló con el mismo buffer de equilibrio. Las fracciones se recolectaron cada ocho minutos, eligiendo las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática. A cada una de estas fracciones se les determinó la concentración de proteínas, las

⁴² WATANABE, L. *Et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of royal palm tree (*Roystonea regia*) peroxidase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2007. 63:780–783.

fracciones con contenido de PPG se conservaron a 4°C para experimentos posteriores.

2.2.4 Concentración del extracto enzimático: Para concentrar el extracto enzimático se usó la técnica de ultrafiltración empleando amicones de 10 kDa. El extracto fue centrifugado durante 30 min a 5000 rpm y una temperatura de 4°C. Tanto al extracto enzimático concentrado como al filtrado se le midió la actividad enzimática para luego ser conservados a 4°C para experimentos posteriores.

2.2.5 Determinación de proteínas mediante el método de Bradford⁴³: La determinación de la concentración de proteínas en las diferentes etapas de semi-purificación de PPG se hizo por el método colorimétrico de Bradford, usando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón estándar. Mediante interpolación con una curva de calibrado hallando la concentración de proteínas con una absorbancia de 595 nm usando para las medidas un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz UV-1800 SHIMADZU. Cada ensayo se realizó por triplicado.

2.2.6 Determinación de actividad enzimática: La actividad catalítica de la PPG se determinó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción usando como sustrato guayacol y determinando la velocidad de aparición del producto, el guayacol posee un coeficiente de absorción molar de 5200 M⁻¹cm⁻¹.

La reacción se realizó de la siguiente forma: 10 µL de PPG + 2.5 mL de solución buffer fosfato de potasio 30 mM (pH 8) + 5 µL de guayacol + 4.4 mM de H₂O₂ y finalmente se cuantificó la variación de absorbancia a 470 nm. Una unidad de

⁴³ BRADFORD M. Marion. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72:248–254

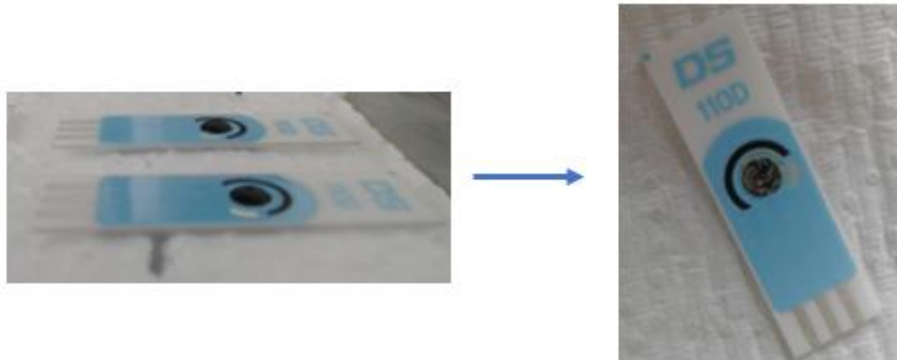
actividad peroxidasa (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de guayacol por minuto, bajo condiciones de pH 8.0 y temperatura de 25 °C. La actividad específica es expresada como unidades de actividad de peroxidasa por miligramo de proteína.

2.3 MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS CON EL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Para la respectiva modificación de electrodo de SWCNT se usó el hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC) como agente entrecruzante⁴⁴. Para ello se pesó 0.24 mg de EDC (PM 191.7) y se disolvió hasta alcanzar una concentración aproximada de 25mM. Se tomaron 4 μL de la mezcla anteriormente preparada y se depositarán sobre el electrodo de trabajo, posteriormente se agregó 6 μL de PPG para completar una cantidad de 10 μL en la superficie de trabajo. A continuación, el electrodo se dejó 4 horas en reposo a temperatura ambiente, para luego ser lavado con solución de buffer fosfato 30 mM (pH 8) removiendo así el subproducto de la reacción, quedando un enlace covalente ente los NTC y la PPG obteniendo así una modificación directa de la superficie del electrodo (Figura 9).

⁴⁴ XIN, Yu. *Et al.* Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of singles-wall nanotubes forest electrodes. *Electrochem commun.* 2003. 5:408-411.

Figura 9. Electrodo serigrafiado de SWCNT antes y después de ser modificados con la PPG



2.4 CARACTERIZACION POR METODOS ELECTROQUIMICOS

Para el registro de las mediciones electroquímicas se utilizó el equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT y el software NOVA (NOVA 1.10.1.9 software for Autolab instruments) para realizar el procesamiento de los datos. En la figura 10 se aprecia el montaje experimental, donde el electrodo permaneció en contacto constante con las soluciones electrolíticas durante las mediciones como se observa en la Figura 11.

Figura 10. Montaje experimental de las mediciones electroquímicas realizadas en el presente trabajo.



Figura 11. Inmersión del electrodo DRP 110SWCNT en la celda acrílica durante las mediciones electroquímicas.



2.4.1 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferricianuro de potasio como electrolito: El ferricianuro de potasio es un electrolito modelo en la caracterización de electrodos, gracias a la claridad de los voltamperogramas cíclicos (CVs) para la determinación del proceso redox del $\text{Fe}^{+2/+3}$ del ferricianuro. Por tanto, se preparó una solución 10mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ con 0,1 M KCl como electrolito, agregando 7 mL a la celda de reacción, los electrodos modificados fueron sumergidos en la celda y la medición se realizó a una velocidad de barrido 50 mV/s en un rango de potencial de 480 mV hasta -320 mV. Este rango

de potencial permitió observar definitivamente el proceso redox del $\text{Fe}^{+2/+3}$ del ferricianuro sobre la superficie del electrodo SWCNT.

2.4.2 Efecto de H_2O_2 y TCS sobre la respuesta enzimática del electrodo: Se utilizó la CV para la respectiva caracterización cualitativa de la reducción y oxidación bioelectrocatalítica del H_2O_2 y TCS respectivamente sobre la superficie del electrodo. La medición se realizó a una velocidad de barrido 50 mV/s y una ventana de potencial desde 800 mV hasta -1,0 V. La ventana de potencial utilizada se definió para evitar posibles interferencias del oxígeno.

Los electrodos sin modificar y previamente modificados fueron sumergidos en una solución buffer de fosfatos (PBS) 30 mM pH 8.0 y en presencia y ausencia de H_2O_2 5 mM y TCS 1mM. La solución de TCS fue preparada en NaOH 15 mM, y diluida en solución buffer fosfato pH 8.

2.4.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrogeno: Para determinar si la medición electroquímica realizada fue un proceso reversible o irreversible que involucro la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 por la enzima PPG, se registraron CVs a diferentes velocidades de barrido siguiendo una metodología similar a la empleada por Centeno *et al.*¹⁰, donde se realizó la medición en PBS 30 mM pH 8 en presencia de 5 mM H_2O_2 en un intervalo de velocidades desde 40 mVs^{-1} hasta 150 mVs^{-1} y una ventana de potencial desde 1,0 V hasta -1,0 V.

2.4.4 Influencia del pH: Ya caracterizado el pico de reducción del H_2O_2 se caracterizó el pico de oxidación generado por la molécula de TCS ya que la actividad biológica de las peroxidasas en solución e inmovilizadas sobre soportes sólidos son dependientes del pH. Para determinar la dependencia de la respuesta del electrodo modificado con PPG frente al pH se registraron VCs en diferentes soluciones buffer

en presencia de TCS 1 mM, a una velocidad de barrido 50 mV/s y una ventana potencial desde 800 mV hasta -1,0 V.

Para los experimentos de la influencia del pH se utilizaron las siguiente soluciones buffer: 10 mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), 10 mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0, 7.0 y 8.0) y 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0). Cada solución contenía H₂O₂ en concentración de 5 mM.

2.5 CRONOAMPEROMETRIA DE ELECTRODOS MODIFICADOS Y SIN MODIFICAR

Mediante cronoamperometría se estudió la respuesta amperométrica de los electrodos modificados en función del tiempo. Para el desarrollo de estos ensayos se mantuvo constante el potencial de reducción para el H₂O₂ (-800 mV) y el potencial de oxidación del TCS a +300 mV donde se observó que el módulo de la corriente tanto anódica como catódica aumenta, es decir, el número de electrones transferidos aumenta tanto en la reacción catódica como en la reacción anódica esta es la razón por la cual las curvas se interpretan en función del módulo de la corriente. Para esta medición se tuvo en cuenta que las adiciones de TCS tenían una concentración constante de H₂O₂ al 5 mM.

2.5.1 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de H₂O₂: La celda de reacción contenía 7 mL de buffer fosfato 30 mM (pH 8.0). Antes de cualquier adición de peróxido se estabilizo el sistema hasta alcanzar la línea base. Posteriormente a esta solución se adicionaron volúmenes sucesivos de peróxido de hidrógeno

aumentando la concentración en intervalos de 600 μM de H_2O_2 ⁴⁵. La adición de peróxido de hidrógeno se llevó a cabo a intervalos de 50 segundos.

2.5.2 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de TCS⁴⁶: La celda de reacción contenía buffer fosfato 30 mM y H_2O_2 5mM. Posteriormente a esta solución se le adicionaron volúmenes sucesivos de triclosan aumentando la concentración en intervalos de 10 μM de TCS. Cada adición de triclosan se realizó en intervalos de 50 segundos, finalizadas las adiciones de TCS, se compararon las gráficas de corriente contra tiempo.

2.6 DETERMINACION DE PARAMETROS ANALITICOS

Los parámetros analíticos fueron estudiados mediante la construcción de diferentes curvas de calibración de TCS.

2.6.1 Rango de linealidad: La determinación del rango lineal para los electrodos modificados se determinó mediante una curva de corriente-respuesta contra concentración de TCS utilizando las condiciones óptimas de pH y potencial redox. A partir de las gráficas se obtuvieron las ecuaciones de regresión lineal para la respuesta del biosensor hacia el H_2O_2 y TCS de la forma:

$$I(\mu A) = mC \left(\frac{\mu mol}{L} \right) + b(\mu A) \quad (1)$$

⁴⁵ RUO, Yuan. *Et al.* Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA-silver nano hybrids and PDDA-protected gold nanoparticles. *J Mol Catal B Enzym.* 2009. 56:215-220.

⁴⁶ PEMBERTON M, Roy y HART P, John. Electrochemical behaviour of triclosan at a screen-printed carbon electrode and its voltammetric determination in toothpaste and mouthrinse products. *Anal Chim Acta.* 1999. 390:107–115.

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

Para este método analítico, el intervalo lineal mostro la concentración más pequeña a la que se puede realizar la medición (LOQ) donde se obtuvieron resultados linealmente proporcionales entre la concentración del peróxido de hidrógeno, triclosan y su respuesta.

2.6.2 Sensibilidad: La determinación de la sensibilidad o medida de la capacidad del biosensor para diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de H_2O_2 y TCS, se determinaron mediante la curva de calibración (curva realizada en la caracterización del electrodo) donde, se tomó la pendiente como valor de sensibilidad de calibrado. Adicionalmente, se calculó la sensibilidad analítica γ .

$$\gamma = \frac{m}{s_s} \quad (2)$$

Donde m es la pendiente de la curva de calibración y s_s la desviación estándar de las medidas.

2.6.3 Límite de detección: Para la determinación de la concentración más baja de H_2O_2 y TCS que logro detectar el biosensor, se tuvo en cuenta la relación entre la magnitud de la señal analítica y las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco.

$$S_m = \overline{S_{bl}} + k s_{bl} \quad (3)$$

Donde S_m representa la mínima señal analítica distinguible, $\overline{S_{bl}}$ y s_{bl} representa la señal media del blanco y su desviación estándar respectivamente y k es una constante correspondiente al factor de confianza, para este caso $k=3^{35}$.

Finalmente, la pendiente del ítem y el valor de S_m se utilizaron para calcular el límite de detección C_m , cuya ecuación es:

$$C_m = \frac{S_m - \overline{S_{bl}}}{m} \quad (4)$$

2.7 IMPEDANCIA DE ELECTRODOS

Con el fin de complementar los análisis obtenidos mediante voltamperometría cíclica y cronoamperometría, se utilizó la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (IES, por sus siglas en inglés) para el análisis de la superficie del electrodo sin modificar y la superficie del electrodo modificado con PPG. Ésta técnica permite establecer los cambios en las propiedades de la superficie electródica, mediante una relación entre la impedancia real Z' versus la impedancia imaginaria Z'' , en gráficas denominadas Nyquist.

Para el presente procedimiento se dispuso el montaje de la **Error! Reference source not found.**, la celda de reacción contenía 7 mL de buffer fosfato 30 mM (pH 8.0), la medición comenzó definiendo el valor de potencial abierto (OCP) durante 30 minutos cada segundo para el electrodo sin modificar, ya definido este valor se dispuso a medir la impedancia en un rango de frecuencia de 10 kHz a 0.1 Hz. El procedimiento descrito anteriormente fue también implementado para el electrodo modificado con la PPG.

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

3.1 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE PPG

Como se enuncio en el apartado 2.2, el proceso de extracción y semipurificación de la PPG se realizó siguiendo cuatro etapas fundamentales: extracción, eliminación de pigmentos, cromatografía por permeación en gel y ultracentrifugación con amicones del extracto enzimático. A los extractos obtenidos al final de cada etapa se les midió la actividad enzimática y concentración de proteínas, con el fin de hallar los parámetros enzimáticos representados en la Tabla 2.

En la extracción se pesaron inicialmente 100 gramos de pasto guinea, el cual fue molido y puesto a homogeneizar en la solución de buffer fosfato pH 8, luego fue filtrado y llevado a la centrifuga a 5000 rpm durante 20 minutos y 4°C eliminando así los sólidos restantes que pasaron por el filtro, obteniendo 130 mL de extracto crudo antes de centrifugar y 120 mL luego de centrifugar (Figura 12).

Figura 12. Paso a paso del proceso de extracción de la PPG.



La eliminación del pigmento verde del extracto crudo se realizó mediante el método de reparto bifásico donde en un embudo de decantación se agregó el extracto crudo PEG y sulfato de amonio, formándose dos fases, una fase oscura y otra clara (Figura 13). Por su naturaleza química las enzimas se precipitaron en la fase acuosa de sal (fase clara) mientras que el polietilenglicol se encargó de atrapar los pigmentos, compuestos fenólicos y otros compuestos insolubles en la fase acuosa (fase oscura).

Figura 13. Eliminación de pigmentos por el método de reparto bifásico

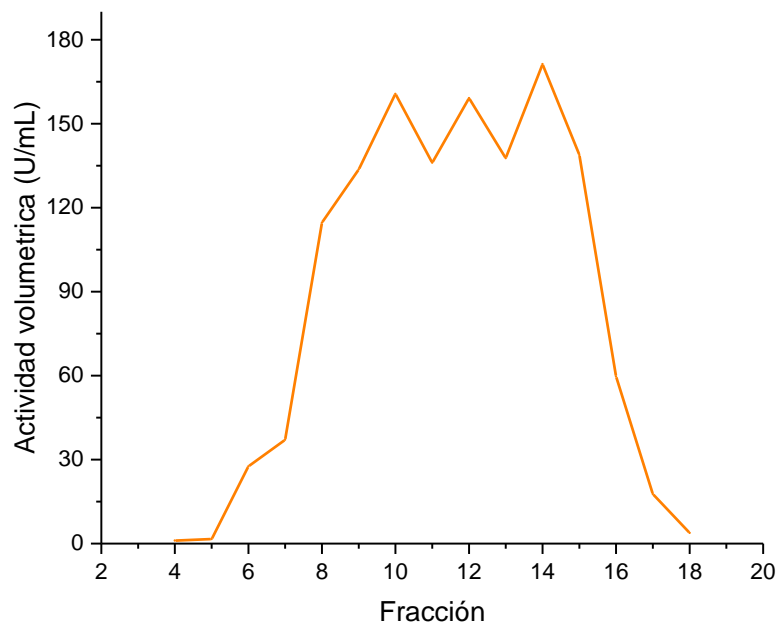


La actividad específica del extracto crudo fue de 198 U/mg. después del tratamiento del extracto con el PEG/sulfato de amonio se obtuvo una actividad específica de 444 U/mg. Este aumento en el valor de la actividad específica es probablemente debido a la eliminación y separación de moléculas interferentes de la enzima de interés⁴⁷.

⁴⁷ PLATIS, Dimitris y LABROU E, Nikolaos. Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. *Biotechnol J.* 2009. 4:1320-1327

Para la cromatografía por permeación en gel se empleó como fase estacionaria Sephadex S-75 y se equilibró la columna con una buffer TRIS-básica a pH 8.3 a un flujo de 1mL/min¹⁰. El uso de la Sephadex S-75 garantiza que moléculas superiores a los 80 kDa sean totalmente excluidas de las fracciones de interés. Teniendo en cuenta la actividad volumétrica en función de la fracción recolectada, como se observa en la Figura 14, las fracciones de la 8 a la 15 fueron las que presentaron los mayores valores de actividad enzimática. Por lo tanto, estas fracciones fueron recolectadas en un mismo recipiente para llevar a cabo la concentración del extracto enzimático mediante ultrafiltración empleando amicones de 10 kDa.

Figura 14. Actividad volumétrica de las fracciones recolectadas en la cromatografía por permeación en gel.



La actividad específica de las fracciones recolectadas después de la cromatografía fue de 249 U/mg, esta actividad aumento aún más luego de la ultrafiltración con un valor de 609 U/mg, mostrando un valor en el factor de purificación igual a 3. El extracto enzimático obtenido fue conservado a 4°C, este fue utilizado en la

modificación del electrodo serigrafiado de nanotubos de carbono para su respectiva detección de TCS.

Tabla 2. Etapas de purificación de la PPG

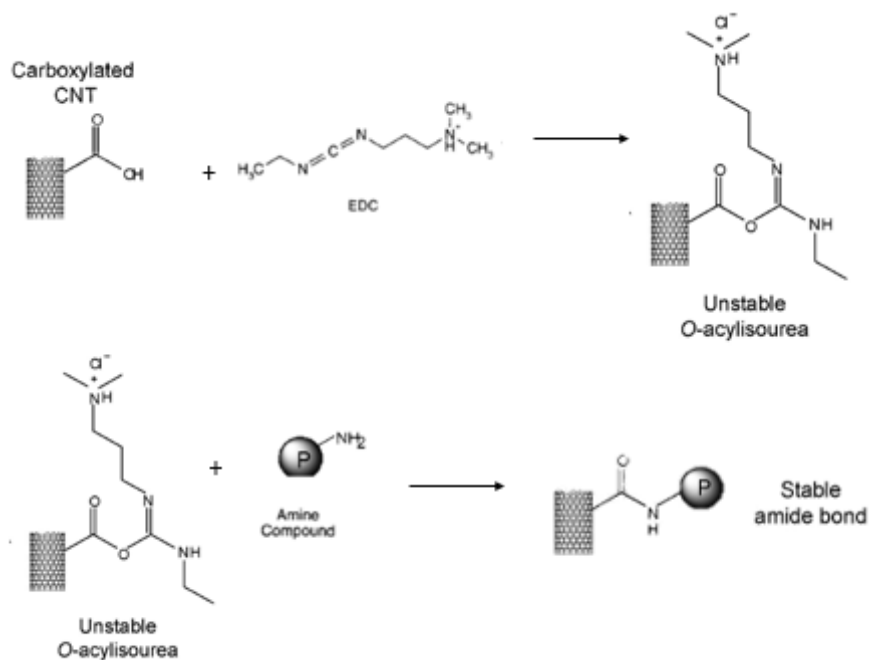
PROCEDIMIENTO	Volumen (mL)	Proteína (mg)	Actividad Volumétrica (U/mL)	Actividad total (U)	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracción	130	59,4	90,5	11765	198	1,0	100.0
Eliminación de pigmentos	59	26,2	197,63	11660	444	2,2	98
Cromatografía exclusión de tamaño	18	11,3	156,8	2822	249	1,2	24
Concentración amicones	9	4,0	272,5	2452	609	3	20

3.2. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS CON LA PEROXIDASA DE PASTO GUINEA

Para la construcción del biosensor se siguieron los pasos establecidos en el apartado 2.3, donde la superficie del electrodo serigrafiado de nanotubos de carbono fue modificada con la PPG usando como agente entrecruzante la EDC. La EDC es un compuesto usado para formar enlaces amida entre moléculas que contienen una amina primaria y un grupo carboxilato. En este caso particular la carbodiimida reacciona con el ácido carboxílico de los NTCs para formar una O-acilisourea la cual es un intermediario altamente reactivo. Esta especie activa entonces, puede reaccionar con un nucleófilo tal como las aminas primarias de la

PPG, para formar el enlace amida⁴⁸. Las reacciones para la respectiva formación del enlace amida durante la modificación del electrodo se ilustra en la Figura 15.

Figura 15. Posible Mecanismo de reacción de EDC con la superficie del electrodo serigrafiado de SWCNT y grupos aminos disponibles en la enzima⁴⁹ (Adaptado de la referencia 49)



Diferentes estudios de la modificación de los NTC con enzimas usando EDC como agente entrecruzante han sido reportados^{50,51,52}, donde Wang, Y. *et al*⁵³, mediante

⁴⁸ WILLIAMS, Andrew y IBRAHIM T. Ibrahim. A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). *J Am Chem Soc.* 1981. 103:7090-7095.

⁴⁹ GAO, Yuan y KYRATZIS Ilias. Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide a Critical Assessment. *Bioconjug Chem.* 2008. 19:1945-1950.

imágenes SEM, proponen que la inmovilización de las enzimas parece ser covalentes. Así para el presente trabajo, probablemente la EDC pudo catalizar el acoplamiento covalente del grupo carboxilo de la superficie de los SWCNT con los grupos amino de los aminoácidos disponibles de la PPG.

3.3. CARACTERIZACION POR METODOS ELECTROQUÍMICOS DEL ELECTRODO MODIFICADO Y SIN MODIFICAR

Para evaluar la modificación de la superficie del electrodo modificado y sin modificar se usó una solución 10mM de $K_4[Fe(CN)_6]$, la cual es ampliamente utilizada gracias a su comportamiento monoelectrónico reversible. De las voltametrías obtenidas, se puede extraer los valores característicos ΔE_p y I_{pc}/I_{pa} . De acuerdo con la literatura la diferencia entre el potencial de pico catódico y el pico anódico depende de la reversibilidad del proceso y el número de electrones involucrados en la reacción. En el caso específico de la reacción del ferro/ferri se transfiere un electrón, por lo tanto,

⁵⁰LEE, Yoon-Mee, *Et al.* Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties. *Biotechnol Lett.* 2006. 28:39-43.

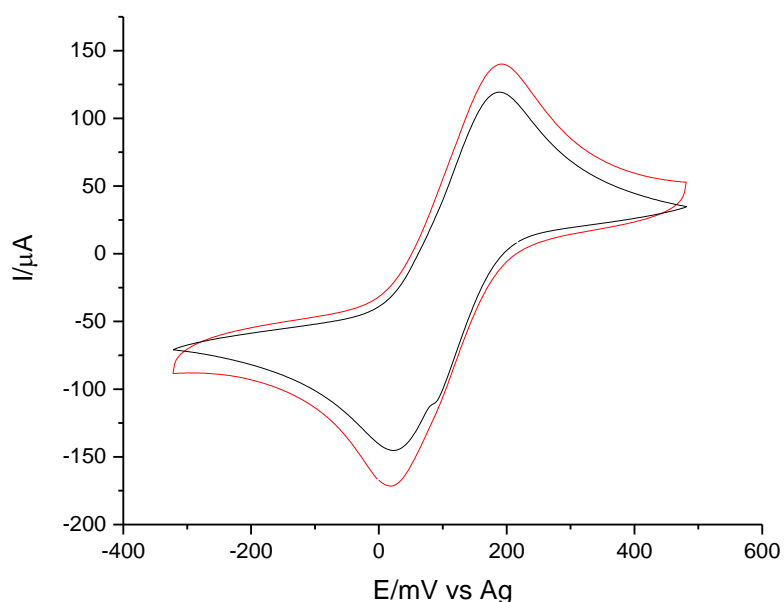
⁵¹ LUIS E. *Et al* (2010). Preparation and modification of carbon nanotubes electrodes by cold plasmas processes toward the preparation of amperometric biosensors. *Electrochim Acta.* 2010. 55:7916-7922.

⁵² YANG, Penghao. *Et al.* Sandwich-type amperometric immunosensor for cancer biomarker based on signal amplification strategy of multiple enzyme-linked antibodies as probes modified with carbon nanotubes and concanavalin A. *J Electroanal Chem.* 2014. 732:38-45.

⁵³ WANG, Yanfeng. *Et al.* A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2012. 90:62-67.

si el proceso es reversible ΔE_p debe ser igual a 59 mV y la relación de I_{pc}/I_{pa} debe ser igual a 1⁵⁴.

Figura 16. CV de electrodos modificados (rojo) y sin modificar (negro) en solución $K_4[Fe(CN)_6]$ 10 mM a una velocidad de barrido de 50 mV/s y en un rango de potencial de 480 mV hasta -320 mV.



En la Figura 16 se puede observar los picos característicos bien definidos con un valor de pico catódico $E_{pc} = 20$ mV y su pico anódico complementario $E_{pa} = 189$ mV para el electrodo modificado. Por su parte el electrodo sin modificar mostró un valor de y un $E_{pc} = 24$ mV y $E_{pa} = 184$ mV. Al calcular los ΔE se encontró que $\Delta E_p = 169$ mV para el electrodo modificado mientras que se obtuvo un valor de $\Delta E_p = 160$ mV para le electrodo sin modificar. En ambos casos, este valor es superior a 59 mV

⁵⁴ BARD J, Allen y FAULKNER R, Larry. *ELECTROCHEMICAL METHODS: Fundamentals and Applications*. second edition. texas at austin: john wiley & sons, inc. 2001

mostrando que el proceso no se comporta de forma reversible, por tanto es cuasi-reversible⁵⁴. Para la relación I_{pc}/I_{pa} se obtuvo un valor de 1.2 para ambos electrodos, desviándose del valor esperado para un proceso reversible, donde, el hecho de que el valor de la corriente de reducción sea mayor que la corriente de oxidación sugiere que la transferencia de electrones en la reacción catódica es mayor que en la reacción anódica, donde la cuasi-reversibilidad se podría explicar basados en que no todas las especies reducidas se vuelven a oxidar. Este comportamiento ha sido observado por Imam, H. *et al*⁵⁵. Donde en electrodos de carbón activado modificados con cascara de palma, obtuvieron un $\Delta E_p = 125$ mV y una relación I_{pc}/I_{pa} de 0.41 concluyendo que con $\Delta E_p > 59/n$ mV y I_{pc}/I_{pa} diferente a 1, el proceso se comportaba de forma cuasi-reversible. Además, en la Figura 16 se observa como el electrodo sin modificar presenta un valor de corriente y un área bajo la curva tanto de oxidación como de reducción menor que el electrodo modificado, demostrando que la modificación realizada con la PPG no solo permite a la superficie del electrodo aumentar la velocidad en la transferencia de electrones, sino que además aumenta la carga total⁵⁶.

Tabla 3. Valores de picos de oxidación y reducción para los electrodos estudiados

Electrodo	I_{ox} (mA)	I_{red} (mA)	I_{red}/I_{ox}	E_{ox}	E_{red}	ΔE
Sin modificar	119	-145	1.2	184	24	160
Modificado	140	-171	1.2	189	20	169

⁵⁵ IMAM MAAROF, Hawaiah; *Et al.* Electrochemical Properties and Electrode Reversibility Studies of Palm Shell Activated Carbon for Heavy Metal Removal. *Electrochim Acta*.2017. 249:96-103

⁵⁶ NADEEM ZAFAR, Muhammad. *Et al.* Characteristics of third-generation glucose biosensors based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase immobilized on commercially available screen-printed electrodes working under physiological conditions. *Anal Biochem*.2012. 425(1):36-42.

3.3.1 Efecto de H₂O₂ y TCS sobre la respuesta enzimática del electrodo: La respuesta del electrodo y su modificación con PPG fue analizada por medio de VCs en (PBS 30 mM pH 8) para el análisis tanto de las corrientes catódicas para la reducción de peróxido de hidrógeno como las corrientes anódicas para la oxidación del TCS. Las mediciones fueron realizadas a una velocidad de barrido de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V..

Figura 17. CVs de electrodos modificados (rojo) y electrodos sin modificar (negro) en solución buffer fosfato 30mM pH 8 (A) solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H₂O₂ 5 mM a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.

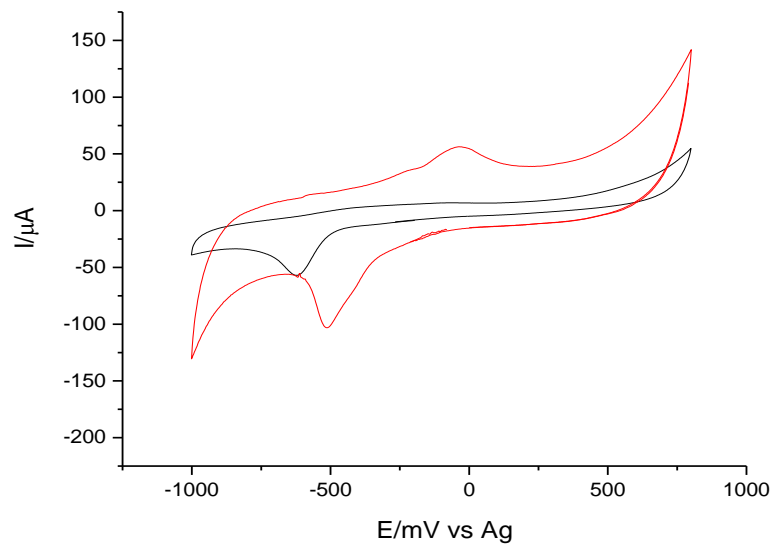


Figura 18. CVs de electrodos modificados (rojo) y electrodos sin modificar (negro) en solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H₂O₂ 5 mM a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.

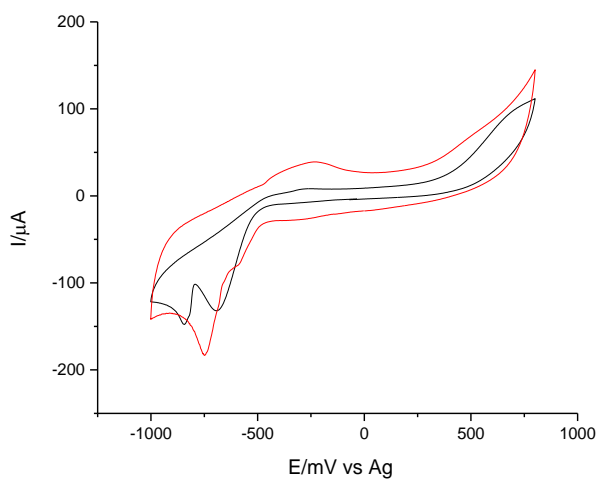
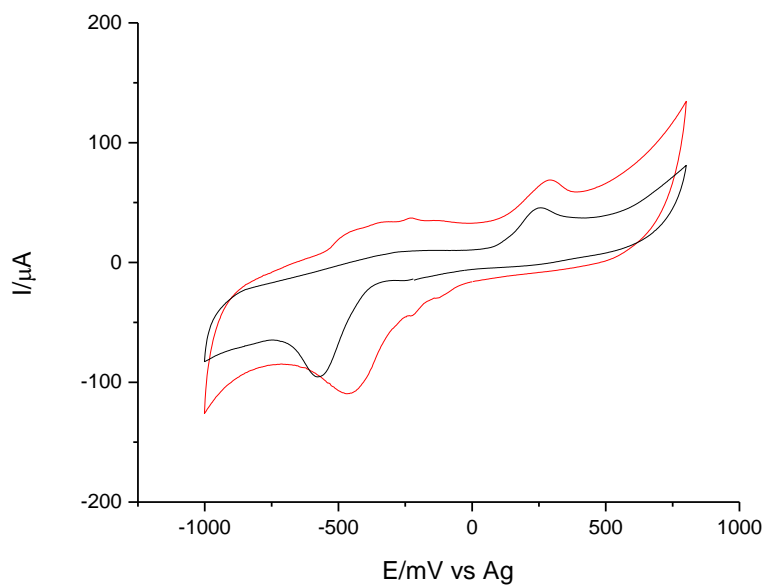


Figura 19. CVs de electrodos modificados (rojo) y electrodos sin modificar (negro) en solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H₂O₂ 5mM + TCS 1mM (C) a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.



Los CVs realizados en la Figura 17 muestran que el electrodo sin modificar tiene un pico característico hacia los -600 mV, esta señal es atribuida a los grupos funcionales propios del electrodo (ácido carboxílico). Por otro lado, para el electrodo modificado en el mismo sistema la figura cambia notablemente, evidenciando que la superficie del electrodo ha sido modificada con la PPG, teniendo un pico de reducción a -500 mV y un pico de oxidación aproximadamente a 55 mV. Este par redox es atribuido a la respuesta electrocatalítica del átomo de hierro presente en el grupo hemo de las POD^{57,52}. En la Figura 18 se observa que al agregar peróxido de hidrogeno a la solución de PBS tanto el electrodo sin modificar como el modificado tienen una respuesta, destacando que para el electrodo modificado el valor de corriente bajo la misma concentración de H₂O₂ aumenta 40 µA, siendo 0.4 veces más que el valor del electrodo sin modificar, por tanto el valor del potencial redox del peróxido por el electrodo modificado fue de -750 mV. A pesar de no ser el objetivo del trabajo éste resultado en principio podría permitir el uso de este sensor para desarrollar una herramienta bioanalítica para la detección del peróxido.

Existen varios estudios de detección de TCS usando electrodos en ausencia de enzimas. Por ejemplo, para el proceso de oxidación de la molécula de TCS, tal como evidencio Yang J *et al*⁶⁰ los grupos funcionales de los NTC son capaces de oxidar el TCS evidenciado mediante la formación de un par redox a un potencial de 690 mV en nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) inmovilizados en una superficie de carbón vidrioso. En este estudio para el electrodo SWCNT sin modificar se muestra un pico de oxidación alrededor de 250 mV. En la Figura 19 tanto el electrodo sin modificar como el modificado presentan un pico de oxidación. Para el caso del electrodo modificado con la PPG se desplaza hacia potenciales

⁵⁷ ZONG, Shuizhen; CAO, Yong. y JU, Huangxian. Amperometric Biosensor for Hydrogen Peroxide Based on Myoglobin Doped Multiwalled Carbon Nanotube Enhanced Grafted Collagen Matrix. *Anal Lett.* 2007. 40:1556-1568.

más positivos a un valor de 300 mV y aumentando el valor de corriente de 43 μ A a 70 μ A, siendo el valor de corriente con el electrodo modificado 0.65 veces mayor que el electrodo sin modificar.

Así pues, las gráficas mostradas anteriormente confirman que la modificación del electrodo por la PPG mejora de manera significativa los procesos que intervienen en la superficie del electrodo, en este caso la oxidación del TCS. Por lo tanto, el sistema electrodo/enzima en principio serviría para la detección de soluciones de diferente concentración de TCS.

De acuerdo con la Figura 20, el electrodo modificado dependiendo de las especies que se encuentren en el medio se comportara de manera diferente atendiendo a los diversos procesos biocatalíticos. Por tanto, se observa que para la curva de color negro simplemente se tiene el pico redox característico de las POD, mientras que en la curva roja se da una señal bien definida atribuida a la reducción electrocatalítica del H_2O_2 . Por otro lado, para la curva azul se evidencia una disminución significativa en la señal respecto al H_2O_2 , pero aparece una nueva señal, la cual es atribuida a la respuesta del TCS. Todas las respuestas bioelectrocatalíticas como lo enuncia Wang Y. *et al.*, quien inmovilizó HRP sobre electrodos de SWCNT y donde los sistemas evaluados tuvieron la misma tendencia que en el presente trabajo demuestran que, aparte de la efectiva inmovilización de la enzima, el método utilizado no comprometió su estructura terciaria ni su sitio activo⁵².

La estabilidad de la inmovilización realizada con la EDC aparte de los métodos reportados hasta ahora es confirmada usando voltamperometría cíclica bajo una misma velocidad de barrido por varios ciclos seguidos, con este proceso se estudió que tan fuerte es el enlace establecido sobre la superficie del electrodo, mostrando que después del segundo ciclo se logra estabilizar hasta el ciclo 10.

Figura 20. Comparación del comportamiento del electrodo modificado con la PPG en los diferentes sistemas planteados: PBS 30 mM pH 8 (negro), PBS 30 mM pH 8 + H₂O₂ 5mM (rojo), PBS 30mM pH 8 + H₂O₂ 5mM + TCS 1Mm (Azul) a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.

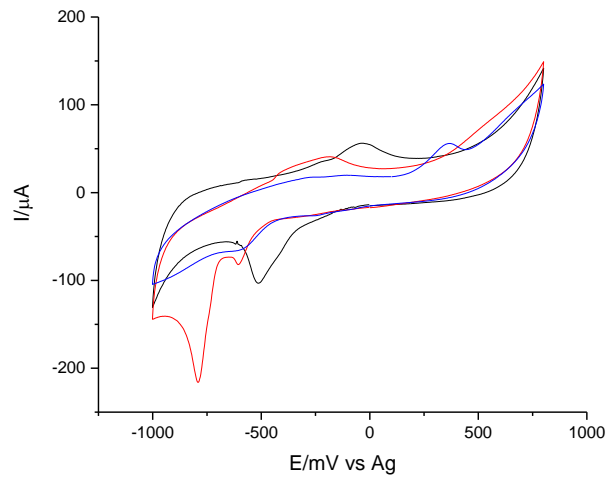
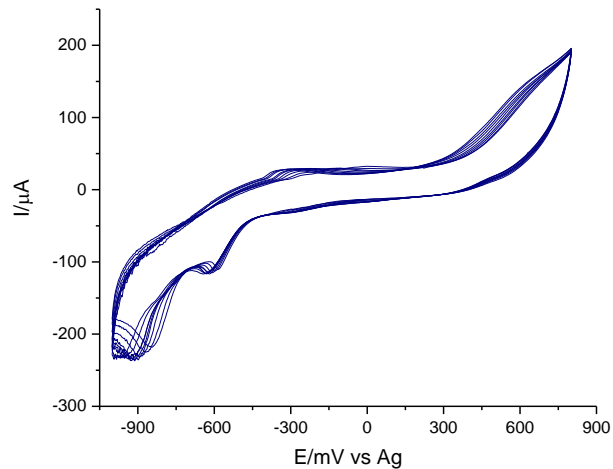


Figura 21. Voltamperogramas cíclicos de electrodo modificado con PPG en solución buffer fosfato 30mM pH 8 + H₂O₂ 5 mM a una velocidad de 50 mV/s y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V. (13 Ciclos)



3.3.2 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrogeno: A través de voltamperometría cíclica se estudió la

reversibilidad sobre la superficie del electrodo modificado con PPG en función de la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrogeno a diferentes velocidades de barrido. Este estudio se realizó en una solución Buffer fosfato 30 mM pH 8 con H_2O_2 5 mM.

Como se observa en la Figura 22 cuando se cambia la velocidad de barrido cambian los picos catódicos y anódico, esto quiere decir que a medida que se aumenta la velocidad de barrido también aumenta la corriente tanto del pico anódico como del pico catódico. Este comportamiento linealizado es evidenciado en la Figura 23 donde se grafican las corrientes en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, mostrando una linealidad desde una velocidad de 40 mV/s hasta 150 mV/s.

Figura 22. CVs de electrodos modificados con PPG en solución PBS 30 mM pH 8 con H_2O_2 5 mM a diferentes velocidades de barrido desde 40 mV/s hasta 150 mV/s y en un rango de potencial de 1.0 a -1.0 V

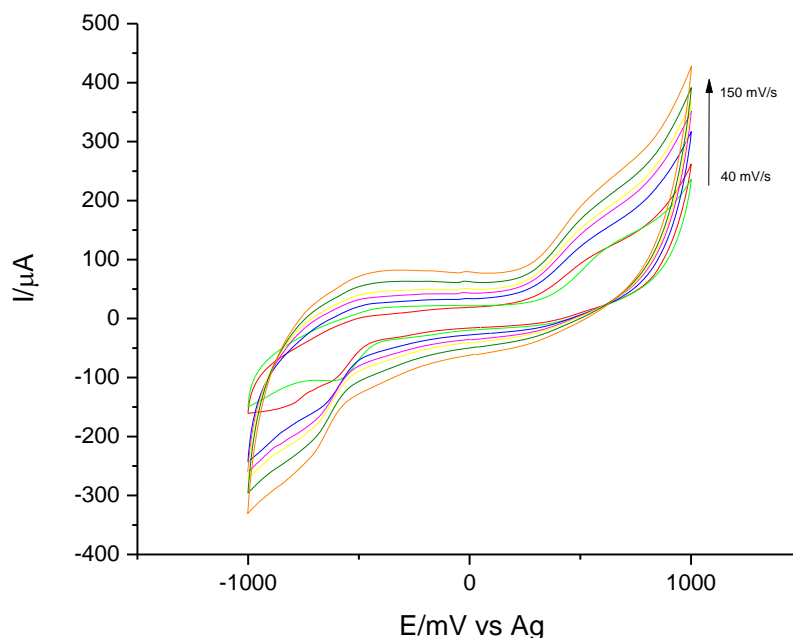
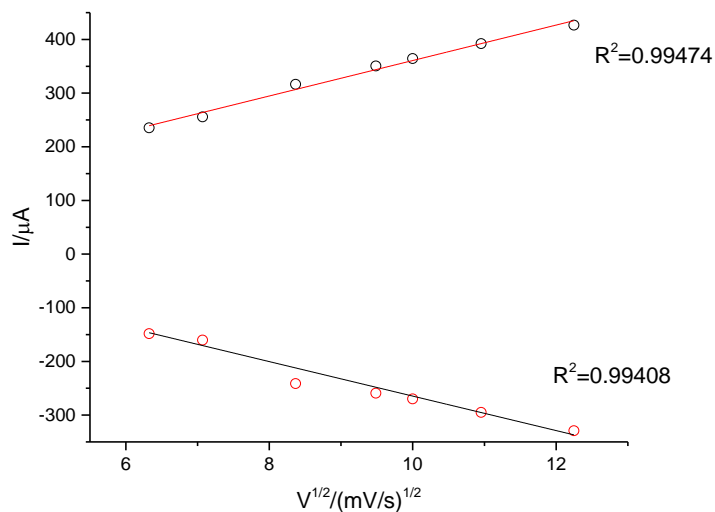
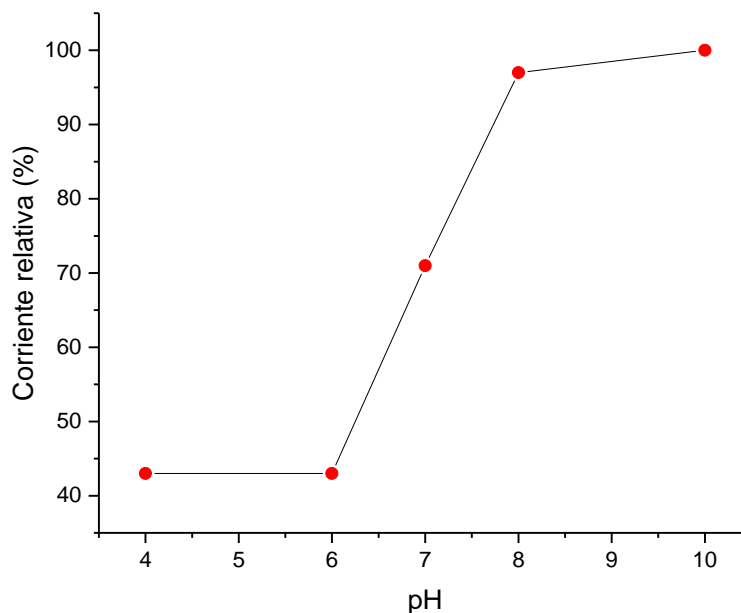


Figura 23. Diagrama de picos de corrientes catódicas (negro) y anódica (rojo) versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.



3.3.3 Influencia del pH: Uno de los factores que más afectan a la estabilidad catalítica de las enzimas es el pH, tal caso se presenta también para las POD, para este estudio se realizaron diferentes CVs en las soluciones tampón reportadas en el apartado 0 donde todos contenían H_2O_2 5mM y TCS 1mM. A una velocidad de 50 mV/s a y en un rango de potencial de 800 mV a -1.0 V.

Figura 24. Dependencia de la corriente relativa vs pH



La Figura 24 representa la dependencia de la respuesta del biosensor en función de pH, donde a pHs inferiores a 6 la corriente relativa que se toma teniendo en cuenta el máximo valor de corriente obtenido, disminuye aproximadamente un 60% mostrando que esta se inactiva ya sea por la estabilidad de cargas o por pérdida de su estructura terciaria. Después de pH 6 la actividad catalítica en presencia del TCS va aumentando hasta encontrar una diferencia de 3% en el valor de la corriente relativa entre el pH 8 y 10. Por tanto, se concluye que en este rango la enzima exhibe una mejor respuesta electrocatalítica mostrando un valor máximo a pH 10.

Se han estudiado otras superficies electrónicas para evaluar la influencia del pH en el pico de oxidación de la molécula de TCS. Por ejemplo Dai H *et al*⁵⁸ usaron

⁵⁸ DAI Hong, *et al.* Electrochemical detection of triclosan at a glassy carbon electrode modifies with carbon nanodots and chitosan. 2012. 80:362-367.

electrodos modificados con nanodots de carbono sintetizados (CND) y quitosano (CS) para la determinación de TCS. Se encontró que a pH 7.0 el electrodo mostró su mejor comportamiento evidenciado por la mayor intensidad en la señal de corriente. A mayores valores de pH se encontró un desplazamiento hacia potenciales más negativos lo que en principio se asoció a la disociación de la parte fenólica del TCS. En un estudio similar realizado por Roy M. *et al*⁴⁶., electrodos serigrafiados de carbono se evaluó el pico de oxidación del TCS en un rango de pH de 6 a 12, mostrando que a valores de pH superiores de 8 el máximo de corriente de oxidación era independiente del pH, mientras que a valores de pH menores a 8 se obtenían menores valores en la señal de corriente.

3.4. ANÁLISIS CRONOAMPEROMÉTRICO DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS

A través de la técnica de VC se pudo establecer un potencial de reducción para el H₂O₂ de – 800 mV y un potencial de oxidación para TCS de +300 mV. Una vez fijados estos valores, se procedió a estudiar la variación de la respuesta electroquímica en función del aumento de la concentración de los respectivos analitos a través de la técnica de cronoamperometría, obteniendo parámetros analíticos tales como: límite de detección, rango de linealidad y sensibilidad.

3.4.1 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de H₂O₂ Inicialmente se estabilizó la señal de la corriente a través del tiempo de una solución PBS 10 mM pH 8.0 hasta obtener la línea base. Seguidamente, se adicionó una concentración de peróxido conocida en un rango de concentración de 0.1 mM hasta 4 mM. Las adiciones de H₂O₂ se hicieron cada 50 segundos aumentando la concentración de H₂O₂ en 0.3 mM por adición.

En la Figura 25 se observa que en todo el rango de concentraciones evaluado (0.1 mM hasta 4 mM) la corriente de respuesta se incrementa proporcionalmente con las adiciones de H₂O₂, esta respuesta permite verificar que en este rango el electrodo es sensible a la bioelectroreducción catalítica del H₂O₂ por parte de la PPG. Se puede apreciar de la Figura 25 que el tiempo de respuesta a la adición de H₂O₂ es menor a 15 segundos mostrando una respuesta rápida que sería de gran utilidad para el desarrollo de biosensores comerciales. Además, se observa el incremento sucesivo de la corriente amperométrica luego de las adiciones de peróxido que permite la construcción de la curva de calibración del biosensor mostrada en la Figura 26 Para comprobar la detección del peróxido por parte de la PPG se llevó a cabo un experimento control que consistía en observar el comportamiento del electrodo sin modificar bajo las mismas condiciones experimentales que con el electrodo modificado, evidenciando que la corriente de respuesta con el electrodo sin modificar no se incrementa proporcionalmente con las adiciones de H₂O₂ como se observa con el electrodo modificado.

En la Figura 26 se observa la variación de la corriente en función de la concentración de H₂O₂, donde la curva posee un rango de linealidad de 0.1 mM a 3.3 mM, presentando un valor de coeficiente de correlación $R^2 = 0.993$, además, por medio de la ecuación 4 se calculó el límite de detección que para este caso fue de 99 μ M, con una sensibilidad definida por el valor de la pendiente de la recta siendo igual a 34.5 nA/M. este valor fue similar para la detección de peróxido con PPG que el reportado por Centeno D. *et al*¹⁰.

Figura 25. Cronoamperometría para adiciones sucesivas de H₂O₂ a un potencial de -800 mV en electrodo modificado (negro) y electrodo si modificar (rojo).

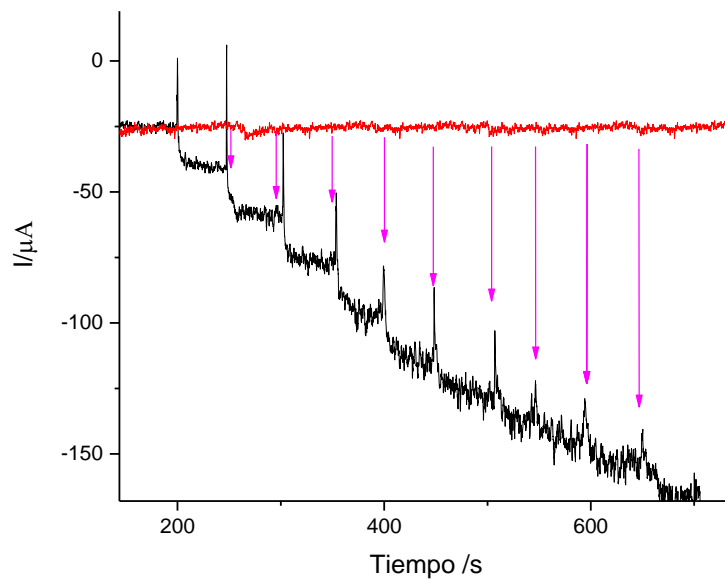
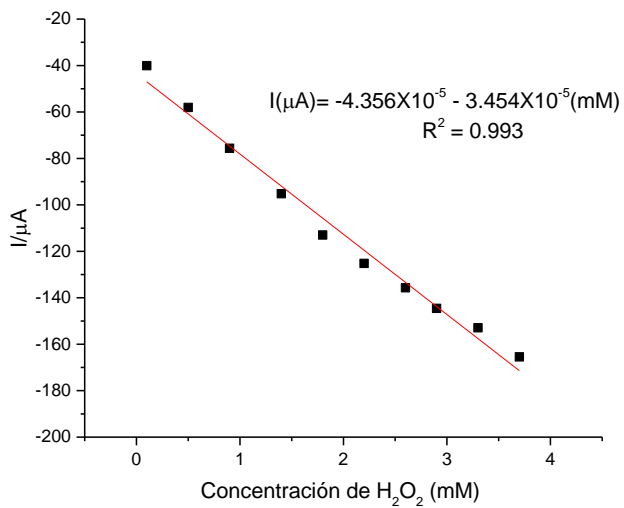


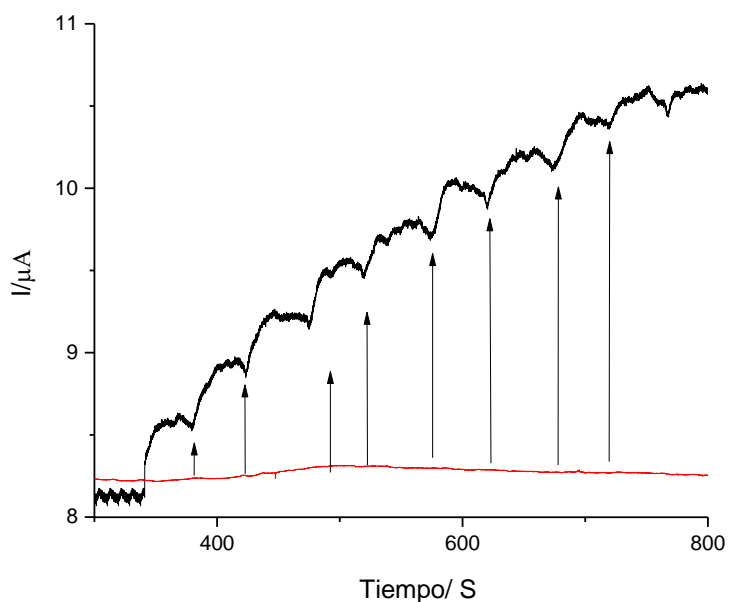
Figura 26. Curva de calibración obtenida con los datos de cronoamperometría para diferentes concentraciones de peróxido de hidrogeno.



3.4.2 Cronoamperometría a diferentes concentraciones de TCS: Para la cronoamperometría se dispuso la solución de PBS 10 mM pH 8 + H₂O₂ 5 mM bajo agitación magnética, se comenzó la medición hasta encontrar una línea base que indicó la concentración cero de TCS. Seguidamente, se adicionó una concentración de TCS conocida en un rango de concentración de 10 μM hasta 100 μM. Las adiciones de TCS se hicieron cada 50 segundos aumentando la concentración de TCS en 0.1 μM por adición.

Por medio de la Figura 27, donde la corriente de respuesta se incrementa proporcionalmente con las adiciones de TCS, de esta forma se procede a seleccionar los valores de corriente de oxidación del TCS y representarlos tal como se observa en la Figura 28.

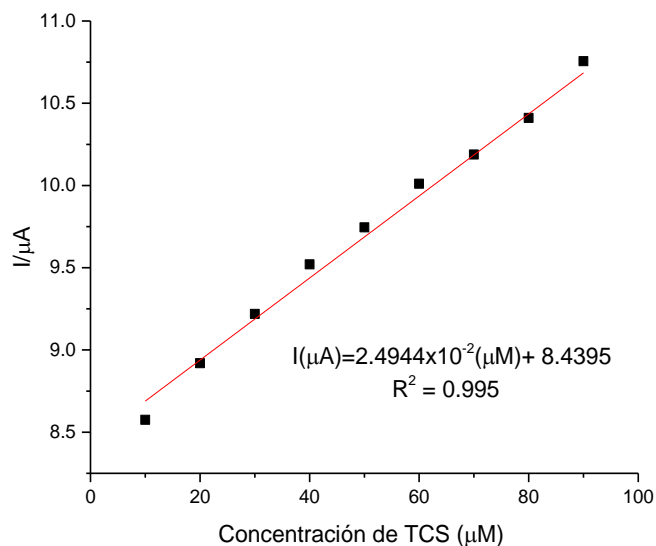
Figura 27. Cronoamperometría para adición sucesiva de soluciones de TCS a un potencial de 300 mV en electrodo modificado (negro) y electrodo si modificar (rojo).



La pendiente de la ecuación de la recta mostrada en la Figura 28 define el valor de sensibilidad el cual es 24.9 mA/M, también posee un valor de coeficiente de correlación $R^2 = 0.995$ el cual permite tener un rango de linealidad de 20 μM a 80

μM . El límite de detección definido en el apartado 0 fue de $3 \mu\text{M}$. Todos los valores presentados fueron calculados a través de las ecuaciones 1, 2 y 4 respectivamente.

Figura 28. Curva de calibración obtenida con los datos de cronoamperometría para TCS.



Para realizar las curvas de calibración de la respuesta catalítica a los diferentes analitos por parte del biosensor, la cronoamperometría es de amplio uso puesto que disminuye las variables de medición y las posibles señales de interferencia estableciendo un potencial fijo para la respuesta de corriente a las concentraciones del analito. Por medio de esta técnica se alcanzó un valor de límite de detección ($99 \mu\text{M}$) para el caso del peróxido de hidrogeno, también, se tiene que la PPG inmovilizada en una superficie de grafeno proporciona un LD del mismo orden de magnitud. Se reporta que otros electrodos a través de la inmovilización de nanopartículas y HRP consiguen LD del orden de los nanómolar⁵⁹.

⁵⁹ SILWANA, Bongiwe. *Et al.* Evaluation of a reduced graphene oxide antimony nanocomposite horseradish peroxidase biosensor matrix for hydrogen peroxide. *Procedia Technol.* 2017. 27:172-176.

Las mediciones de cronoamperometría realizadas para el peróxido de hidrogeno se hicieron con el objetivo de aprovechar todas las posibles cualidades del biosensor, debido a que el analito principal y de interés para el presente trabajo fue el TCS. Obteniendo de igual forma los parámetros analíticos para el H₂O₂ y el TCS. A continuación, se presentan diferentes trabajos que referencian algunos biosensores para la detección de H₂O₂.

Tabla 4. Diferentes tipos de biosensores para peróxido de hidrogeno.

Enzima/ electrodo	Forma de inmovilización	Detección	Características analíticas	Referencia
PPG/SPE Grafeno	Inmovilización de PPG en electrodos serigrafiados de grafeno	Amperométrica (E= -1 V vs Ag)	Rango lineal: 1x10 ⁻⁴ M – 3.5x10 ⁻³ M LD:1.04x10 ⁻⁴ M	1
HRP/rGOx bN Ps/GCE	Uso de nanopartículas de antimonio para la reducción de óxido de grafeno acoplado a un electrodo de carbón vítreo.	DPV (E= -0.15 V vs AG)	Rango lineal: 1 x10 ⁻⁹ M– 4x10 ⁻⁹ M LD: 2.8x10 ⁻⁹ M	40
PPG/SWCN T	Inmovilización de PPG a una superficie serigrafiada de nanotubos de carbono usando como intermediario EDC	Amperométrica (E= -0.8 V vs. Ag.)	Rango lineal: 1 x10 ⁻⁴ M- 3.5x10 ⁻³ M LD: 0.99x10 ⁻⁴ M	Este trabajo
HRP/ITOE	Uso de nanopartículas de oro dispersas en una película de quitosano y dendrímeros para la inmovilización	Amperométrica (E= -0.28 V vs NCE)	Rango lineal: 1.65x10 ⁻⁴ M – 1.5625x10 ⁻³ M LD: 2.0x10 ⁻⁴ M	59

Abreviaturas: SPE: electrodos serigrafados; GCE: electrodo de carbón vítreo; rGOSbPs: nanopartículas de antimonio para reducción de óxido de grafeno; ITOE: electrodo de óxido de indio estaño; LD: límite de detección; DPV: Voltamperometría de pulso diferencial.

A pesar de que las PODs han sido ampliamente estudiadas para la detección y remoción de TCS debido a los problemas ambientales y salubridad que ha venido reportando, estos estudios se centran en el uso de técnicas espectroscópicas como espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). Respecto a los análisis electroquímicos para la detección de TCS, es poca la información que se tiene y a nuestro conocimiento el presente trabajo es el primero en reportar el uso de una POD para la detección de TCS electroquímicamente, además cabe destacar el uso de la enzima PPG le proporciona al trabajo un aporte innovador, pues la enzima se extrae del pasto guinea (*panicum maximum*) el cual es catalogado como maleza, dando un valor agregado a esta planta y promoviendo el estudio de diferentes fuentes de POD en la biodiversidad Colombiana.

Algunos estudios para la detección electroquímica de TCS han reportado la modificación de superficie de carbón vítreo con nanotubos de pared múltiple y nano-zinc (ZnO-MWCNT) por suspensión en dimetilformamida (DMF) donde el ensamblaje permite obtener un rango de linealidad de 1.5 μM a 2mM con un límite de detección de 1.3 μM ³¹, en otro trabajo desarrollado por Tingxuan Wu *et al*⁶⁸ polimetilamonio es funcionalizado a grafeno por medio de nanopartículas de paladio mostrando un rango de linealidad de 9 nM a 20 μM con un límite de detección

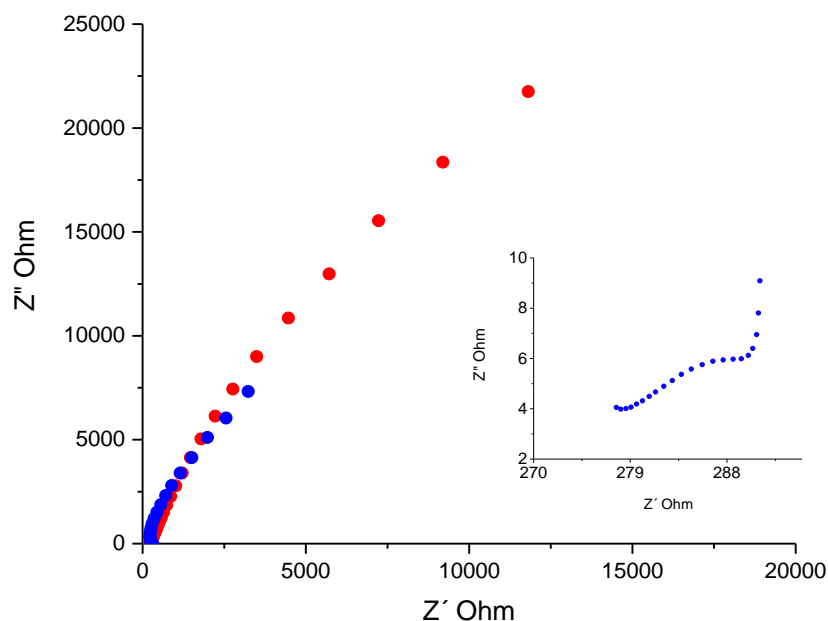
estimado de 3.5 nM, cabe destacar que todos los parámetros fueron definidos a través de voltamperometría de pulso diferencial (DPV).

3.5. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA DE ELECTRODOS

La espectroscopia por impedancia electroquímica es una técnica ampliamente utilizada para analizar los fenómenos superficiales, por medio del estudio de la variación de la corriente en función de la variación del potencial aplicado a diferentes frecuencias se puede analizar de forma discreta los diferentes fenómenos que ocurren a diferentes velocidades. la respuesta de los fenómenos rápidos se observa a altas frecuencias y los fenómenos lentos se observan a baja frecuencia, con el análisis de la impedancia obtenida se pueden obtener valores característicos como son la resistencia de la transferencia de carga y la capacitancia de la doble capa.

En la Figura 29 se presenta el diagrama de Nyquist donde se grafica en el eje x la impedancia real asociada con los procesos resistivos denominada como Z' y en el eje y la impedancia imaginaria asociada con los procesos capacitivos como Z'' . En ambos procesos se observa la misma tendencia en la región de bajas frecuencias, donde se presenta la formación parcial de un semicírculo, dando una proyección aproximada a 50000 Ohm para el electrodo modificado y 75000 Ohm para el electrodo sin modificar, este valor indica la resistencia a la transferencia de carga de cada electrodo, mostrando que la resistencia en la superficie del electrodo disminuye cuando este se modifica por la PPG, razón por la cual se atribuye tal respuesta a la modificación realizada. Como se observa en el inserto de la Figura 29 la respuesta del electrodo modificado cambia a altas frecuencias, observándose la formación de un segundo semicírculo acoplado al sistema, esta pequeña resistencia puede estar relacionada con el paso de electrones a través de la capa modificada.

Figura 29. Diagrama de Nyquist para electrodo sin modificar (rojo) y electrodo modificado con PPG (azul)



En el desarrollo del presente trabajo, se explora una nueva fuente de obtención de peroxidasa para la construcción de biosensores, la cual es el pasto de guinea. La PPG demostró ser una alternativa para la detección de TCS respecto a la HRP y la peroxidasa de haba de soja (SBP, por sus siglas en inglés) las cuales han sido usadas para tal fin²⁸. El método de anclaje de la enzima sobre la superficie de SWNTC fue a través del agente entrecruzante EDC el cual, permitió que la enzima mediante los diferentes métodos electroquímicos evaluados demostrase una alta estabilidad, donde para la VC a una misma velocidad de barrido alcanzo a permanecer constante hasta el ciclo 10 y a valores de pH superiores a 6 su actividad enzimática fue estable. El presente trabajo demuestra que es posible construir biosensores basados en peroxidasa provenientes de fuentes colombianas para la detección de TCS e impulsa el desarrollo de biosensores enzimáticos que aprovechen la biodiversidad en nuestro país.

4. CONCLUSIONES

- Se extrajo y se purificó de manera parcial la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) la cual presento una actividad específica de 609 U/mg y un rendimiento 20%.
- Se modificó la superficie de los electrodos serigrafiados DRP-110SWCNT con la peroxidasa de pasto de guinea (*Panicum maximum*) usando EDC como agente entrecruzante para garantizar la adecuada unión de la enzima a la superficie.
- Se caracterizó la superficie del electrodo modificado y sin modificar mediante voltamperometría cíclica en ferrocianuro de potasio, mostrando que la inmovilización de la enzima mejora significativamente las propiedades electroquímicas del electrodo.
- A través de la caracterización electroquímica se pudo definir que a valores de pH entre 8-10 la enzima mantiene una actividad catalítica estable, que favorece a la detección de TCS.

- Los valores del potencial redox para La reducción bioelectrocatalítica de H_2O_2 y oxidación de TCS fueron de -800 mV y 300 mV respectivamente.
- Los parámetros analíticos en la determinación de H_2O_2 , fueron: rango de linealidad de 100-3500 μM , límite de detección de 99 μM y una sensibilidad de 345 $\mu\text{A}/\text{mM}$.
- Los parámetros analíticos en la determinación de TCS fueron: rango de linealidad de 20-80 μM con un límite de detección de 3 μM y una sensibilidad de 24.9 mA/M .

5. RECOMENDACIONES

- Usar el método propuesto en este trabajo del electrodo modificado con PPG para la detección de TCS en muestras reales de residuos industriales y muestras comerciales de productos sanitarios que contengan TCS.
- Realizar un estudio de comparación bajo las mismas condiciones y usando el mismo electrodo con una enzima comercial para evaluar la PPG con valores concretos.
- Utilizar un electrodo donde se garantice homogeneidad en la superficie debido a que la tinta impresa de grafito con SWCNT es poco homogénea creando que el electrodo sea poco reproducible.

BIBLIOGRAFIA

AMEUR, Ouled Zied y HUSEIN, Maen M. Electrochemical behavior of potassium ferricyanide in aqueous and (w/o) macroemulsion systems in the presence of dispersed nickel nanoparticles. *Sep Sci Technol.* 2013. 48: 681-689.

ARROYO, Miguel. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharm.* 1998. 39:23-39.

BARD J, Allen y FAULKNER R, Larry. *ELECTROCHEMICAL METHODS: Fundamentals and Applications.* second edition. texas at austin: john wiley & sons, inc. 2001

BARSAN M. Madalina; GHICA M. Emilia y BRETT A. Christopher. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer / carbon nanotube modified electrodes: A review. *Anal Chim Acta.* 2015. 881:1-23.

BAYKAL, Abdulhadi, *et al.* A novel amperometric phenol biosensor based on immobilized HRP on poly (glycidylmethacrylate) -grafted iron oxide nanoparticles for the determination of phenol derivatives. *Sensors Actuators B Chem.* 2012. 173:396-405.

BRADFORD M. Marion. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72:248–254.

CASTILLO, John Jairo; VILLAMIZAR N, Erika y RIOS A, Carlos. A Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Immobilization of the Highly Stable Royal Palm Tree Peroxidase (*Roystonea regia*) with Chitosan and Glutaraldehyde on Screen-printed Graphene Electrodes. *J Mex Chem Soc.* 2016. 60:135-140.

CENTENO, Diana Alejandra; SOLANO, Xuxan y CASTILLO, John Jairo. A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry*. 2017. 116:33-38.

CHEKIN, Fereshteh; GORTON, Lo y TAPSOBEA, Issa. Direct and mediated electrochemistry of peroxidase and its electrocatalysis on a variety of screen-printed carbon electrodes: amperometric hydrogen peroxide and phenols biosensor. *Anal bioanalytical Chem*. 2015. 439-446.

CHRISTIAN, Leuenberger; LIGOCKI P, Mary y PANKOW F, James. Trace Organic Compounds in Rain. 4. Identities, Concentrations, and Scavenging Mechanisms for Phenols in Urban Air and Rain. *Environ Sci Technol*. 1985, 19(11):1053-1058.

CLAY S, A; y KOSKINEN C, William. Factors Affecting Atrazine Fate in North Central U.S. Soils. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 151st ed. New York, NY: Springer; 1997. 117-165.

DAI Hong, *et al*. Electrochemical detection of triclosan at a glassy carbon electrode modifies with carbon nanodots and chitosan. 2012. 80:362-367.

DANN B, Andrea y HONTELA, Alice. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*. 2011. 285-311.

DOMINGO, Concepcion y SANTORO Gonzalo. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *ÓPTICA PURA Y Aplicada*. 2007. 1136:175-186.

DONALD F, Goerlitz. *et al*. Migration of Wood-Preserving Chemicals in Contaminated Groundwater in a Sand Aquifer at Pensacola, Florida. *Environ Sci Technol*. 1985, 19:955-961.

DOURADO, Fernando. *et al.* Purification , structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of *Prunus dulcis* seeds. *Carbohydr Res.* 2004. 339:2555-2566.

DUARTE VASQUEZ, Miguel A. Broccoli Processing Wastes as a Source of Peroxidase. *J Agric Food Chem.* 2007. 55:10396-10404.

FARZANA, S; GANESH, V. y BERCHMANS, Sheela. A Sensing Platform for Direct Electron Transfer Study of Horseradish Peroxidase. *J Electrochem Soc.* 2013. 160:573-580.

FLOCK, Colin; BASSI, Amarjeet y GIJZEN, Mark. Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. *J Chem Technol Biotechnol.*1999. 74:303-309.

FOGG G, Arnold y WANG, Joseph. Terminology and convention for electrochemical stripping analysis (Technical Report). *Pure Appl Chem.* 1999. 71: 891-897.

GAO, Yuan y KYRATZIS Ilias. Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide a Critical Assessment. *Bioconjug Chem.* 2008. 19:1945-1950.

HUANG, Chu-Long; ABASS K, Olusegun y YU, Chang-Ping. Triclosan: A review on systematic risk assessment and control from the perspective of substance flow analysis. *Sci Total Environ.* 2016. 566-567:771-785.

IGARASHI M, Toshio, *Et al.* Dioxin may promote inflammation-related development of endometriosis. 2008. 89:1287-1298.

IMAM MAAROF, Hawaiah; *Et al.* Electrochemical Properties and Electrode Reversibility Studies of Palm Shell Activated Carbon for Heavy Metal Removal. *Electrochim Acta*.2017. 249:96-103.

JINQUAN, Yang; *Et al.* Electrochemical Sensor for Rapid Detection of Triclosan Using a Multiwall Carbon Nanotube Film. *J Agric Food Chem*.2009. 57:9403-9407.

LARIBI, Bochra; *Et al.* Coriander (*Coriandrum sativum* L) and its bioactive constituents. *Fitoterapia*. 2015. 103:9-26.

LEE, Yoon-Mee, *Et al.* Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties. *Biotechnol Lett*. 2006. 28:39-43.

LEON CASTILLO, John; *Et al.* Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci*.2002. 163:1011–1019.

LI Jianhua; *Et al.* Removal of triclosan via peroxidases-mediated reactions in water: Reaction kinetics, products and detoxification. *J Hazard Mater*. 2016. 310:152-160.

LONG L, Gary. y WINEFORDNER J, D. Limit of Detection a closer look at the UIPAC definition. *Anal Chem*. 1983. 55(7):712-714.

LUAIS E. *Et al* (2010). Preparation and modification of carbon nanotubes electrodes by cold plasmas processes toward the preparation of amperometric biosensors. *Electrochim Acta*. 2010. 55:7916-7922.

LYONS C., Champ y LELAND C, Clark Jr. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Anal New York Acad Sci*. 1962. 102:29-45.

MARQUES, Ines, *Et al.* Detection of traces of triclosan in water. *Appl Surf Sci J.* 2017. 421:142-147.

MORALES PIRATOBA, Ulises; CAMARGO MARIÑO, Álvaro y OLAYA FLOREZ, John Jairo. Electrochemical impedance interpretation of typical diagrams with equivalent circuits. *dyna.* 2010. 77:69-75.

MOYO, Mambo; FLORENCE R, Lehutso y OKONKWO O, Jonathan. Improved electro-oxidation of triclosan at nano-zinc oxide-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Sensors Actuators B Chem.* 2015; 209:898-905.

NADEEM ZAFAR, Muhammad. *Et al.* Characteristics of third-generation glucose biosensors based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase immobilized on commercially available screen-printed electrodes working under physiological conditions. *Anal Biochem.* 2012. 425(1):36-42.

OIKARI, A. y ÅNÄS E.B. Chlorinated Phenolics and Their Conjugates in the Bile of Trout (*Salmo gairdneri*) Exposed to Contaminated Waters. *Environ Contam Toxicol.* 1985. 35:802-809.

PEMBERTON M, Roy y HART P, John. Electrochemical behaviour of triclosan at a screen-printed carbon electrode and its voltammetric determination in toothpaste and mouthrinse products. *Anal Chim Acta.* 1999. 390:107–115.

PENG, Xing. *Et al.* Synchronous extraction of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* fermentation broth. 2014. *Sep Purif Technol.* 123:164-170.

PEÑA ÁLVAREZ, Araceli y CASTILLO ALANÍS, Alejandra. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por

microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *TIP Rev Espec en Ciencias Quim.* 2015. 18(1):29-42.

PLATIS, Dimitris y LABROU E, Nikolaos. Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. *Biotechnol J.* 2009. 4:1320-1327.

RECHNITZ A, Garry. Biosensors into the 1990s. *Electoanalysis.* 1991. 3:73-76.

RODRICKS V, Joseph. *Et al.* Triclosan: A critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products. 2010. 40:422-484.

RUO, Yuan. *Et al.* Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA-silver nanohybrids and PDDA-protected gold nanoparticles. *J Mol Catal B Enzym.* 2009. 56:215-220.

SCHWEIZER P, Herbert. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. 2001. 202.

SILWANA, Bongiwe. *Et al.* Evaluation of a reduced graphene oxide antimony nanocomposite horseradish peroxidase biosensor matrix for hydrogen peroxide. *Procedia Technol.* 2017. 27:172-176.

STEEVENSZ, Aaron. *Et al.* A simple lab-scale extraction of soybean hull peroxidase shows wide variation among cultivars. *Ind Crop Prod.* 2013. 48:13-18.

THEVENOT R, Daniel. *Et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron.* 2001. 16:121-131.

TOMASKO David. *Et al.* Human Impacts on Seagrasses: Eutrophication, Sedimentation and contamination. *seagrasses: biology, ecology and conservation*: 2006. 567-593.

TRUJILLO FERNANDEZ, Pablo J. *Et al.* Peroxidase Activity and Superficial Scald Development in Apple Fruit. *J Agric Food Chem.* 2003. 51:7182-7186.

TUAH, K; BUADU, K y FIAGOME G, K. Studies on the nutritive value of giant star and guinea grass forages in the Ashanti forest belt of Ghana. *Ghana Jnl agric Sci.* 1979. 111(12):103-111.

VEITCH C, Nigel. Horseradish peroxidase : a modern view of a classic enzyme. 2004. 65:249-259.

VETAL D, Mangesh; y RATHOD K, Virendra. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). *Food Bioprod Process.* 2014. 94:284-289.

WANG, Yanfeng. *Et al.* A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2012. 90:62-67.

WATANABE, L. *Et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of royal palm tree (*Roystonea regia*) peroxidase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2007. 63:780–783.

WILLIAMS, Andrew y IBRAHIM T. Ibrahim. A mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). *J Am Chem Soc.* 1981. 103:7090-7095.

XIN, Yu. *Et al.* Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall nanotubes forest electrodes. *Electrochem Commun.* 2003. 5:408-411.

YANG, Penghao. *Et al.* Sandwich-type amperometric immunosensor for cancer biomarker based on signal amplification strategy of multiple enzyme-linked antibodies as probes modified with carbon nanotubes and concanavalin A. *J Electroanal Chem.* 2014. 732:38-45.

ZONG, Shuizhen; CAO, Yong. y JU, Huangxian. Amperometric Biosensor for Hydrogen Peroxide Based on Myoglobin Doped Multiwalled Carbon Nanotube Enhanced Grafted Collagen Matrix. *Anal Lett.* 2007. 40:1556-1568.

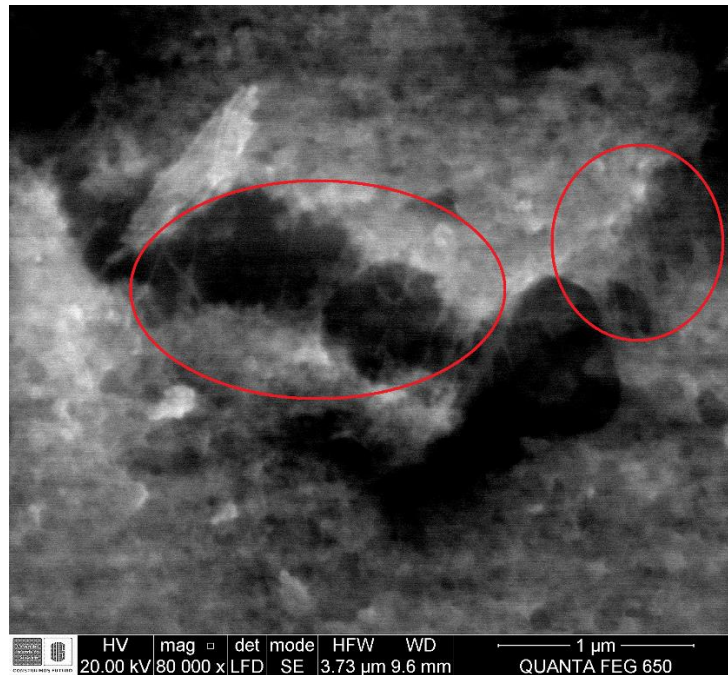
ANEXOS

Como electrodos de trabajo se utilizaron electrodos descartables, de referencia DRP-110SWCNT (electrodos serigrafiados de nanotubo de carbono de pared simple). Antes de Cualquier estudio electroquímico la superficie de estos electrodos fue caracterizada mediante espectroscopia Raman, microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopia de energía de dispersión de rayos X (EDAX).

el equipo utilizado para la caracterización SEM y EDAX fue mediante Microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 650 FEG ambiental (ESEM), con detector SE de electrones secundarios para modo de alto vacío y detector BSED de electrones retrodispersados para modo de alto y bajo vacío para las imágenes SEM, mientras que para los análisis composicionales se usó el detector EDAX APOLO X (resolución de 126.1 eV (en. Mn K α)) para análisis EDS. A través de las imágenes obtenidas por SEM, se observa la complejidad de la superficie de estudio y se evidencia la existencia de nanotubos de carbono los cuales se encuentran demarcados de rojo en el Anexo A, estos NTC se encuentran ordenados de diferentes formas en la superficie con un diámetro aproximado entre los 20 a 40 nm.

Por medio de EDAX se observa la pureza de la superficie, esperando que las señales de carbono y oxígeno sean las mayoritarias, debido a que los nanotubos se encontraban funcionalizados con grupos carbonilo. Para la toma del EDAX se definieron dos zonas referentes, una zona oscura y otra clara, debido a que estas se asociaron a la diferencia composicional, donde zonas más brillantes son asociadas a áreas con mayor conductividad que las zonas oscuras.

Anexo A. Imagen SEM de superficie de nanotubos de carbono en estudio.



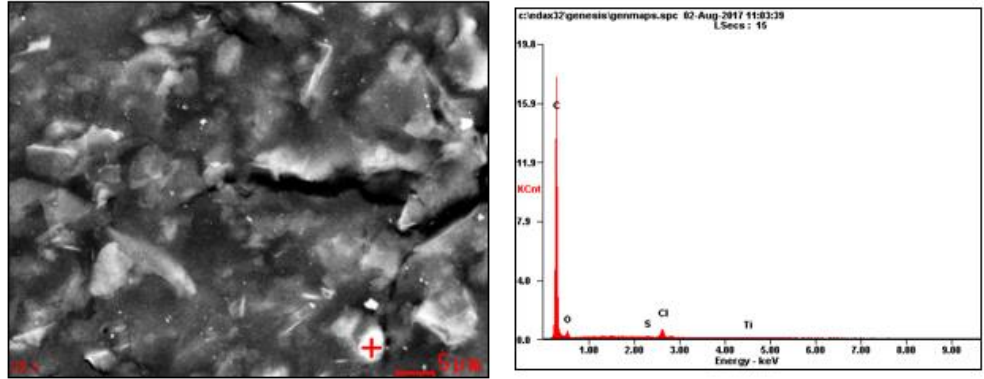
Tanto el porcentaje composicional para la superficie en zonas oscuras como claras de carbono y oxígeno suman aproximadamente un 97% mientras que el 3 % restante mayoritariamente se les atribuye a trazas de Cl. A partir del Anexo B y su respectivo análisis composicional se confina que la superficie usada para el desarrollo del presente trabajo posee NTC con un alto porcentaje de pureza.

Los análisis de RAMAN se tomaron en el laboratorio de espectroscopia en el parque tecnológico de Guatiguara con el equipo LabRAM HR Evolution, las mediciones fueron tomadas con un láser de 532 nm. Los resultados de espectroscopia RAMAN se presentan en el Anexo C donde se pudo asociar el tipo de NTC a través de su patrón de espectro a SWCNT⁶⁰, los cuales presentan hacia los 1600 cm⁻¹ una banda intensa, correspondiente a la vibración fundamental de elongación tangencial denominada G y otra banda más débil hacia los 2650 denominada G' correspondiente a un sobretono, banda que proporciona información sobre la

conducción de NTC. La banda D, no es permitida en RAMAN en caso de una lámina perfecta de grafito, pero la presencia de diferentes defectos y vacantes permite que esta simetría se pierda y pueda ser observada, la intensidad de esta banda da la medida de la simetría conformacional, que para el caso de la superficie estudiada esta banda indica la presencia de defectos en las paredes del nanotubo, indicando que tiene pocas deformaciones pues D posee una intensidad pequeña.

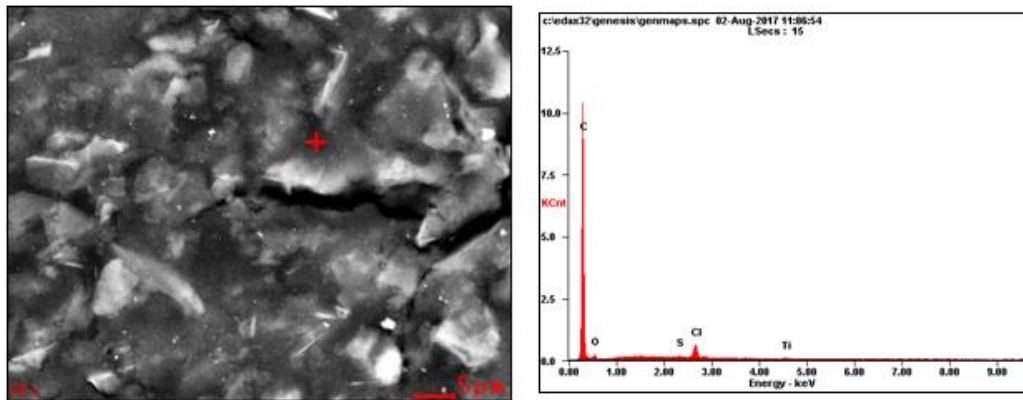
Anexo B. EDAX para zona brillante (A) zona oscura (B)

A



<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>CK</i>	90.67	93.83
<i>OK</i>	06.84	05.31
<i>SK</i>	00.19	00.07
<i>ClK</i>	02.04	00.72
<i>TiK</i>	00.26	00.07
<i>Matrix</i>	Correction	ZAF

B



<i>Element</i>	<i>Wt%</i>	<i>At%</i>
<i>CK</i>	92.04	95.40
<i>OK</i>	04.28	03.33
<i>SK</i>	00.25	00.10
<i>ClK</i>	03.03	01.06
<i>TiK</i>	00.40	00.10
<i>Matrix</i>	Correction	ZAF

Anexo C. Espectro Raman de SWCNT

