

**DESARROLLO Y EVALUACION DE UN PROTOTIPO DE BIOSENSOR  
ELECTROQUÍMICO USANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE  
NANOPARTICULAS DE ORO Y DE GRAFENO PARA LA DETECCIÓN DE  
MIELOPEROXIDASA EN SALIVA COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD  
PERIODONTAL**

**MARIA CAMILA VALDIVIESO RODRIGUEZ  
LUDY ROSSANA ORTIZ ZAMBRANO**

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
Abril de 2024**

**DESARROLLO Y EVALUACION DE UN PROTOTIPO DE BIOSENSOR  
ELECTROQUÍMICO USANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE NANOTUBOS  
DE ORO Y GRAFENO PARA LA DETECCIÓN DE MIELOPEROXIDASA EN SALIVA  
COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD PERIODONTAL**

**MARIA CAMILA VALDIVIESO RODRIGUEZ  
LUDY ROSSANA ORTIZ ZAMBRANO**

**Director  
John Jairo Castillo León  
Doctor en Química**

**Co-director  
Hermínsul de Jesús Cano Calle  
Doctor en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
Abril de 2024**

A quienes me han dado su amor  
y mostrado su apoyo.

*Camila*

A lo confuso, a lo incierto  
a tanto sin sentido,  
que me ha sabido motivar;  
pero también,  
a la certeza de que siempre hay algo más.

*Ludy*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme el consuelo para aferrarme a la vida  
en los momentos de desesperanza.

A mi familia, por apoyarme y darme todas las herramientas  
para crecer como una persona íntegra y valiosa.

A Irma, Martha, Diana, Alex y Majo, quienes me han amado  
incansablemente. Mi mayor motivación y la razón  
por la cual nunca he dejado de intentarlo.

A mis mejores amigos, Angie, Andrés, Sara, Mario, Gato  
por siempre estar ahí y ser mi apoyo en  
los momentos de debilidad.

Al profesor John y al profesor Herminsul, por enseñarnos  
y orientarnos con paciencia y dedicación.

A mi compañera Ludy, por su esfuerzo y compromiso  
por sacar adelante este proyecto

A la profesional Martha Cecilia Molina, por darnos su  
confianza y brindarnos un espacio cómodo en el  
laboratorio para desarrollar los experimentos

A la dra. Silvia Rizo, por darnos de su tiempo y ser  
un gran apoyo en la recolección de muestras.

*Camila*

A mi madre, por ser causa y motivo de que yo esté aquí,  
en todos los sentidos.

A mi padre, por el cuidado y el soporte,  
más importante, por las risas.

A Wen, Isa y Marcos,  
porque nuestras semillas crecieron en la misma tierra,  
nos refugiamos en el mismo hogar,  
y así aprendimos a ser.

A gau, pela força que sua fragilidade dá.  
Por fazer do amor uma ponte  
e me convidar para atravessar.  
Por todo lo sentido,  
y lo que falta por sentir.

A María Piamonte, por todo lo vivido desde antes de nacer.

A mi compañera Camila, por el esfuerzo y el aguante,  
para que este proyecto se convirtiera en realidad.

*Ludy*

# CONTENIDO

RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	14
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO DE REFERENCIA.....	19
2. MARCO TEÓRICO.....	23
2.1. Enfermedad periodontal.....	23
2.2. Enfermedades periodontales y su relación con enfermedades sistémicas..	24
2.2.1. EP y su relación con la diabetes .....	24
2.2.2. EP y su relación con enfermedades cardiovasculares .....	25
2.3. Métodos de diagnóstico de una enfermedad periodontal .....	28
2.4. Mieloperoxidasa (MPO) .....	33
2.5. Mieloperoxidasa como biomarcador de EP. ....	36
2.6. Peroxidasa Salival .....	38
2.7. Electrodo serigrafados.....	39
2.8. Voltamperometría cíclica.....	42
2.9. Análisis de componentes principales .....	44
3. METODOLOGÍA .....	45
3.1. Reactivos.....	45
3.2. Medición de la actividad enzimática de MPO .....	45
3.3. Montaje experimental para mediciones electroquímicas.....	46
3.4. Caracterización electroquímica de los electrodos serigrafados .....	47
3.5. Reducción bioelectrocatalítica del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	48
3.6. Estudio del efecto de la velocidad de barrido sobre la bioelectroreducción del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48
3.7. Obtención de muestras de saliva .....	48
3.8. Medición de MPO en muestras de saliva .....	49
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	51
4.1. Medición de la actividad enzimática de MPO .....	51
4.2. Caracterización electroquímica de los electrodos serigrafados .....	52
4.3. Elección de la concentración del sustrato (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	55
4.3.1. Efecto del buffer .....	57
4.4. Efecto de la velocidad de barrido en la reducción del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	58
4.5. Medición de MPO en muestras de saliva .....	62

4.5.1.	Estudios preliminares .....	62
4.5.2.	Muestras de participantes del estudio .....	65
CONCLUSIONES .....		72
REFERENCIAS.....		73
ANEXOS.....		86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del mecanismo que relaciona las ECV con EP. ( <i>modificado por los autores</i> .....	28
<b>Figura 2.</b> Código de puntuación de la salud de cada sextante en el EPB.....	29
<b>Figura 3.</b> Gráfico de resultados de un examen periodontal básico. Adaptado de Exploración periodontal con el examen periodontal básico, por Haleon Health Partner, 2018.....	30
<b>Figura 4.</b> Dímero de MPO completo. Los dos monómeros principales de color rojo y azul. Adaptado de “X-ray Crystal Structure and Characterization of Halide-binding Sites of Human Myeloperoxidase at 1.8 Å Resolution” por Fiedler, T., 2000.. .....	34
<b>Figura 5.</b> Ciclo catalítico de la MPO. ( <i>modificado por los autores</i> ) .....	36
<b>Figura 6.</b> Esquema de un electrodo serigrafiado. ( <i>modificado por los autores</i> ) .....	40
<b>Figura 7.</b> Imagen de microscope de barrido de la superficie de electrodo de carbono serigrafiado modificado con A) grafeno B) nanopartículas de oro.....	41
<b>Figura 8.</b> Convención de voltamperograma cíclico según los Estados Unidos y según la IUPAC. ....	43
<b>Figura 9.</b> Esquema de oxidación del guaiacol por peróxido de hidrógeno catalizado por MPO. ....	45
<b>Figura 10.</b> A) Montaje experimental para medición de VC. B) Disposición de electrodo serigrafiado en el montaje experimental.. .....	47
<b>Figura 11.</b> Muestras de saliva de pacientes sin EP (transparente) y de paciente con EP (rojo).. .....	49
<b>Figura 12.</b> VC de ferricianuro de potasio en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro con variación de velocidad de barrido de potencial desde 0.010 a 0.400 Vs <sup>-1</sup> . ....	52
<b>Figura 13.</b> VC de ferricianuro de potasio en electrodo serigrafiado de grafeno con variación de velocidad de barrido de potencial desde 0.010 a 0.400 Vs <sup>-1</sup> . ....	53
<b>Figura 14.</b> VC con variación de concentración de peróxido de hidrógeno en presencia de MPO de [-1 a 1V vc Ag] en electrodo serigrafiado de A) Grafeno B) Nanopartículas de oro.....	56
<b>Figura 15.</b> VC de peróxido de hidrógeno [0.5mM] solo y en presencia de MPO comercial [10U] de [-1 a 1V vs Ag] en electrodo serigrafiado de A) Grafeno B) Nanopartículas de oro.....	57
<b>Figura 16.</b> VC de buffer PBS pH 7 solo y en presencia de MPO comercial 10U de [-1 a 1V vs Ag] en electrodo serigrafiado de A) Grafeno B) Nanopartículas de oro .....	58
<b>Figura 17.</b> A) VC de la reducción de peróxido de hidrógeno [0.05 mM] catalizada por MPO a diferentes velocidades de barrido en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro. B) Relación lineal entre intensidad de corriente de los picos anódicos y catódicos contra la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.....	59
<b>Figura 18.</b> A) VC de la reducción de peróxido de hidrógeno [0.05mM] catalizada por MPO a diferentes velocidades de barrido en electrodo serigrafiado de grafeno. B) Relación lineal entre intensidad de corriente de los picos anódicos y catódicos contra la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.....	60
<b>Figura 19.</b> VC de muestras reales de saliva preliminares A) Muestra 1 B) Muestra 2, en electrodo de nanopartículas de oro con y sin peróxido de hidrógeno [0.5mM].....	63
<b>Figura 20.</b> VC de M1 sola y con peróxido de hidrógeno en electrodo serigrafiado de A) y B) grafeno C) y D) nanopartículas de oro.....	64

<b>Figura 21.</b> PCA de muestras analizadas en electrodo serigrafiado de grafeno.....	67
<b>Figura 22.</b> PCA de muestras analizadas en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro.....	67
<b>Figura 23.</b> VC de 5 muestras de saliva representativas en presencia de peróxido de hidrógeno [0.5mM], con un barrido de potencial de [-1,1V vs Ag] a una velocidad de 0.150 [V/s] en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro.....	68
<b>Figura 24.</b> VC de 5 muestras de saliva representativas en presencia de peróxido de hidrógeno [0.5mM], con un barrido de potencial de [-1,1V vs Ag] a una velocidad de 0.150 [V/s] en electrodo serigrafiado de grafeno.....	69
<b>Figura 25.</b> PCA de muestras analizadas en electrodo serigrafiado de grafeno clasificadas según la condición del paciente.....	70
<b>Figura 26.</b> PCA de muestras analizadas en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro clasificadas según la condición del paciente.....	70

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Antecedentes investigativos en detección de MPO por métodos electroquímicos .....	20
<b>Tabla 2.</b> Parámetros del sistema multidimensional Staging and Grading establecidos por el taller mundial sobre la clasificación de las enfermedades y afecciones periodontales y periimplantarias en 2017 .....	30
<b>Tabla 3.</b> Valores de actividad enzimática para cada medición .....	53
<b>Tabla 4.</b> Valores de corriente y voltaje de picos de VC de ferricianuro de potasio a diferentes velocidades en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro .....	54
<b>Tabla 5.</b> Valores de corriente y voltaje de picos de VC de ferricianuro de potasio a diferentes velocidades en electrodo serigrafiado de grafeno .....	55
<b>Tabla 6.</b> Valores de corriente de picos anódico y catódico de VC de la reducción de peróxido de hidrógeno en presencia de MPO a diferentes velocidades en electrodo serigrafiado de grafeno y de nanopartículas de oro .....	61
<b>Tabla 7.</b> Muestras recolectadas con su respectiva clasificación y posible factor de riesgo .....	65

## LISTA DE ANEXO

<b>Anexo 1.</b> Carta de consentimiento informado .....	85
---	----

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	grados celcius
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogeno
<b>ΔEp</b>	diferencia de potencial
<b>ET</b>	transferencia electrónica
<b>I</b>	corriente
<b>VC</b>	voltamperometría cíclica
<b>mA</b>	miliamperios
<b>μl.</b>	microlitros
<b>mV</b>	milivoltios
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>AuE</b>	electrodo de oro
<b>GNP</b>	gold nanoparticles
<b>GF</b>	grafeno
<b>LD</b>	límite de detección
<b>MPO</b>	mieloperoxidasa
<b>EP</b>	enfermedad periodontal
<b>DM</b>	diabetes Mellitus
<b>ECV</b>	enfermedad cardiovascular
<b>OMS</b>	organización mundial de la salud
<b>NIC</b>	nivel de inserción clínico
<b>PS</b>	peroxidasa salival

## RESUMEN

### **DESARROLLO Y EVALUACION DE UN PROTOTIPO DE BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO USANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE NANOTUBOS DE ORO Y OXIDO DE GRAFENO PARA LA DETECCIÓN DE MIELOPEROXIDASA EN SALIVA COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD PERIODONTAL**

Valdivieso Rodríguez María Camila, Ortiz Zambrano Ludy Rossana, Castillo León John Jairo\*

Escuela de química, Facultad de ciencias, Universidad Industrial de Santander

\*director de proyecto de grado

Palabras claves: mieloperoxidasa, saliva, enfermedad periodontal, electrodo serigrafiado, grafeno, nanopartículas de oro.

Según el Ministerio de Salud de Colombia, aproximadamente el 61,8% de la población presenta algún tipo de enfermedad periodontal, esto se debe principalmente a la brecha socioeconómica que provoca falta de información y acceso a buenos hábitos de salud bucal. Por lo anterior, el principal objetivo de este trabajo de grado ha sido evaluar la eficacia de los electrodos serigrafiados de grafeno y nanopartículas de oro, mediante voltamperometría cíclica, para la detección de enfermedad periodontal (EP) a través del análisis de niveles de mieloperoxidasa en muestras de saliva.

Para tal fin, el estudio se dividió en varias etapas: medición de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa comercial mediante métodos espectrofotométricos, utilizando guayacol como sustrato, donde se determinó una actividad enzimática de 4,84 U.

La siguiente etapa consistió en caracterizar electroquímicamente los electrodos, primero utilizando ferricianuro de potasio, y segundo en presencia de peróxido de hidrógeno con el fin de determinar una velocidad de barrido de potencial adecuada. También se determinó una concentración de

peróxido hidrógeno apta para ser el sustrato de la mieloperoxidasa en los análisis de muestras reales.

En el último paso, con ayuda de la doctora Silvia Rizo del consultorio odontológico de la clínica Carlos Ardila Lulle, se recogieron 29 muestras de pacientes con antecedentes de salud conocidos, con el fin de determinar los niveles de mieloperoxidasa en dichas muestras y clasificarlas según las afecciones de cada paciente. También se tomaron 6 muestras de personas al azar, sin clasificación médica, con el fin de poder incluirlas en algún grupo de clasificación según los resultados de los pacientes de consultorio.

Finalmente, al realizar el análisis de componentes principales (PCA) se evidenció una mayor precisión en la distribución y clasificación de las muestras con el electrodo de grafeno en comparación con el de nanopartículas de oro. Esta disparidad podría explicarse por la interferencia que las nanopartículas de oro generan al interactuar con el medio biológico, lo que afecta la exactitud de la corriente medida.

## ABSTRACT

### **SCREEN PRINTED ELECTRODES MODIFIED WITH PEROXIDASE FROM GRASS GUINEA (*PANICUM MAXIMUM*) FOR ENZYMATIC DETECTION OF HYDROGEN PEROXIDE.**

Valdivieso Rodríguez María Camila, Ortiz Zambrano Ludy Rossana, Castillo León John Jairo\*

School of Chemistry, Faculty of Science, Industrial University of Santander

\*Project manager grade

Keywords: myeloperoxidase, saliva, periodontal disease, screen-printed electrode, graphene, gold nanoparticles.

According to the Ministry of Health of Colombia, approximately 61.8% of the population presents some type of periodontal disease. This is mainly due to the socioeconomic gap that leads to a lack of information and access to good oral health habits. Therefore, the main objective of this undergraduate thesis has been to explore the efficacy of screen-printed graphene and gold nanoparticle electrodes, using cyclic voltammetry, for the detection of periodontal disease (PD) through the analysis of myeloperoxidase levels in saliva samples.

For this purpose, the study was divided into several stages. Starting with the measurement of enzymatic activity of commercial myeloperoxidase using spectrophotometric methods, using guaiacol as a substrate, where a enzymatic activity of 4.84 U was determined. The next stage consisted of electrochemically characterizing the electrodes using potassium ferricyanide in the presence of hydrogen peroxide to determine an appropriate potential sweep rate. A suitable hydrogen peroxide concentration was also determined to be the substrate for myeloperoxidase in real sample analyses.

In the final step, with the assistance of Dr. Silvia Rizo from the dental office of the Carlos Ardila Lulle clinic, 29 samples were collected from patients with known health backgrounds to determine myeloperoxidase levels in these samples and classify them according to each patient's conditions. Additionally, 6 samples were taken randomly from unclassified individuals to be included in a classification group according to the results of the clinic patients.

Finally, upon performing Principal Component Analysis (PCA), greater precision was evidenced in the distribution and classification of samples with the graphene electrode compared to the gold nanoparticle electrode. This disparity could be explained by the interference generated by gold nanoparticles when interacting with the biological medium, affecting the accuracy of the measured current.

## INTRODUCCIÓN

---

Según el reporte del estado de la salud oral global realizado por la organización mundial de la salud en 2022, la enfermedad periodontal severa es la segunda enfermedad con mayor prevalencia a nivel mundial, luego de las caries no tratadas en dientes permanentes, con alrededor de mil millones de reportes (OMS, 2022). A nivel local, el 61.8% de la población colombiana presenta periodontitis en alguna de sus fases, siendo la fase moderada la más frecuente y las personas mayores de 45 años las más afectadas (Minsalud, 2012). La mala higiene en la salud oral es la principal causa de estas cifras. Escasos recursos asignados a programas de prevención y tratamiento de enfermedades orales y el poco conocimiento sobre el efecto de una EP avanzada en la calidad de vida de las personas son razones que justifican la prevalencia de esta enfermedad en el país.

En los últimos años se ha demostrado el papel de la mieloperoxidasa como biomarcador del daño de tejido periodontal, lo cual ha resultado útil en el diagnóstico, pronóstico y evaluación de los efectos de la terapia en la enfermedad periodontal. (Dagar et al., 2015)

La mieloperoxidasa (MPO) es uno de los mediadores expresados dentro de los tejidos durante la progresión de la inflamación (Aratani, 2018). Se han detectado niveles elevados de MPO en tejido gingival, saliva y fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal, lo que indica una regulación al alza de la activación de neutrófilos y el estrés oxidativo en los tejidos afectados. De esta forma se relaciona que el aumento de la actividad de la MPO está asociado con la gravedad y progresión de la enfermedad periodontal

En general, la evidencia sugiere que un aumento en la actividad de la MPO está estrechamente relacionado con la patogénesis y la progresión de la enfermedad periodontal, lo que indica una regulación al alza de la activación de neutrófilos y el estrés oxidativo en los tejidos afectados.

El análisis de estas enzimas en la secreción salival y los marcadores inflamatorios en suero de pacientes con periodontitis pueden contribuir al esclarecimiento de la patogenia y mejorar la realización de un diagnóstico oportuno de la enfermedad periodontal. (Yamalik et al., 2000). Por ello, con el propósito de identificar posibles biomarcadores presentes en el líquido crevicular gingival (LCG) para discriminar la periodontitis en las zonas sanas e inflamadas, Leppilahti et al. (2014) observó que en el análisis cuantitativo de los biomarcadores presentes en el LCG hubo una tendencia en la que la mayoría de estos, entre ellos la mieloperoxidasa, aumentaba progresivamente desde los sitios sanos y con gingivitis hasta las zonas con periodontitis crónica.

Por otra parte, el auge del uso de sensores y biosensores en las distintas áreas de la medicina ha permitido avanzar en el estudio de un sinnúmero de patologías, siendo una alternativa prometedora para el diagnóstico temprano de enfermedad periodontal ya que, además de ser un método fácil de usar y no invasivo, estos dispositivos ofrecen dictámenes certeros y son capaces de reportar la severidad de la afección en tiempo real (Kumar et al., 2015; Wignarajah et al., 2015). Un diagnóstico oportuno puede incluso ser vital para pacientes con enfermedades cardiovasculares o diabetes.

Por lo anterior, nace el objetivo de desarrollar un prototipo de biosensor electroquímico que permita obtener un primer diagnóstico sobre la presencia de EP. En este trabajo se evaluó,

mediante voltamperometría cíclica, el desempeño de los electrodos serigrafados de grafeno y nanopartículas de oro en la detección de MPO como biomarcador de esta enfermedad.

## 1. MARCO DE REFERENCIA

Con el fin de evaluar la posibilidad de desarrollar un prototipo de método diagnóstico rápido, sensible y de bajo costo, se evaluó la eficacia de los electrodos serigrafiados como detectores electroquímicos de la mieloperoxidasa en muestras de saliva, utilizando como sustrato una concentración determinada de peróxido de hidrógeno para así medir niveles de la enzima y predecir la posible presencia de enfermedad periodontal en el paciente.

La mieloperoxidasa (MPO) es uno de los mediadores expresados dentro de los tejidos durante la progresión de la inflamación (Aratani, 2018). La contribución relativa de la mieloperoxidasa a la peroxidasa salival total depende activamente de la presencia de inflamación periodontal u oral. (Thomas, et al., 2010). Esta relación directa ha permitido que sean detectados niveles elevados de MPO en tejido gingival, saliva y fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal, lo que indica una regulación al alza de la activación de neutrófilos y el estrés oxidativo en los tejidos afectados. De esta forma se relaciona el aumento de la actividad de la MPO con la gravedad y progresión de la enfermedad periodontal, lo cual ha despertado especial interés en la medición de MPO como biomarcador de EP.

En 2010, Lu, L. y colaboradores, fabricaron un inmunosensor amperométrico para la detección de MPO basado en la inmovilización de anti-MPO en un electrodo de carbón vítreo modificado, y obtuvieron que en condiciones óptimas, el cambio de corriente antes y después de la inmunorreacción fue proporcional a la concentración de MPO en el rango de 5 a 300ng/mL con un límite de detección de 0,2 ng mL. Además, en el mismo año, Windmiller, J.R. y colaboradores, desarrollaron un biosensor amperométrico basado en tiras serigrafiadas para la determinación de los niveles de mieloperoxidasa (MPO), que utiliza 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como

mediador redox para permitir la cuantificación de niveles de MPO, y detectaron niveles fisiológicos de MPO entre 3 y 18 U/L tanto en tampón de acetato (pH 4,5) como en suero humano.

En 2017, Wen, Y. y colaboradores, desarrollaron un inmunosensor amperométrico para la detección cuantitativa de MPO en suero utilizando redes trimetálicas de nanocables de CuPdPt, con lo cual lograron satisfactoriamente la determinación de MPO de muestras de suero clínico, con una respuesta lineal dentro del rango de concentración de MPO de 100 fg/mL a 50 ng/mL y un bajo límite de detección de 33 fg/mL.

En una investigación más reciente, Tao, Y. y colaboradores (2023) desarrollaron un inmunosensor amperométrico flexible para la detección de MPO utilizando un electrodo modificado con puntos cuánticos, con alta sensibilidad (31,6 fg/mL) y un amplio rango de detección (1pg/mL a 1ng/mL).

Estos avances investigativos demuestran la importancia que ha tomado el análisis de los niveles de MPO a lo largo del tiempo, lo cual incentivó el desarrollo de este proyecto con el objetivo de sentar las bases en la construcción de un posible método de detección de MPO que funcione como herramienta en el diagnóstico oportuno de enfermedad periodontal en Colombia.

**Tabla 1***Antecedentes investigativos en detección de MPO por métodos electroquímicos.*

<b>Título</b>	<b>Autor(es)</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Técnica de detección</b>	<b>Rango Lineal</b>	<b>Límite de detección</b>
Electrochemical detection of myeloperoxidase (MPO) in blood plasma with surface-modified electroless nickel immersion gold (ENIG) printed circuit board (PCB) electrodes	Nandeshwar, R. & Tallur, S. (2024)	Detectar niveles de MPO en suero sanguíneo utilizando electrodo de placa de circuito impreso de superficie modificada por inmersión en oro de níquel no electrolítico.	Voltametría de pulso diferencial	-	0,202 ng/mL
Flexible Amperometric Immunosensor Based on Colloidal Quantum Dots for Detecting the Myeloperoxidase (MPO) Systemic Inflammation Biomarker	Tao, Y., et al. (2023)	Desarrollo de inmunosensor amperométrico modificado con puntos cuánticos para detectar MPO	Voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial	1pg/mL a 1ng/mL	31,6 fg/mL
Amperometric myeloperoxidase immunoassay based on the use of CuPdPt nanowire networks	Wen, Y., et al. (2017)	Desarrollo de inmunosensor electroquímico de redes trimetálicas de nanocables de CuPdPt para detección de MPO	Cronoamperometría	100 fg/mL a 50 ng/mL	33 fg/mL

Strip-based amperometric detection of myeloperoxidase	Windmiller, J.R., et al. (2010)	Desarrollo de un biosensor amperométrico con electrodo serigrafiado para determinar niveles de MPO, utilizando tetrametilbencidina (TMB) como mediador redox.	Cronoamperometría	3 U/L a 18 U/L	0.6 U/L
Amperometric Immunosensor for Myeloperoxidase in Human Serum Based on a Multi-wall Carbon Nanotubes-Ionic Liquid-Cerium Dioxide Film-modified Electrode	Lu, L., et al. (2010)	Desarrollo de un inmunosensor amperométrico con electrodo de carbón vítreo modificado por membrana compuesta DMFMWCNTs-EMIMBF4/quitosano-CeO2 para detección de MPO en suero humano.	Voltametría cíclica, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido	5 ng/mL a 300 ng/mL	0,2 ng/mL

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Enfermedad periodontal

Se denomina periodontitis a un amplio rango de condiciones infeccioso-inflamatorias que afectan la salud de la encía, el hueso y los tejidos conectivos que anclan el diente al hueso alvéolar y dan soporte al mismo (Kumar et al., 2015; Kinane et al., 2017). Una enfermedad periodontal (EP) progresa a partir de una gingivitis (Pizzorno et al., 2016), una respuesta inflamatoria localizada ocasionada por bacterias presentes en la placa dental. Una gingivitis no tratada puede llegar a una periodontitis que como consecuencia generará sangrado gingival, formación de bolsas periodontales y en su fase más severa la pérdida del diente (Palm et al., 2013).

El taller mundial de clasificación de 2017 propuso cuatro niveles de salud periodontal (EKE et al., 2021):

1. Salud periodontal prístina: Ausencia total de inflamación y respuesta inmunitaria fisiológica que afecte al periodonto. No hay inserción ni pérdida ósea.
2. Salud periodontal clínica bien mantenida: Periodonto estructural y clínicamente intacto.
3. Estabilidad de la enfermedad periodontal: Periodonto reducido en un paciente con periodontitis estable, es decir, un paciente con un deterioro periodontal y sin inflamación luego de haber tenido una EP activa (Bertl et al., 2021).
4. Remisión/control de la EP con un periodonto reducido.

Además, se definieron tres diferentes formas en las que un paciente puede presentar periodontitis, estas son: periodontitis, en sus diferentes grados de severidad; periodontitis

necrosante, la cual suele ir acompañada de una enfermedad sistémica y su severidad puede ir desde la pérdida menor de la arquitectura papilar hasta la destrucción extensa del tejido periodontal ocasionado por *cancrum oris* (Ogunleye et al., 2022) y periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica.

## **2.2. Enfermedades periodontales y su relación con enfermedades sistémicas**

### **2.2.1. EP y su relación con la diabetes**

La diabetes es un trastorno metabólico que se puede manifestar de dos formas principales. La diabetes tipo I (T1DM), también denominada diabetes mellitus autoinmune o diabetes insulino dependiente, es una patología en la cual hay una ausencia significativa o total de insulina como consecuencia de la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, responsables de la secreción de dicha hormona, como resultado de un ataque por parte del sistema inmunitario. En contraste, en la diabetes tipo II (T2DM) o diabetes no insulino dependiente, se presenta un deterioro gradual en la producción de insulina o la resistencia a esta. En ambas situaciones, el paciente presenta un estado de hiperglucemia que produce una inflamación sistémica provocando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En 2019, esta afección fue la causa directa de 1,5 millones de muertes, cifra que solo tiende a aumentar conforme pasan los años. (OMS, 2023)

Desde la década de 1960 se ha informado sobre la asociación entre la diabetes mellitus (DM) y EP. Varios informes han demostrado con evidencias la compleja interacción entre estas patologías, donde se informa que la severidad de EP es significativamente mayor en pacientes con DM que en pacientes sin DM. (Belting, et al., 1964)

Además, se ha evidenciado que el tratamiento de EP puede provocar una reducción en los niveles de hemoglobina glucosilada A1c (HbA1c) en pacientes diabéticos, comparado con

pacientes de EP que no son tratados (Faggion, et al., 2016). Además, un estudio reciente, realizado en sujetos de 40 años o más, demostró que la periodontitis era significativamente más prevalente entre las personas que padecían diabetes que entre las no diabéticas, sin diferencias en términos de género y edad (De Miguel-Infante, et al., 2018)

Aunque el mecanismo específico que conecta la DM y la enfermedad periodontal aún no se ha determinado completamente, el estrés oxidativo parece ser otro vínculo importante entre la DM y la periodontitis, ya que los biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo pueden activar vías proinflamatorias comunes a estas patologías (Patil, et al., 2016). Es aquí donde entra el papel de la mieloperoxidasa como biomarcador, al ser liberada durante procesos inflamatorios que ocurren durante la diabetes esta enzima se convierte en un potencial biomarcador, al aumentar su presencia cuando la enfermedad está presente. (Peng, et al., 2021)

### ***2.2.2. EP y su relación con enfermedades cardiovasculares***

Las enfermedades cardiovasculares comprenden un grupo de afecciones que afectan el funcionamiento normal del corazón y los vasos sanguíneos. Éstas representan, aproximadamente, el 31% de las causas de muerte en el mundo (OMS, 2017), pese a que la mayoría pueden prevenirse modificando los factores de riesgo comportamentales, los cuales han sido identificados por la Organización Mundial de la Salud como tabaquismo, inactividad física, uso nocivo de alcohol y dietas malsanas. Es por esto por lo que es fundamental la detección temprana y el adecuado tratamiento según sea el caso.

El grupo de las ECV está comprendido por enfermedades que incluyen: la cardiopatía coronaria (CC), o arteriosclerosis, que es causada por la acumulación de material graso en las arterias coronarias, provocando que estas se estrechen y se disminuya el flujo de sangre y oxígeno en el corazón. Las enfermedades cerebrovasculares, que se deben a alteraciones en los vasos

sanguíneos que irrigan el cerebro, dificultando el flujo de oxígeno hacia el tejido cerebral. La arteriopatía periférica, que ocurre cuando los vasos sanguíneos de los miembros superiores e inferiores se estrechan, por acumulación de grasa, y se reduce el flujo sanguíneo en las extremidades. La cardiopatía reumática, que inicia con una fiebre reumática por infección por estreptococos, provocando lesiones del músculo cardíaco y de las válvulas cardíacas. La cardiopatía congénita, que comprende las malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento. Finalmente, la trombosis venosa profunda (TVP), que ocurre cuando se forman coágulos de sangre (trombos) en las venas profundas de las piernas, que pueden desprenderse y viajar a través del torrente sanguíneo y alojarse en los pulmones bloqueando el flujo sanguíneo (embolia pulmonar). (OMS, 2017)

La relación entre la periodontitis y las ECV ha sido de especial interés en diferentes estudios, debido a que tienen en común algunos factores de alto riesgo, como tabaquismo y diabetes; además en el desarrollo de ambas enfermedades ocurren procesos de inflamación y estrés oxidativo, donde los macrófagos y neutrófilos participan en la transformación de placas arteriales coronarias estables en lesiones inestables. (Takahiko, et al., 2002)

Existe evidencia de estudios epidemiológicos de una asociación positiva entre periodontitis y enfermedad coronaria. En una revisión sistemática se analizaron 6 estudios de ECV, 3 estudios de enfermedad cerebrovascular, 2 estudios de cardiopatía coronaria y 1 estudio de arteriopatía periférica. Donde todos los estudios reportaron asociaciones positivas con enfermedades periodontales, y un mayor riesgo de un primer evento coronario en pacientes con periodontitis (Dietrich et al., 2019). Además, un análisis reciente de los datos del estudio ARIC demostró una asociación entre la clase del perfil periodontal y la incidencia de accidente cerebrovascular isquémico. En esta cohorte, los pacientes con periodontitis tenían más del doble de riesgo de

accidente cerebrovascular cardioembólico y trombótico en comparación con individuos sin EP. (Sen, et al., 2018)

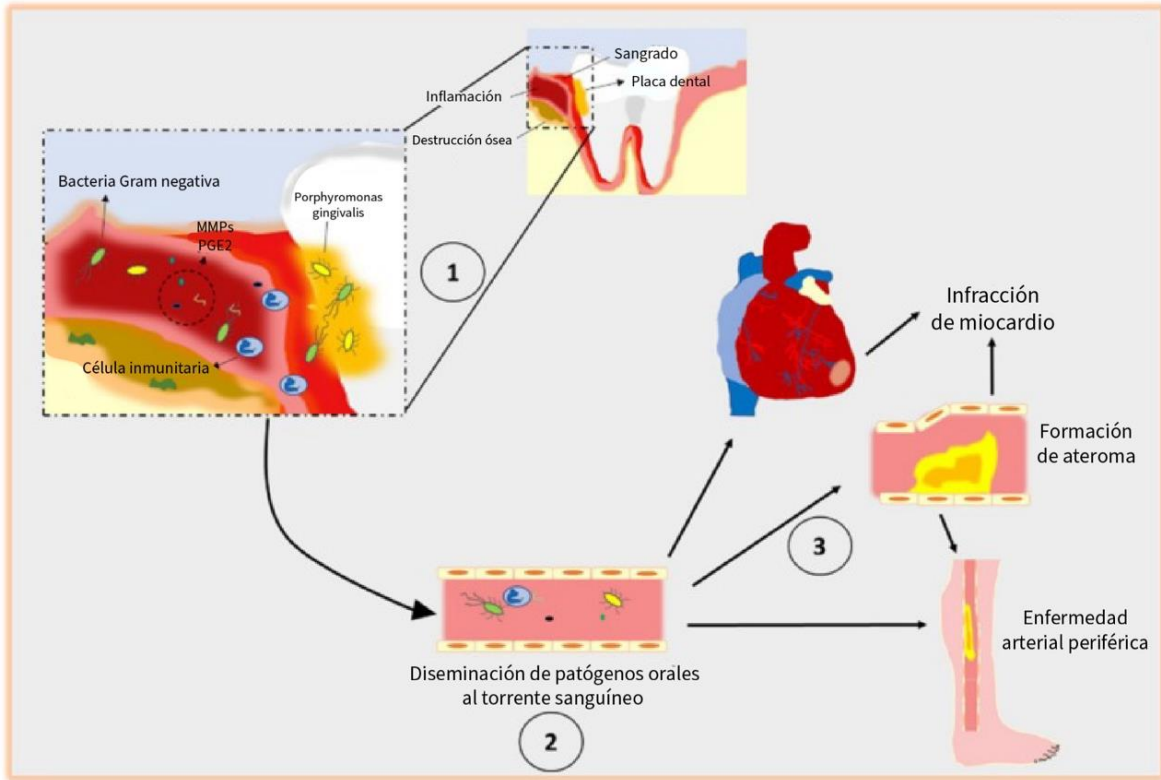
La asociación más clara entre EP y ECV ocurre cuando los patógenos periodontales destruyen el epitelio de la bolsa periodontal, permitiendo la entrada de endotoxinas y exotoxinas nocivas al torrente sanguíneo. (Sudhakara, et al 2018). Este proceso conduce a la diseminación bacteriana y la infección sistémica, dando como respuesta un aumento en la reacción inflamatoria, provocando que patógenos periodontales lleguen a distintos tejidos y órganos del sistema cardiovascular, como en las válvulas cardíacas y en las lesiones ateroscleróticas, intensificando la respuesta inflamatoria (Liccardo, et al., 2019)

Durante el proceso de inflamación es liberada la mieloperoxidasa (MPO) al líquido extracelular, enzima que es almacenada en los gránulos azurófilos de neutrófilos y macrófagos polimorfonucleares. Por lo que la MPO ha sido un factor de estudio como un posible marcador en la evaluación de pacientes con ECV. (Loria, et al., 2008)

En la Figura 1 se muestra el principal mecanismo de relación entre ECV y EP, donde se representa 1) el desbalance en los patógenos de la biocapa provoca inflamación epitelial que libera mediadores como MMPs y PGEE2 que atrapan las células inmunitarias. Esta respuesta inflamatoria induce la destrucción ósea. (2) En un estado crónico, ocurre la diseminación de patógenos orales en el torrente sanguíneo, provocando la aparición de ECV (3).

### **Figura 1**

Representación esquemática del mecanismo que relaciona las ECV con EP.



Nota. Adaptado de “Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease” por Liccardo, et al., 2019, *Int. J. Mol. Sci.* 20.

### 2.3. Métodos de diagnóstico de una enfermedad periodontal

Los métodos de diagnóstico utilizados deben ser inequívocos y fácilmente adaptables para cualquier profesional que los aplique, con el fin de que el método sea reproducible y se pueda obtener el mismo diagnóstico bajo las mismas condiciones (Savage et al., 2009). Inicialmente el profesional médico estudia la existencia de una EP mediante un examen periodontal básico (EPB) obteniendo con ello una primera pista del estado del periodonto. El EPB es una herramienta diseñada por la sociedad británica de periodontología que tiene como fin identificar de una manera más certera la presencia de una EP en pacientes que no presentan signos evidentes de esta. Consiste

en una sonda que tiene un extremo redondeado de 0,5mm de diámetro y unas bandas negras ubicadas de 3,5mm a 5,5mm en el soporte metálico. (Dietrich et al., 2019; British Society of Periodontology [BSP], 2019)

Al aplicar la prueba se deben examinar adecuadamente cada uno de los sextantes de la dentadura mediante el análisis de la profundidad del sondaje (PS) y se les debe asignar un código de acuerdo con el estado de la pieza dental más afectada en la sección (figura 2) con el fin de generar un gráfico de resultados como el mostrado en la figura 3.

## Figura 2

*Código de puntuación de la salud de cada sextante en el EPB.*

### Códigos de puntuación

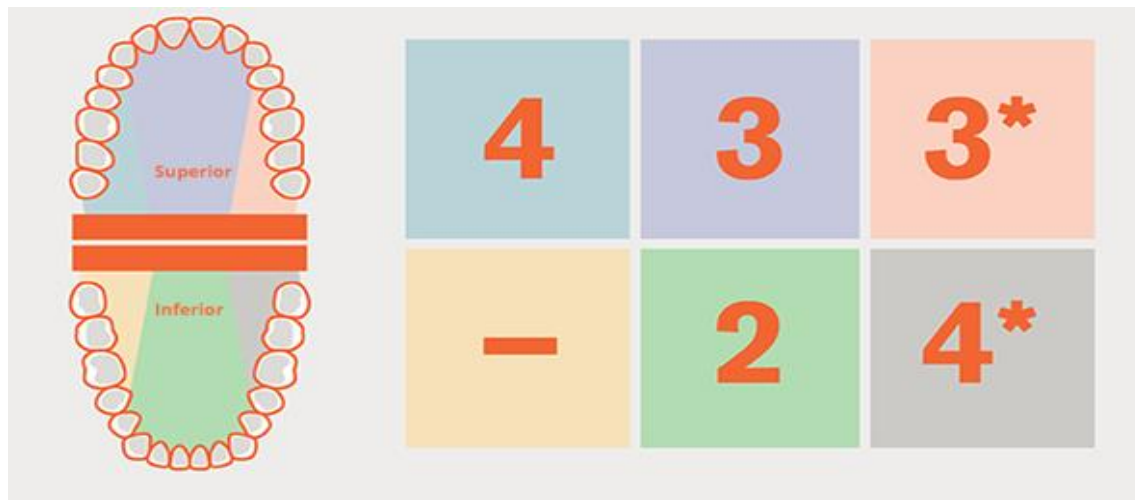


*Nota.* Adaptado de Basic Periodontal Examination (BPE), por Council of the British Society of Periodontology, 2019.

En la figura 3 se observa cada sextante (coloreado en el diagrama de la izquierda) y su respectivo código, asignado de acuerdo con la profundidad del sondaje, que indica el estado clínico de la sección.

### Figura 3

Gráfico de resultados de un examen periodontal básico.



*Nota.* Adaptado de Exploración periodontal con el examen periodontal básico, por Haleon Health Partner, 2018.

Luego de identificar el estado del periodonto, el profesional procede a establecer el tipo de EP y determinar la etapa y clasificación de la enfermedad. Mediante el análisis del nivel de inserción clínico (NIC) se utiliza el sistema *Staging and Grading* (tabla 2), establecido por el taller mundial sobre la clasificación de las enfermedades y afecciones periodontales y periimplantarias en 2017 (American Academy of Periodontology [AAP], 2022), el cual estratifica la enfermedad según los parámetros descritos en la tabla.

### Tabla 2

*Parámetros del sistema multidimensional Staging and Grading establecidos por el taller mundial sobre la clasificación de las enfermedades y afecciones periodontales y periimplantarias en 2017.*

STAGING					
	<i>Periodontitis</i>	<i>Etapa I</i>	<i>Etapa II</i>	<i>Etapa III</i>	<i>Etapa IV</i>
<b>Severidad</b>	Pérdida NIC interdental (en el sitio de mayor pérdida)	1 - 2 mm	3 - 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Pérdida ósea radiográfica	Tercer coronal (<15%)	Tercer coronal (15% - 33%)	Se extiende hasta el tercio medio de la raíz y más allá	Se extiende hasta el tercio medio de la raíz y más allá
	Pérdida dental (por periodontitis)	No hay pérdida dental		≤ 4 dientes	≥ 5 dientes
	Local	Profundidad del sondaje máxima ≤4mm • Principalmente pérdida ósea horizontal	• Profundidad del sondaje máxima ≤5mm • Principalmente pérdida ósea horizontal	Sumado a la complejidad de la etapa II: • Profundidad del sondaje máxima ≥6 mm • Pérdida ósea vertical ≥3mm • Bifurcación clase II o III • Defectos de cresta moderados	Sumado a la complejidad de la etapa III: Necesidad de rehabilitación compleja por: • Disfunción masticatoria • Traumatismo oclusal secundario (grado de movilidad dentaria ≥2) • Defectos de cresta severos

					<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colapso de mordida, deriva, ensanchamiento</li> <li>• &lt; 20 dientes restantes (10 pares opuestos)</li> </ul>
<b>Extensión y distribución</b>	Agregar a la etapa como descriptor	Para cada etapa describir la extensión como:			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localizada (&lt;30% de los dientes afectados)</li> <li>• Generalizada;</li> <li>o</li> <li>• Patrón molar/incisivo</li> </ul>
<b>GRADING</b>					
	<b>Progresión</b>		<b>Grado A: Ritmo lento</b>	<b>Grado B: Ritmo moderado</b>	<b>Grado C: Ritmo veloz</b>
<b>Criterios primarios</b>  <i>Siempre que esté disponible, se debe utilizar evidencia directa</i>	Evidencia directa del avance	Pérdida ósea radiográfica o NIC	No hay pérdida durante 5 años	<2mm de pérdida durante 5 años	≥2mm de pérdida durante 5 años
	Evidencia indirecta del avance	% pérdida ósea/edad	<0.25	0.25 a 1.0	>1.0
		Fenotipo del caso	Grandes depósitos de biofilm con bajos niveles de destrucción	Destrucción proporcional a los depósitos de biofilm	La destrucción supera las expectativas de los depósitos de biofilm; patrones clínicos específicos que sugieren periodos de progresión rápida y/o enfermedad de aparición temprana

Modificadores de calificación	Factores de riesgo	Fumar	No fumador	<10 cigarrillos/día	≥10 cigarrillos/día
		Diabetes	Normoglucémico o/no hay diagnóstico de diabetes	HbA1c <7.0% en pacientes con diabetes	HbA1c ≥ 7.0% en pacientes con diabetes

El staging se centra en clasificar la severidad y la extensión de la EP. El grading indica la tasa de progresión de la EP, la respuesta a la terapia y el impacto en la salud sistémica.

Ahora bien, para dar un diagnóstico certero es importante tener en consideración la severidad y la distribución de la enfermedad. La severidad se determina en términos del nivel de inserción clínica (NIC) como pérdida leve de 1.0 a 2.9mm, pérdida moderada de 3.0 a 4.9mm, pérdida avanzada igual o mayor a 5mm o sin pérdida mientras que la distribución se divide en distribución localizada (menor o igual al 30% de la dentición comprometida) o generalizada (más del 30% de la dentición comprometida (Minsalud, 2012; Nesbit et al., 2017).

Otro parámetro importante utilizado para complementar el diagnóstico del paciente es el sangrado al sondaje (SS). El sangrado al sondaje es un signo de inflamación periodontal que se produce por la penetración de la sonda periodontal durante el BPE. Este parámetro puede ser influenciado por la fuerza, el diámetro de la sonda y el grado de inflamación gingival, por lo que debe ser analizado en conjunto con los demás parámetros clínicos para obtener un diagnóstico preciso. La presencia de sangrado al sondaje no es un indicativo confiable de la existencia de una EP, sin embargo, su ausencia sí representa la salud del periodonto (Botero y Bedoya, 2010).

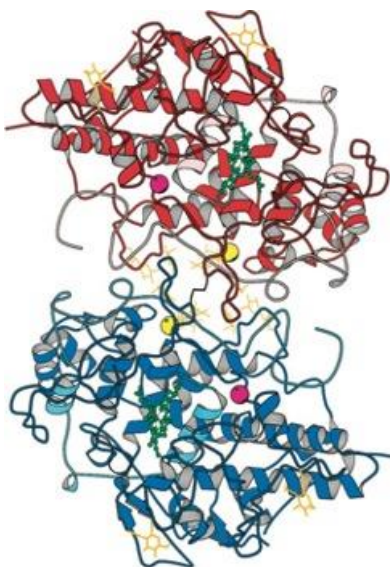
#### 2.4. Mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa (MPO), clasificada como E.C. 1.11.1.7, es una enzima crucial en el sistema inmunológico, perteneciente al grupo de las hemo peroxidases, que catalizan reacciones

de óxido-reducción de sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Es una proteína dimérica con un peso molecular de 146 kDa, con dos cadenas polipeptídicas, de 108 y 466 aminoácidos cada una, unidas covalentemente por un enlace disulfuro en el residuo Cys153. Cada monómero contiene un grupo hemo unido covalentemente, con un derivado de protoporfirina IV de hierro que actúa como sitio activo de la enzima. (Davies y Hawkins, 2020; Fiedler et al., 2000).

#### Figura 4

*Dímero de MPO completo.*



**Nota.** Los dos monómeros principales aparecen de color rojo y azul. Adaptado de “X-ray Crystal Structure and Characterization of Halide-binding Sites of Human Myeloperoxidase at 1.8 Å Resolution” por Fiedler, T., et al., 2000, *Journal of Biological Chemistry*, 275(16),

La MPO se localiza en los gránulos azurófilos, estructuras intracelulares que son los lisosomas de los neutrófilos, los leucocitos polimorfonucleares más abundantes y esenciales para el sistema inmunitario. Esta importancia se debe a las especies reactivas derivadas de MPO que

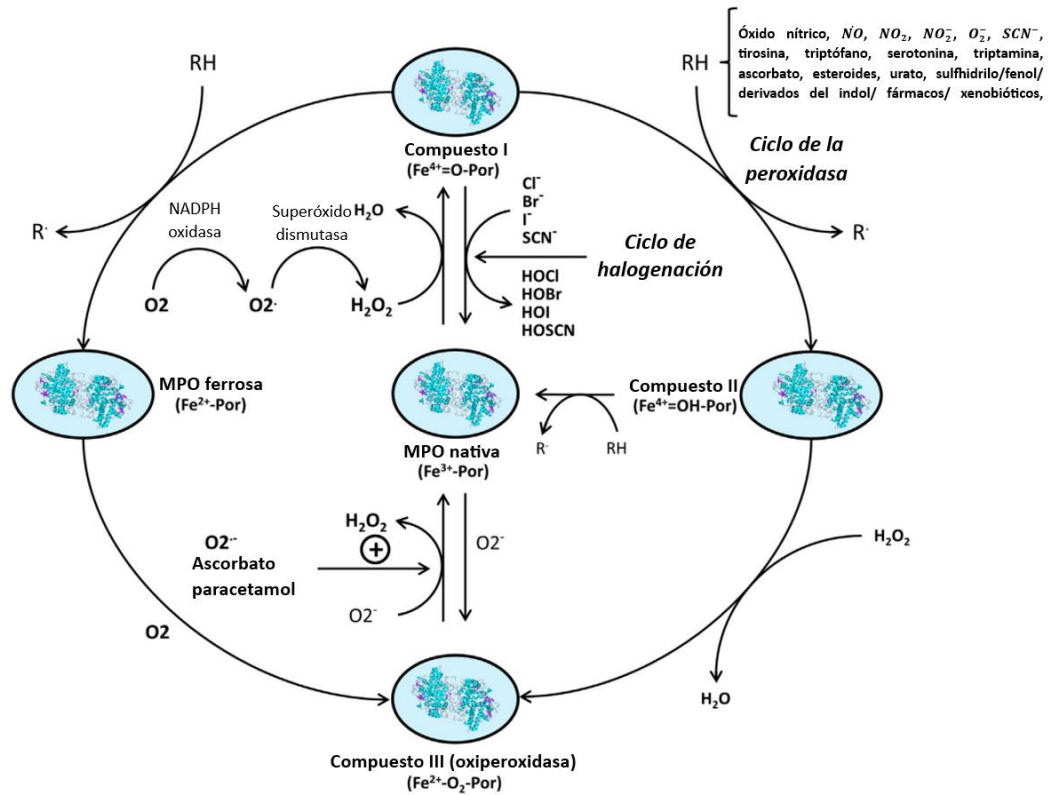
desempeñan un papel clave en la actividad antimicrobiana de los neutrófilos y la defensa humana contra diversos patógenos, principalmente al participar en la fagocitosis. Los niveles elevados de MPO en circulación están asociados con inflamación y aumento del estrés oxidativo. (Ndrepepa, et al., 2019)

La MPO cumple con dos ciclos catalíticos importantes (figura 5), uno de ellos es el ciclo de halogenación y el otro el ciclo de la peroxidasa. Ambos ciclos inician con la oxidación del Fe(III) de la enzima, al entrar en contacto con peróxido de hidrógeno, quien actúa como agente oxidante, dando paso al intermediario Complejo I, MPO-Fe(IV) ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) con un catión radical de porfirina. En este punto, el Complejo I puede sufrir una reducción de dos electrones mediante interacción con haluros como,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  y  $\text{SCN}^-$  quienes donan dos electrones al Complejo I para formar los correspondientes ácidos hipohalosos reactivos: ácido hipocloroso (HOCl), ácido hipobromoso (HOBr), ácido hipoyodoso (HOI) y ácido hipotiocianoso (HOSCN), mientras que la enzima es reducida a su estado inicial MPO-Fe(III). (Teng, et al., 2017).

El segundo posible ciclo es el de la peroxidasa, al sufrir una reducción de un electrón en dos pasos mediante la formación del intermedio redox, el Complejo II, MPO-( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ), por interacción con radicales (óxido nítrico,  $\bullet\text{NO}$  y  $\text{O}_2\bullet^-$ ), sustratos orgánicos (tirosina, ascorbato, hormonas esteroideas) y sustratos inorgánicos (nitrito,  $\text{NO}_2^-$ ) (Davies y Hawkins, 2020; Furtmüller et al. 1988; Huang et al., 2016)

## Figura 5

## Ciclo catalítico de la MPO.



*Nota.* Adaptado de “Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease” (p. 38), por G. Ndrepepa, 2019, *Clinica Chimica Acta*.

### 2.5. Mieloperoxidasa como biomarcador de EP.

La mieloperoxidasa (MPO) desempeña un papel central en la actividad antimicrobiana de los neutrófilos y la defensa humana contra patógenos al participar en el proceso de fagocitosis, donde los neutrófilos engullen y envuelven partículas extrañas, como bacterias o residuos celulares, en compartimientos, llamados fagosomas, donde se fusionan los gránulos azurofílicos para liberar su contenido donde se encuentra principalmente la enzima MPO. Una vez liberada en el entorno del patógeno capturado, la MPO cataliza reacciones de óxido-reducción en presencia

de peróxido de hidrógeno y haluros para generar especies reactivas de oxígeno, como ácidos hipohalosos, quienes tienen una alta actividad antimicrobiana. (Ndrepepa, 2019).

No obstante, la actividad incontrolada de la MPO puede resultar perjudicial, conduciendo a una producción excesiva de oxidantes, modificaciones oxidativas de macromoléculas y daño tisular. Es por eso por lo que niveles elevados de MPO están asociados con inflamación y estrés oxidativo. Esta desregulación ha sido implicada en la patogénesis de diversas enfermedades caracterizadas por inflamación crónica, como aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, renales, hepáticas, gastrointestinales, cáncer, artritis reumatoide y enfermedad (Nijakowski, et al., 2023). En este contexto, se ha propuesto a la MPO como un potencial biomarcador para evaluar el riesgo de desarrollar estas condiciones, subrayando su importancia en la investigación médica y la comprensión de procesos inflamatorios y oxidativos.

Aunque la medición de MPO en plasma es común en investigación biomédica, su uso en saliva para propósitos biomarcadores es poco frecuente. La saliva, reconocida por su utilidad en el diagnóstico de enfermedades sistémicas, podría ofrecer información valiosa sobre la actividad de la MPO y su relación con condiciones patológicas (Deo, et al., 2019). La concentración de MPO en saliva se vincula con la migración de neutrófilos y las respuestas inflamatorias en la cavidad oral, lo que sugiere su potencial como indicador sistémico.

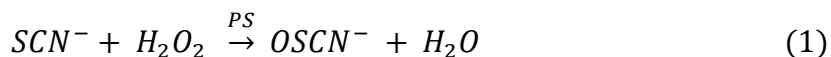
La acumulación de bacterias en esta la cavidad oral activa las células epiteliales, logrando que estas generen una respuesta inflamatoria que promueve la liberación del factor estimulante de colonias de granulocitos de células polimorfonucleares (PMNs) hacia el tejido conectivo adyacente al surco. Los PMNs, también llamados leucocitos polimorfonucleares, son fagocitos presentes en los vasos sanguíneos compuestos por un núcleo y un citoplasma altamente granulado. En este,

encontramos gránulos azurofílicos, gránulos específicos y gránulos de gelatinasa, siendo los primeros los más relevantes para nosotros en esta investigación. Los gránulos azurofílicos contienen MPO, una enzima del tipo oxidoreductasa que tiene como sitio activo un ion de hierro y cataliza la formación de ácido hipocloroso, N-cloraminas, radicales de tirosina e intermediarios de nitrógeno reactivos (Baggiolini et al., 1978; Davies y Hawkins, 2020; Nicu y Loos, 2016).

En el proceso de desinfección del tejido periodontal, el PMNs engulle el microorganismo, lo almacena en un fagosoma y posteriormente lo aniquila al exponerlo a especies de oxígeno reactivas y proteasas granulares. En el proceso se generan superóxidos, peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno (Nicu y Loos, 2016), productos que serán utilizados otras enzimas en el curso de la desinfección. La mieloperoxidasa siendo una de ellas, toma el peróxido de hidrógeno como sustrato logrando concebir productos clorados que resultan siendo tóxicos para muchas especies microbianas. Esta enzima es considerada un arma de doble filo, ya que, si bien cumple con su función de erradicar agentes patogénicos, es una de las principales responsables del deterioro del periodonto.

## 2.6. Peroxidasa Salival

La peroxidasa salival (PS) es una enzima presente en la saliva que cataliza la conversión de tiocianato a hipotiocianato según la reacción (1) descrita a continuación:



Ambas peroxidasas cumplen con el mismo objetivo, producir bactericidas para controlar el crecimiento de patógenos en la cavidad oral. Sin embargo, cabe resaltar que la PS se encuentra en menor proporción y solo cataliza la oxidación del  $SCN^{-}$  en presencia del  $H_2O_2$ , mientras que la MPO puede catalizar la oxidación de  $Cl^{-}$  y  $SCN^{-}$  de manera independiente en presencia del mismo

sustrato. Además, la concentración de MPO en saliva se relaciona directamente con la presencia de patógenos en la cavidad oral (Carlsson,1987).

Esta peroxidasa podría representar una interferencia en el análisis de las muestras, sin embargo, teniendo en cuenta que el desarrollo de este proyecto se basa en el estudio de MPO como biomarcador de EP, consideramos que su aporte en la señal analizada es menos significativo en comparación con el obtenido por parte de la MPO, puesto que mientras la PS sugiere una concentración variable pero permanente en la saliva, la MPO varía su concentración directamente en relación con la presencia o ausencia de EP en el individuo.

## **2.7. Electroodos serigrafiados**

En los últimos años, los sensores electroquímicos han surgido como herramientas fundamentales en diversas áreas de investigación debido a su capacidad para detectar y cuantificar moléculas biológicas con alta sensibilidad y selectividad. Además, su capacidad para proporcionar resultados rápidos y precisos los convierte en herramientas esenciales para la investigación biomédica.

Por ejemplo, en el diagnóstico clínico, los biosensores electroquímicos pueden detectar biomarcadores específicos asociados con enfermedades, integrando el analito a un componente biológico, produciendo un cambio en la propiedad electroquímica del sistema, generando una señal eléctrica proporcional a la concentración del analito. Esta señal es detectada y amplificada por el sistema electrónico del biosensor, permitiendo su cuantificación y un diagnóstico temprano. (Barhoumi, et al., 2018)

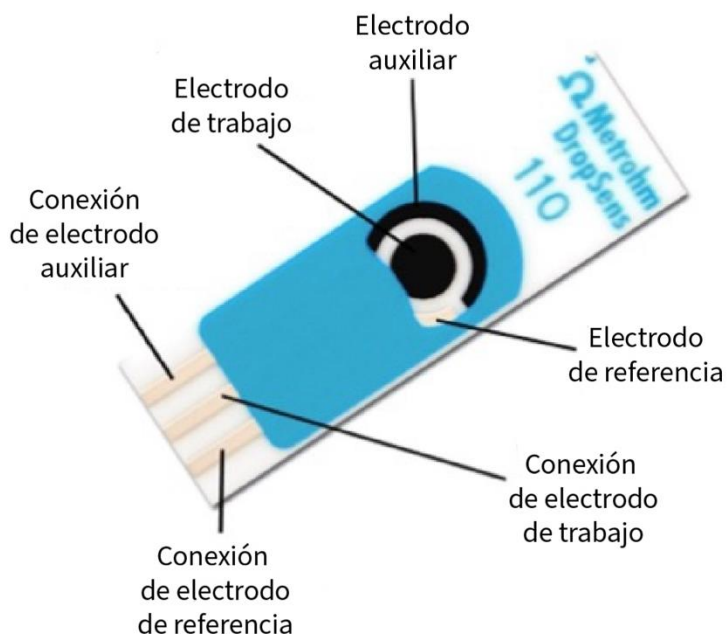
Los electrodos serigrafiados (SPE) son dispositivos de medición electroquímica que permiten un análisis in situ rápido con una alta reproducibilidad, sensibilidad y precisión. Se

producen imprimiendo diferentes tintas (carbono, oro, plata, platino) sobre un sustrato plástico o cerámico. La composición de las tintas utilizadas para imprimir sobre los electrodos determina la selectividad y sensibilidad necesarias para cada análisis. La gran versatilidad que presentan los SPE radica en la amplia gama de formas en que se pueden modificar los electrodos.

Los SPE son celdas conformadas por 3 electrodos que forman un circuito cerrado. El electrodo de trabajo produce una respuesta sensible a la concentración del analito. El electrodo de referencia permite la aplicación de un potencial conocido, independiente de la concentración del analito, su potencial es constante y se llama de referencia porque el potencial del electrodo de trabajo se mide en relación con él. El electrodo auxiliar o contraelectrodo, es quien completa el circuito de la celda de tres electrodos, permitiendo el paso de la corriente. (Taleat, et al., 2014)

### Figura 6

*Esquema de un electrodo serigrafiado.*



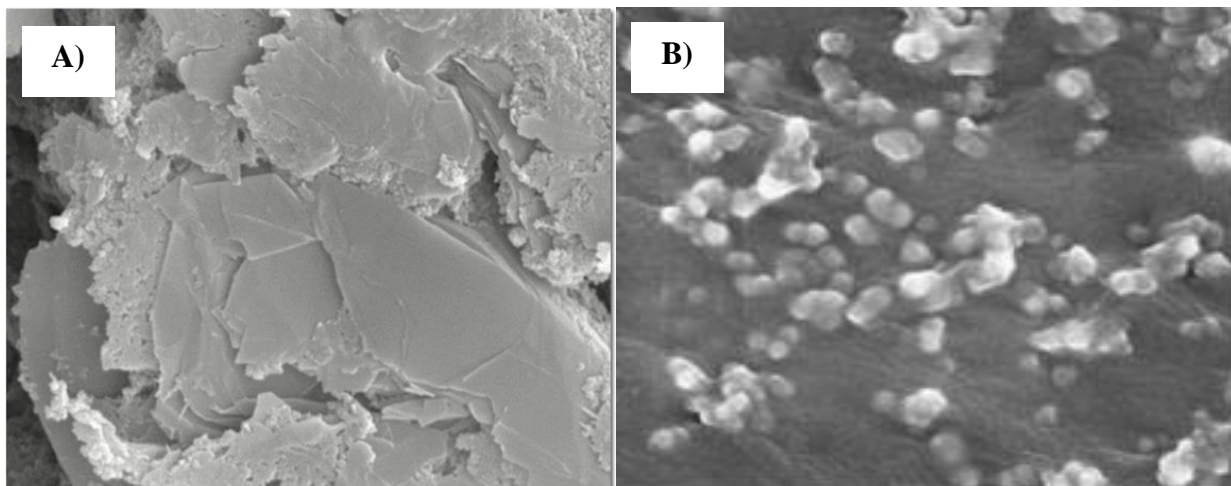
*Nota.* Adaptado de Electrodos serigrafiados por Metrohm DropSens.

En este proyecto se utilizaron dos tipos de electrodos serigrafiados. Uno de ellos de carbono modificado con grafeno como nanomaterial, diseñados para el desarrollo de (bio)sensores con un área activa electroquímica mejorada, con electrodo auxiliar de carbono y electrodo de referencia de plata.

El otro tipo de electrodo serigrafiado utilizado fue el modificado con nanopartículas de oro, diseñados para mejorar el área electroactiva del electrodo para aumentar las propiedades de transferencia electrónica y facilitar la inmovilización de biomoléculas. Con electrodo auxiliar de carbono y electrodo de referencia de plata.

### **Figura 7**

*Imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie de electrodo de carbono serigrafiado modificado con A) grafeno B) nanopartículas de oro*



*Nota.* Adaptado de Figura 7.A) “Electrodos serigrafiados” por Metrohm DropSens 7.B) “A screen-printed electrode modified with gold nanoparticles/cellulose nanocrystals for electrochemical detection of 4,4'-methylene diphenyl diamine” Heliyon, Volume 9, Issue 4.

El tipo de nanomaterial con el que se modifica el electrodo provoca una interacción particular con el analito que a su vez arroja una señal de corriente característica, esta diferencia entre electrodos serigrafiados es la que se analiza en este proyecto para determinar cuál material es más adecuado para un análisis enzimático de muestra biológica.

## **2.8. Voltamperometría cíclica**

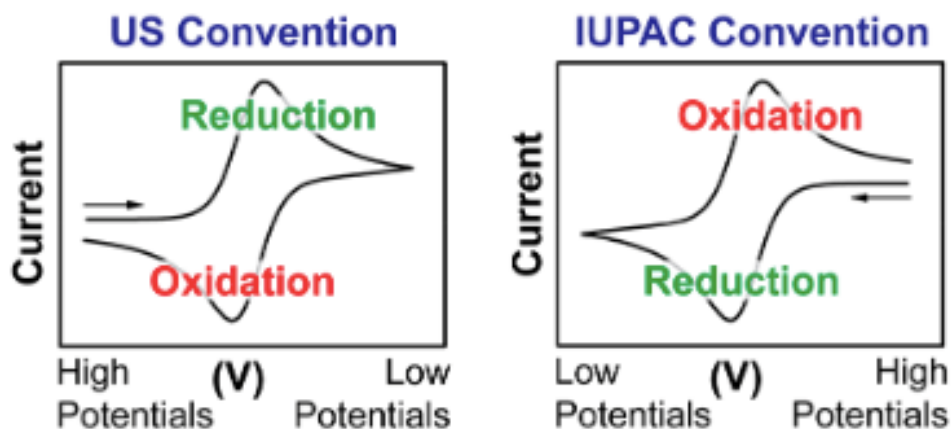
La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica de gran utilidad que permite estudiar aspectos como la cinética y el comportamiento de las especies de una reacción redox. Consiste en la inducción un barrido de potencial sobre el electrodo de trabajo, que va desde un potencial inicial ( $E_i$ ), hasta el vértice del potencial ( $E_V$ ) y después hace el barrido en sentido inverso hasta llegar al potencial final ( $E_f$ ), el cual debe coincidir con el potencial inicial, pues se trata de un barrido cíclico. En este sistema, el electrodo es el conductor eléctrico que permite el paso del potencial inducido en la celda, provocando la oxidación, o reducción, según sea el caso, del analito dispuesto. De esta forma, cuando se escanea el potencial, la concentración de la especie cerca del electrodo cambia con el tiempo, pues se está convirtiendo en su versión oxidada, o reducida, y eso genera una corriente como respuesta a la reacción redox del analito. Esta información es registrada gráficamente en un voltamperograma del cual se obtiene información respecto a la reacción que ocurre sobre el electrodo, pues se muestran dos picos, uno correspondiente a la oxidación y otro de la reducción del analito. (Choudhary, et al., 2017)

Existen dos convenciones comúnmente utilizadas para reportar datos en un voltamperograma cíclico, la convención de Estados Unidos, y la convención de la IUPAC, donde una parece la versión rotada  $180^\circ$  de la otra, y la flecha indica la dirección en que comienza el barrido de potencial. En el caso de la convención IUPAC, el barrido de potencial empieza por sus valores negativos, es decir recorre la traza catódica, donde se provoca la reducción del analito.

Después alcanza el vértice de potencial y el barrido alcanza los valores positivos de potencial, es decir pasa por la traza anódica, donde ocurre la oxidación del analito que se encontraba reducido.

### Figura 8

*Convención de voltamperograma cíclico según los Estados Unidos y según la IUPAC.*



*Nota.* Adaptado de “A practical beginner’s guide to cyclic voltammetry.” Por Elgrishi, N., et al., 2018, *Journal of Chemical Education*.

La reversibilidad electroquímica en los CV se clasifica en reversible, cuasi reversible e irreversible, y este concepto puede evaluarse a partir de las formas de los CV. Esto depende de la magnitud de la correlación entre la tasa de transferencia de electrones y la tasa de difusión de transferencia de masa, como se indica a continuación:

- Proceso reversible: tasa de transferencia de electrones  $\gg$  tasa de transferencia de masa por difusión
- Proceso casi reversible: cambio de reversible a irreversible

- Proceso irreversible: tasa de transferencia de electrones  $\ll$  tasa de transferencia de masa por difusión.

Si el proceso de reducción es química y electroquímicamente reversible, la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico, ( $\Delta E_p$ ), es de 57 mV a 25 °C. La reversibilidad electroquímica se utiliza para indicar si el analito es estable tras la reducción y puede reoxidarse posteriormente. Esto hace referencia a la cinética de transferencia de electrones entre el electrodo y el analito, es decir, cuando hay una barrera baja para la transferencia de electrones (reversibilidad electroquímica), el equilibrio se establece ante cualquier cambio en el potencial aplicado. Por el contrario, cuando hay una barrera alta para la transferencia de electrones (irreversibilidad electroquímica), la transferencia de electrones es lenta y más negativa, dando lugar a  $\Delta E_p$  mayores. (Yamada, H., et al., 2022)

## **2.9. Análisis de componentes principales**

Un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) es una herramienta estadística multivariable que permite observar tendencias en un conjunto de datos reduciendo su dimensionalidad mientras se conserva su variabilidad. Según Jolliffe y Cadima (2016), preservar esta variabilidad implica encontrar nuevas variables que sean funciones lineales de aquellas en el conjunto de datos original, que maximizan sucesivamente la varianza y que no están correlacionadas entre sí. Estas nuevas variables son lo que se conoce como componentes principales. En síntesis, un PCA tiene como función representar el patrón de similitudes entre el conjunto de datos y los componentes principales, generalmente mostrándolas como puntos en mapas (Abdi y Williams, 2010).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Reactivos

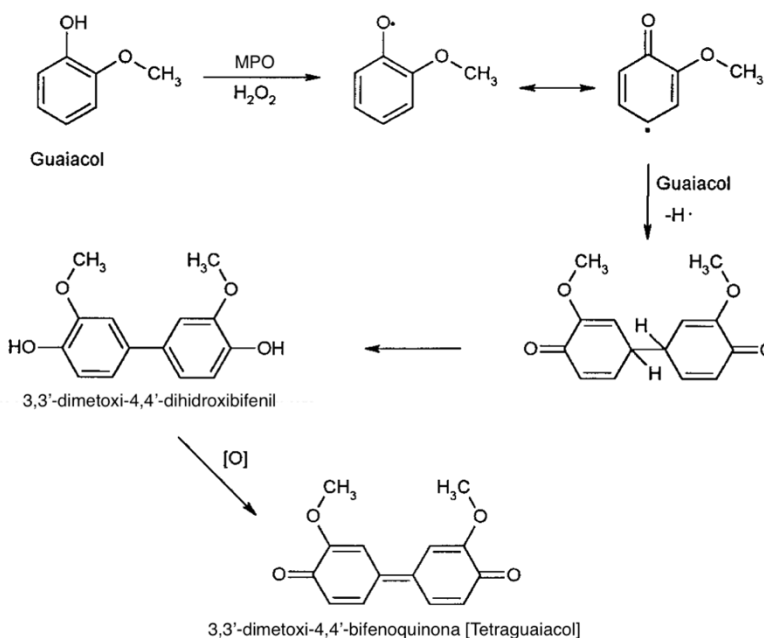
Los reactivos utilizados fueron adquiridos de: SIGMA-ALDRICH (USA): Mieloperoxidasa de leucocitos humanos M6908; Merck: peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% p/v); J.T. Baker: guayacol, fosfato monopotásico KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; fosfato dipotásico K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

#### 3.2. Medición de la actividad enzimática de MPO

La actividad enzimática de la MPO se determinó mediante un ensayo colorimétrico utilizando un espectrofotómetro UV-1800 SHIMADZU. El análisis se basó en el cambio de absorbancia que ocurre a 470nm, momento en que es oxidado el guayacol, reacción catalizada por la MPO en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formando el producto tetraguaiacol de color ámbar, responsable por la señal de absorción a 470nm.

#### Figura 9

*Esquema de oxidación del guayacol por peróxido de hidrógeno catalizado por MPO.*



*Nota.* Adaptado de “Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases” por Doerge, et al., 1997, 250(1), 10–17.

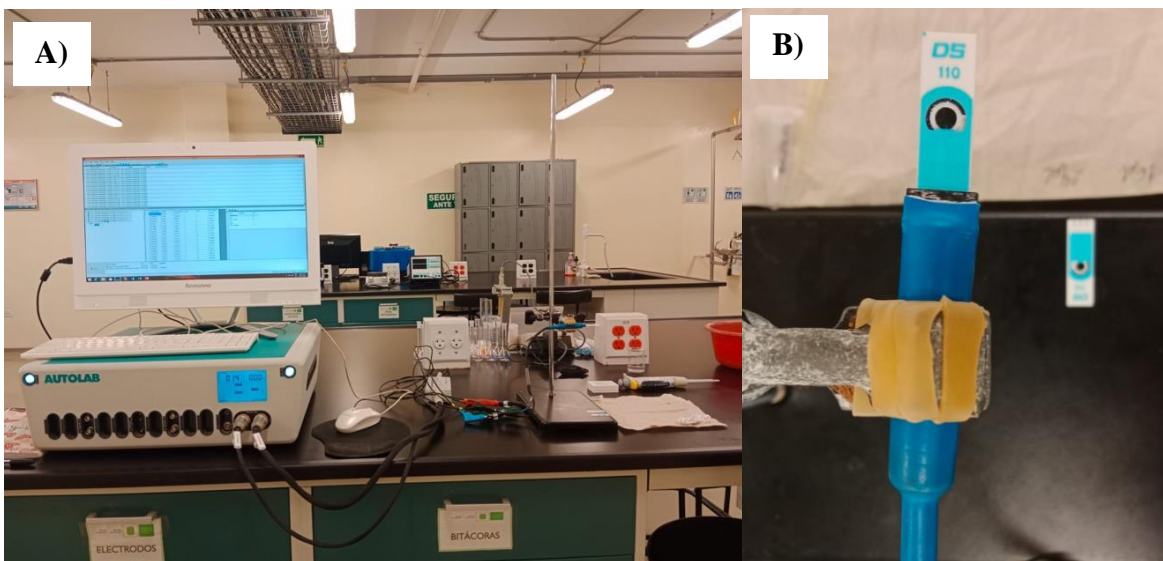
La MPO [50 U/mL] fue adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich, USA) y fue diluida en 500µL de agua tipo I; posteriormente se tomó una alícuota de 10µL que fue diluida hasta 100mL, obteniendo una solución de [10U/mL]. Se preparó el sustrato que contenía guayacol [0,017M] y peróxido de hidrógeno [0,015%] disueltos en buffer de fosfatos (PBS) 100mM de pH 7,06. En la celda del espectrofotómetro se agregó 1mL de sustrato, 10µL de MPO comercial [10U/mL] y se inició el análisis espectrofotométrico. Esto con el fin de determinar las unidades de MPO activa y presente que pueden oxidar una determinada concentración de guayacol.

### **3.3.Montaje experimental para mediciones electroquímicas**

Para la medición de los voltamperogramas cíclicos se realizó el montaje que muestra la Figura 9. Se utilizaron electrodos serigrafiados de grafeno y de nanopartículas de oro, conectados a un potenciostato AUTOLAB PGSTAT302N y los datos se procesaron mediante el software NOVA (NOVA 1.10.1.9 software para instrumentos Autolab)

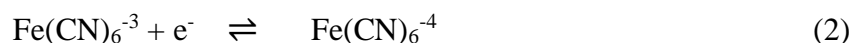
#### **Figura 10**

*A) Montaje experimental para medición de VC. B) Disposición de electrodo serigrafiado en el montaje experimental.*



### 3.4. Caracterización electroquímica de los electrodos serigrafados

Para caracterizar los electrodos se preparó una solución  $[K_3Fe(CN)_6]$  100mM como analito y se tomaron VCs variando la velocidad de barrido desde 10 [mV/s] hasta 400 [mV/s], en una ventana de potencial de -0,6 a 0,6 V vs Ag. Se utilizó ferricianuro de potasio con el fin de estudiar el comportamiento de los electrodos, pues este analito intercambia reversiblemente un electrón entre sus especies y la superficie del electrodo, lo que permite identificar claramente los picos de oxidación y reducción del hierro en el voltamperograma y utilizarlos como referencia para entender el carácter electroquímico de los electrodos. (Koç, Y., et al., 2021)



La variación en la velocidad de barrido se realizó como ensayo preliminar para ver el comportamiento de los electrodos y determinar una velocidad adecuada para las siguientes experimentaciones, antes de utilizar la MPO comercial.

### **3.5.Reducción bioelectrocatalítica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Con el fin de escoger una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apta para el trabajo se prepararon seis soluciones de peróxido de hidrógeno en buffer PBS 100mM pH 7, con concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2mM. Se trabajó el peróxido de hidrógeno como analito teniendo en cuenta que, ante una misma concentración de peróxido, la señal de corriente aumentará conforme mayor sea la cantidad de enzima catalizando la reducción de este compuesto, lo que nos ofrece una medida indirecta de la concentración de MPO en el medio estudiado.

Previo al análisis se dispuso 8uL de MPO comercial [10U] y se dejó secar sobre la superficie de los electrodos serigrafiados de grafeno y de nanopartículas de oro durante aproximadamente 1 hora, para posteriormente ser analizados mediante VC con barrido de potencial entre [-1 a 1V vs Ag] a una velocidad de barrido de 0.150 [V/s]. Se trabajó con esta velocidad teniendo en cuenta el análisis anterior con el ferricianuro de potasio.

### **3.6.Estudio del efecto de la velocidad de barrido sobre la bioelectroreducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Después de determinar la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más adecuada para ser el sustrato de la MPO se utilizó la concentración de peróxido de hidrógeno escogido en el punto anterior como sustrato y se tomaron VCs variando la velocidad desde 0.010 [V/s] hasta 0.400 [V/s], en una ventana de potencial de -1 a 1V vs. Ag, con el fin de estudiar la relación entre las corrientes anódicas y catódicas, y elegir una velocidad adecuada para los análisis posteriores de muestras reales, teniendo en cuenta la interacción enzima-sustrato.

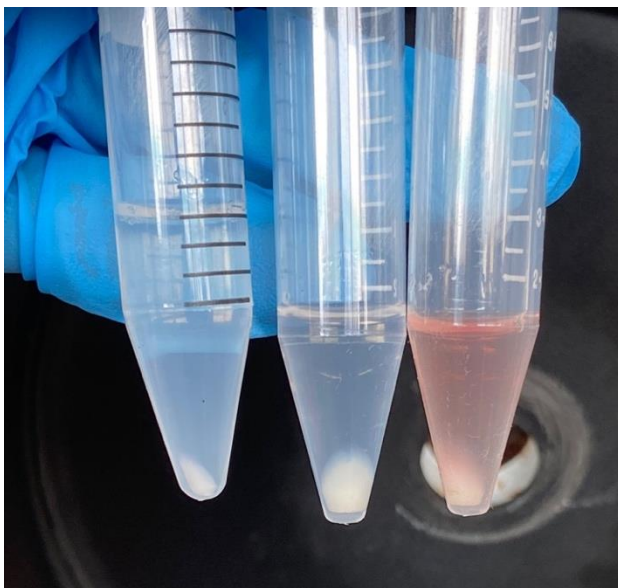
### **3.7.Obtención de muestras de saliva**

Con el apoyo de la doctora Silvia Rizo del centro odontológico de la clínica Carlos Ardila Lulle se recogieron 30 muestras de saliva de pacientes con y sin enfermedad periodontal, quienes

previamente firmaron una carta de consentimiento (ver anexo 1) permitiendo el análisis de estas e informando de posibles enfermedades de factores de riesgo. Las muestras de saliva se tomaron en las mañanas, se almacenaron en tubos Falcon de 15mL a 4°C y se analizaron dentro de las 24 horas siguientes a la toma de muestras. Previo al análisis, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 gravedades durante 20 minutos.

### **Figura 11**

*Muestras de saliva centrifugadas de pacientes sin EP (transparente) y de paciente con EP (rojo).*



### **3.8. Medición de MPO en muestras de saliva**

Para el análisis electroquímico de las muestras de saliva, se depositaron 16uL de sobrenadante de saliva, que se dejó absorber sobre cada electrodo durante 2 a 4 horas. Después del secado de la muestra, se dispuso el electrodo en el montaje de la Figura 9, y sobre su superficie se agregaron 20uL de una solución 0.5mM de peróxido de hidrógeno disuelto en buffer PBS 100mM. Cada muestra fue analizada mediante un VC entre [-1,1V vs Ag], con velocidad de barrido de

0.150 [V/s]. Se trabajó con esta velocidad teniendo en cuenta el análisis hecho sobre los resultados obtenidos del punto 3.6.

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. Medición de la actividad enzimática de MPO

La medición de la actividad enzimática nos permite caracterizar el rendimiento de la enzima de interés. Según la definición de Roberts y Gibb (2013), la actividad enzimática describe la velocidad de la reacción en términos de unidades ( $U$ ) que expresan los micromoles de sustrato transformado por minuto. Los datos mostrados en la tabla 3 corresponden a los arrojados por parte del espectrofotómetro.

**Tabla 3**

*Datos de actividad enzimática obtenidos en el espectrofotómetro.*

Nº Medida	Actividad [U]
1	5.22
2	4.59
3	4.71
<b>Promedio</b>	4.84

Partiendo de la ecuación (3) se llegó a una ecuación que permitió calcular la actividad enzimática expresada en micromoles por minuto. Con este desarrollo se encontró que la actividad de la mieloperoxidasa fue 4,84 unidades.

$$A = \epsilon bc \quad (3)$$

$$\frac{dA}{dt} = \epsilon b \frac{dC}{dt} \quad (4)$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\left(\frac{dA}{dt}\right)}{\epsilon b} \quad (5)$$

$$\frac{dC}{dt} \cdot V = U = \frac{\left(\frac{dA}{dt}\right)}{\epsilon b} \cdot V \quad (6)$$

$$U = 4.84 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \quad (7)$$

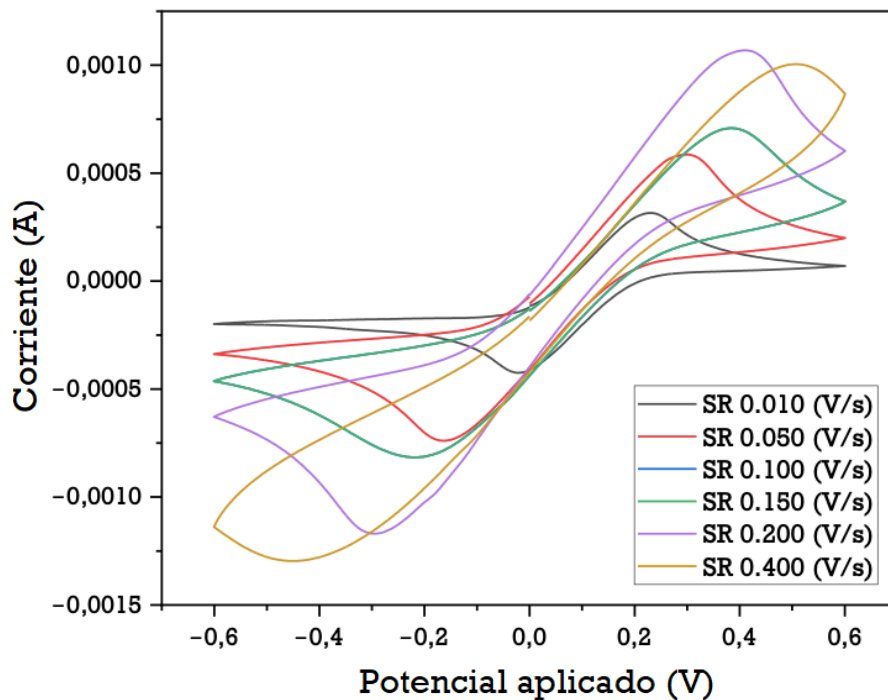
Siendo  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del guayacol ( $26,6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $b$  el paso óptico (1 cm) y  $C$  la concentración del sustrato.

#### 4.2. Caracterización electroquímica de los electrodos serigrafiados

La reversibilidad electroquímica de los electrodos describe la velocidad de la transferencia de electrones sobre los electrodos. Esto se caracterizó cualitativamente mediante VC de ferricianuro de potasio empleando diferentes velocidades de barrido.

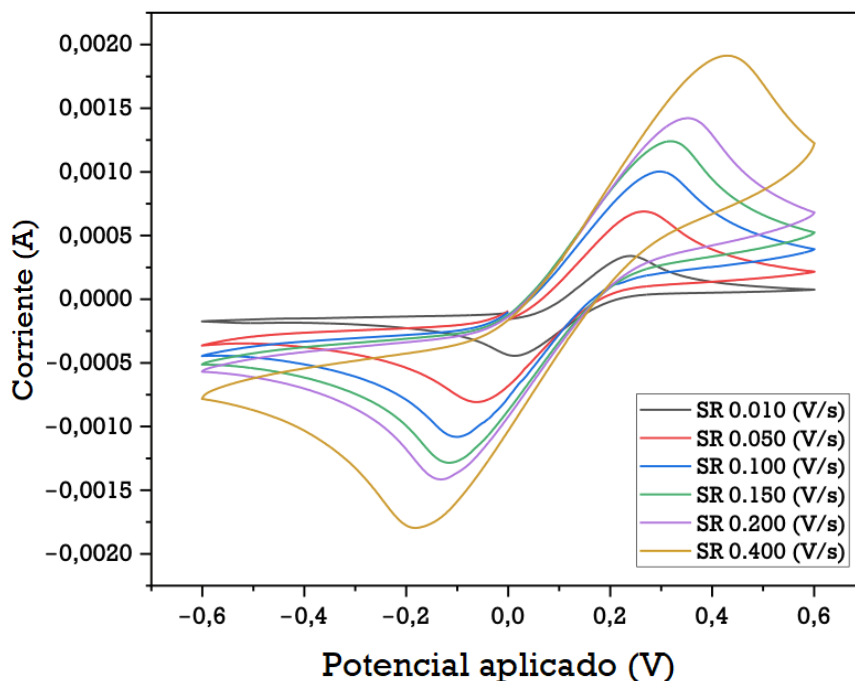
#### Figura 12

VC de ferricianuro de potasio en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro con variación de velocidad de barrido de potencial desde 0.010 a 0.400  $\text{Vs}^{-1}$ .



**Figura 13**

VC de ferricianuro de potasio en electrodo serigrafiado de grafeno con variación de velocidad de barrido de potencial desde 0.010 a 0.400 Vs<sup>-1</sup>.



Los VCs de las figuras 12 y 13 presentan dos picos electroquímicos definidos, donde el pico negativo corresponde a la reducción electroquímica del ión  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  y el pico positivo corresponde a la oxidación del ion  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  y ambas especies se encuentran en la capa de difusión.

Es posible ver que los picos no permanecen en un potencial constante cuando se varía la velocidad de barrido de potencial, como se esperaría en un sistema reversible. Contrario a esto, el pico catódico se ve desplazado hacia valores negativos a medida que la velocidad de barrido aumenta, esto refleja una constante de velocidad demasiado alta para la variación del potencial que no permite que se alcancen a reducir todas las especies presentes cerca al electrodo, siendo menor

la transferencia de masa, las especies quedan acumuladas en la superficie obstruyendo el flujo de corriente. Sin embargo, una constante de velocidad pequeña tampoco es óptima pues al no ser suficientemente grande para la variación del potencial del electrodo, la transferencia de electrones es más lenta que la transferencia de masa. El análisis anterior permite comenzar a inferir que se trata de un sistema casi reversible.

Para determinar la velocidad de barrido de potencial adecuada para los siguientes análisis electroquímicos se calculó la relación entre corriente catódica y anódica, de cada velocidad en ambos electrodos, sabiendo que en un sistema reversible ambas corrientes tienen la misma magnitud, es decir,  $I_{pA}/I_{pC} = 1$ , pero cuando se trata de un mecanismo casi reversible los picos de corriente son cercanos sin llegar a ser iguales.

**Tabla 4**

*Valores de corriente y voltaje de picos de VC de ferricianuro de potasio a diferentes velocidades en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro.*

<b>V.B [V/s]</b>	<b>IpA [A]</b>	<b>IpC [A]</b>	<b> IpA/IpC </b>	<b>VpA [mV]</b>	<b>VpC [mV]</b>	<b>ΔV [mV]</b>
0,01	0,000316	-0,000425	0,743405	229,492	21,973	207,52
0,05	0,000586	-0,000739	0,792819	297,852	163,574	134,277
0,1	0,000708	-0,000816	0,867988	383,301	217,285	166,016
0,15	0,000961	-0,001053	0,912779	378,418	268,555	109,863
0,2	0,001069	-0,00117	0,913645	410,156	295,41	114,746
0,4	0,001005	-0,001296	0,775135	505,371	449,219	56,152

*Nota.* V.B.: velocidad de barrido, IpA: corriente en pico anódico, IpC: corriente en pico catódico, VpA: voltaje en pico anódico, VpC: voltaje en pico catódico.

**Tabla 5**

*Valores de corriente y voltaje de picos de VC de ferricianuro de potasio a diferentes velocidades en electrodo serigrafiado de grafeno.*

V.B [V/s]	IpA [A]	IpC [A]	IpA/IpC	Volt.A [mV]	Volt.C [mV]	$\Delta V$ [mV]
0,01	0,00034	-0,000445	0,76366	239,258	12,207	227,051
0,05	0,000689	-0,000808	0,852663	266,113	61,035	205,078
0,1	0,001003	-0,001081	0,927724	297,852	100,098	197,754
0,15	0,001241	-0,001284	0,966017	319,824	117,188	202,637
0,2	0,001422	-0,001415	1,004743	351,563	131,836	219,727
0,4	0,001913	-0,001797	1,064889	429,688	183,105	246,582

*Nota.* V.B.: velocidad de barrido, IpA: corriente en pico anódico, IpC: corriente en pico catódico, VpA: voltaje en pico anódico, VpC: voltaje en pico catódico.

La información de las tablas 4 y 5 permiten confirmar que se trata de un mecanismo casi reversible, es decir, las especies oxidadas y reducidas se encuentran presentes en la superficie del electrodo. La velocidad de barrido de potencial que arrojó una relación entre corriente anódica y catódica más cercana a 1 fue la de 0,150 [V/s], en ambos electrodos. Así mismo fue esta velocidad la que presentó una distancia, ligeramente, menor entre sus picos de potencial anódico y catódico. Lo que llevó a elegir dicha velocidad para evaluar el comportamiento y escoger un sustrato adecuado para llevar a cabo los siguientes experimentos.

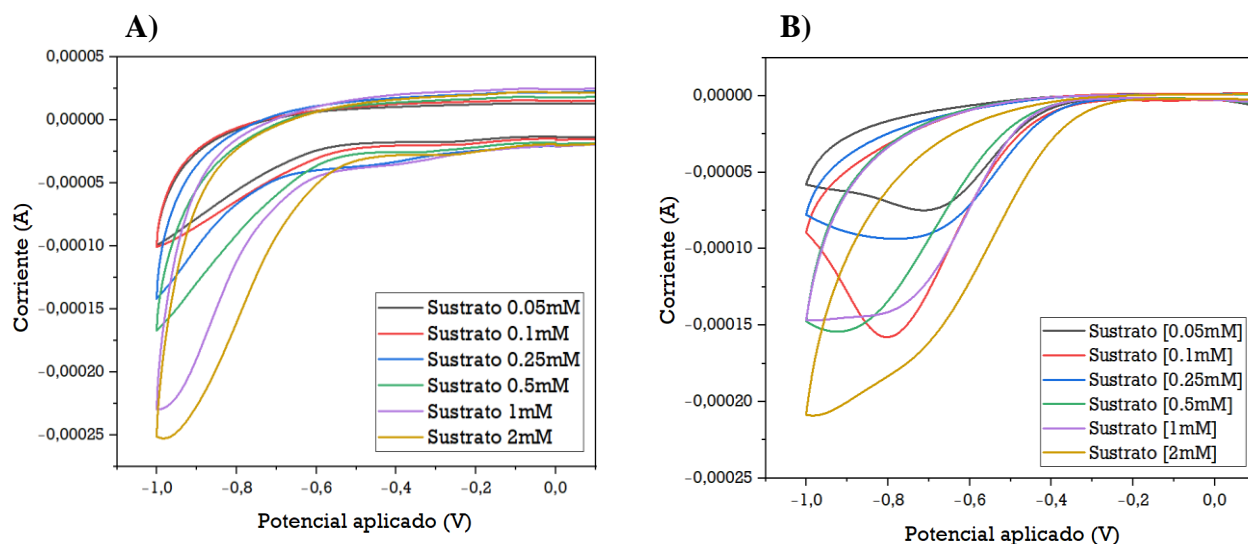
#### **4.3. Elección de la concentración del sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Una elección adecuada de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es ideal para obtener un rendimiento óptimo por parte de la enzima. Una solución muy concentrada puede activar la inhibición enzimática por el exceso de sustrato, frenando la reacción catalizada y obstaculizando con ello la transferencia de carga generada por la interacción enzima-sustrato (Breed et al. 2010). Esto se traduciría en un sesgo de información como consecuencia de la disminución en la corriente reportada.

Con el objetivo de escoger una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  apta para el trabajo se evaluó el comportamiento de seis soluciones de concentraciones entre 0.05mM y 2mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en buffer PBS 100mM pH 7.0 mediante VC.

### Figura 14

VC con variación de concentración de peróxido de hidrógeno en presencia de MPO de [-1 a 1V vs Ag] en electrodo serigrafado de A) Grafeno B) Nanopartículas de oro

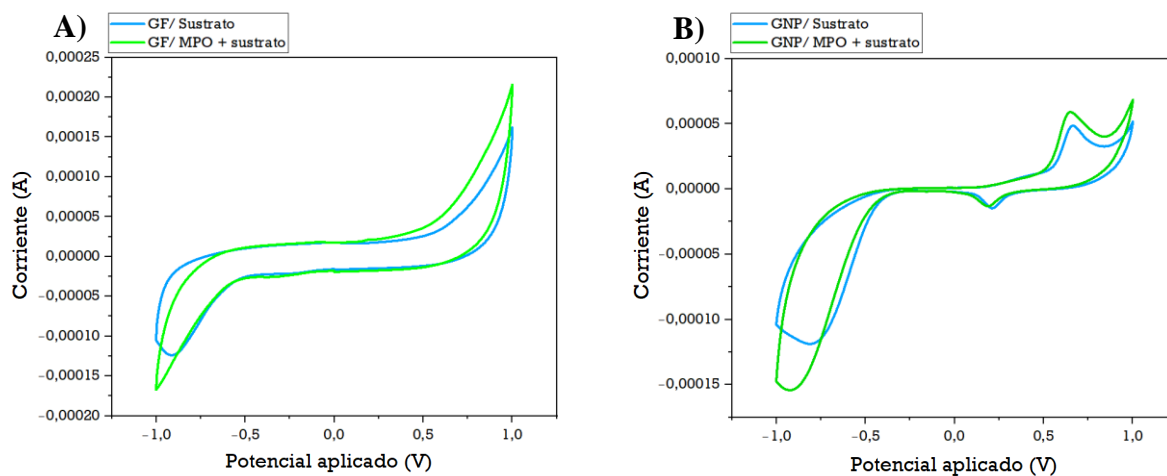


En los VCs de la Figura 14 es notable el aumento de la corriente en el pico catódico al suministrar una mayor concentración de peróxido en los electrodos, cada uno de ellos cubierto con la misma concentración de enzima. Este comportamiento descarta la aparición de una posible inhibición, por lo que cualquier sustrato dentro de este rango de concentraciones sería óptimo para desarrollar el experimento. Ahora bien, comparando los VCs obtenidos para cada sustrato, se seleccionó el sustrato de concentración 0.5mM puesto que es el que describe una mejor simetría. Este perfil es considerado óptimo ya que representa una respuesta electroquímica mejor controlada, reproducible y con menor probabilidad de generar alteraciones en las lecturas.

Una vez seleccionada la concentración del sustrato, se estudió su comportamiento en presencia y ausencia de la enzima. En la figura 15 se observa dicha caracterización, en la que se aprecia un aumento en la corriente catódica una vez se tiene la enzima adherida a la superficie de los electrodos lo que se percibe como una respuesta favorable que representa la acción catalizadora de la MPO en presencia de  $H_2O_2$ .

**Figura 15**

*VC de peróxido de hidrógeno [0.5mM] solo y en presencia de MPO comercial [10U/mg] de [-1 a 1V vs Ag] en electrodo serigrafado de A) Grafeno B) Nanopartículas de oro*

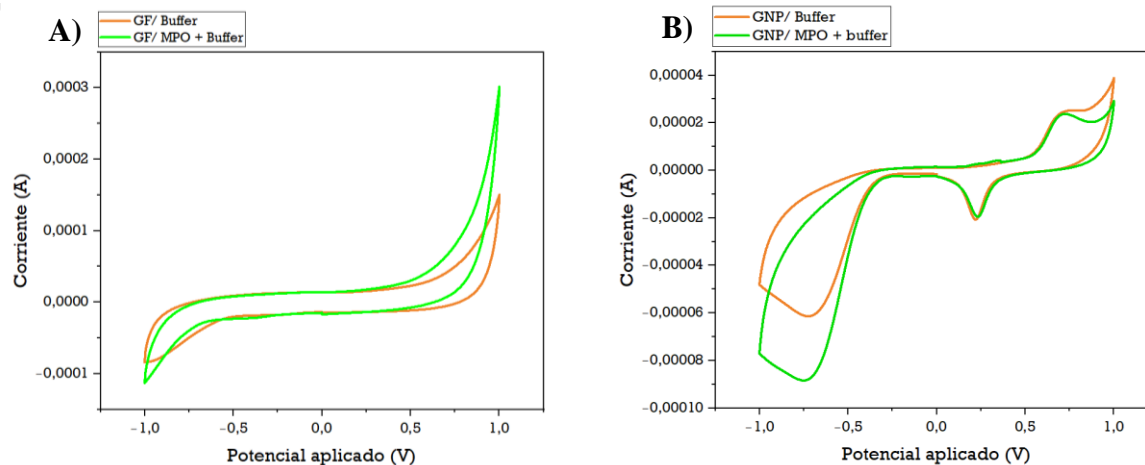


#### 4.3.1. Efecto del buffer

Se preparó buffer PBS 100mM pH 7, que fue utilizado en todos los análisis electroquímicos para la dilución del peróxido de hidrógeno. Con el fin de estudiar la presencia de posibles interferencias por parte del buffer se realizaron blancos con y sin MPO comercial con las mismas condiciones experimentales en ambos tipos de electrodo.

**Figura 16**

VC de buffer PBS pH 7 solo y en presencia de MPO comercial [10U/mg] de [-1 a 1V vs Ag] en electrodo serigrafiado de A) Grafeno B) Nanopartículas de oro



El buffer PBS es considerado un electrolito (Zhang et al., 2020), por lo que es previsible la existencia de una respuesta electroquímica como consecuencia del movimiento de iones en la solución. Para el caso del electrodo de nanopartículas de oro (figura 16B), llama la atención la aparición de picos entre 200 y 700mV, siendo importante resaltar que estos picos se aprecian en presencia y ausencia de la MPO, por lo que es posible atribuir esta señal a una interferencia directamente relacionada con la interacción electrodo-buffer. Es sabido que las nanopartículas de oro son susceptibles a la agregación cuando se encuentran en medios biológicos, presentando desafíos debido a su morfología (Gonçalves et al., 2021).

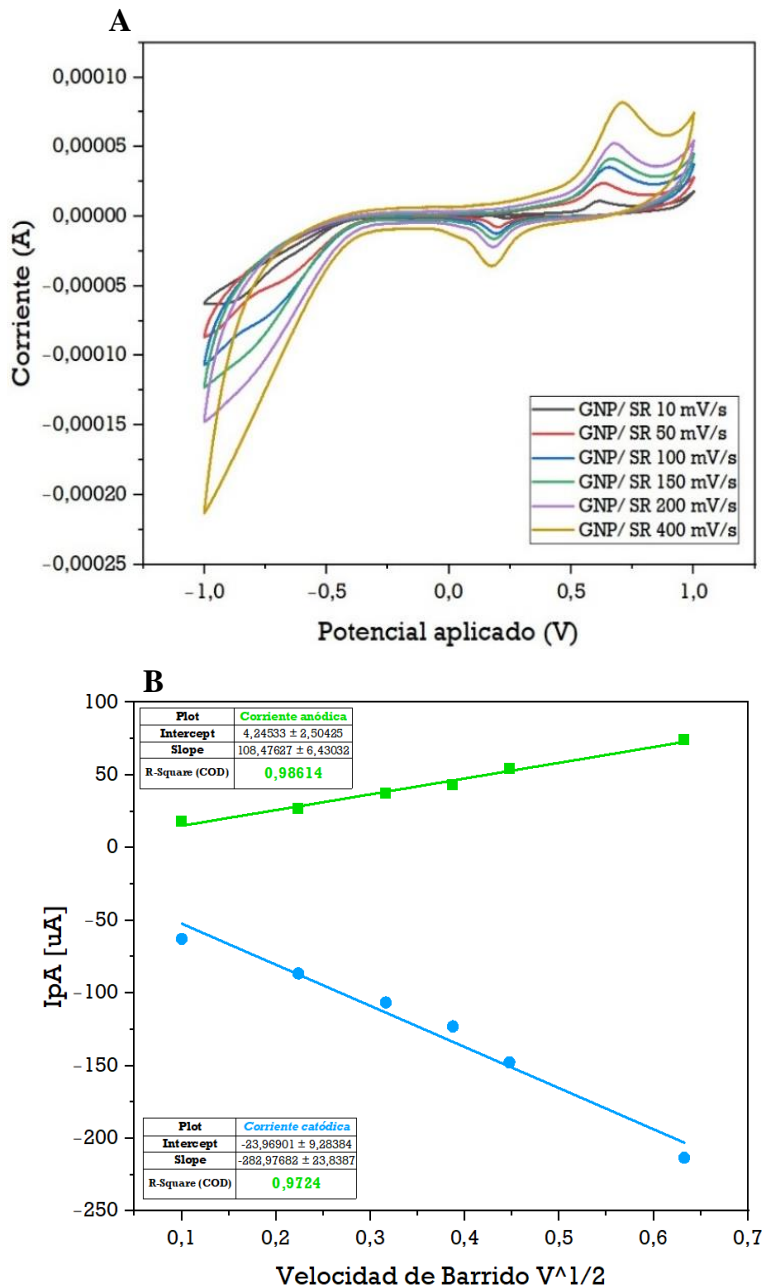
#### 4.4.Efecto de la velocidad de barrido en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La velocidad de barrido controla la rapidez en la variación del potencial aplicado sobre el electrodo. Una velocidad alta provoca disminución en el tamaño de la capa de difusión sobre el electrodo, y como consecuencia se observan mayores corrientes. Sin embargo, para que la reacción sea electroquímicamente reversible, la reacción debe darse en medio de una difusión libre de las

especies redox, esto se demuestra cuando se observa una relación lineal entre los picos de corriente y la raíz cuadrada de la velocidad.

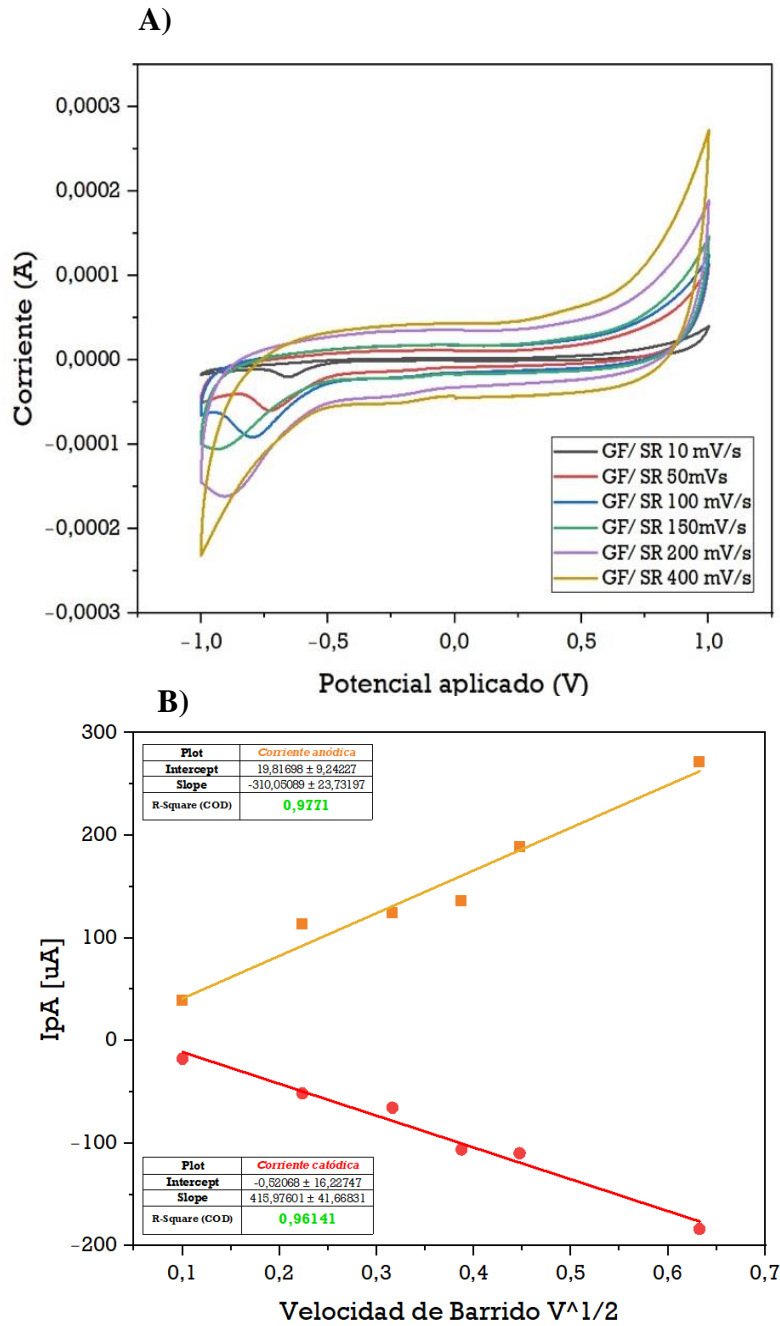
**Figura 17**

A) VC de la reducción de peróxido de hidrógeno [0.05 mM] catalizada por MPO a diferentes velocidades de barrido en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro. B) Relación lineal entre intensidad de corriente de los picos anódicos y catódicos contra la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.



**Figura 18**

A) VC de la reducción de peróxido de hidrógeno [0.05mM] catalizada por MPO a diferentes velocidades de barrido en electrodo serigrafado de grafeno. B) Relación lineal entre intensidad de corriente de los picos anódicos y catódicos contra la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.



**Tabla 6**

Valores de corriente de picos anódico y catódico de VC de la reducción de peróxido de hidrógeno en presencia de MPO a diferentes velocidades en electrodo serigrafiado de grafeno y de nanopartículas de oro.

V.B. [V/s]	Electrodo de grafeno			Electrodo de nanopartículas de oro		
	IpA [ $\mu$ A]	IpC [ $\mu$ A]	IpA/IpC	IpA ( $\mu$ A)	IpC ( $\mu$ A)	IpA/IpC
0,01	39,474	-17,682	2,2325	17,981	-62,744	0,2866
0,05	113,19	-51,575	2,1947	26,917	-86,517	0,3111
0,1	124,39	-65,43	1,9011	37,213	-106,598	0,3491
0,15	135,844	-106,11	1,2802	43,054	-123,016	0,35
0,2	188,507	-109,741	1,7177	54,474	-147,675	0,3689
0,4	271,851	-183,777	1,4792	74,371	-213,44	0,3484

Nota. V.B.: velocidad de barrido, IpA: corriente en pico anódico, IpC: corriente en pico catódico, VpA: voltaje en pico anódico, VpC: voltaje en pico catódico.

Se utilizó la concentración de peróxido de hidrógeno de [0.05mM] que actuaría como sustrato de la MPO, se tomó una serie de VC de la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de la MPO con variación de la velocidad de barrido de potencial, con el fin de determinar una velocidad adecuada para el análisis posterior de las muestras reales con base en la interacción de la MPO y su sustrato, el peróxido de hidrógeno.

La figura 17 A) muestra los VC medidos en el electrodo de nanopartículas de oro de [-1 a 1V vs Ag], donde es posible apreciar que al aumentar la velocidad de barrido también aumenta la corriente del sistema, y se demuestra en la gráfica de la figura 17 B) donde se aprecia la relación lineal entre la corriente anódica ( $R^2 = 0,9861$ ) y corriente catódica ( $R^2 = 0,9724$ ) respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Sin embargo, se puede ver que los mayores valores de corriente se observan en la zona de reducción, y son menores las corrientes en la zona de oxidación, lo cual sugiere que en este electrodo la reacción redox está regida por la difusión de las especies. Esto puede deberse a que se trata de la reducción del  $H_2O_2$  catalizada por la MPO, entendiendo que el analito en el primer momento del VC pasa por la corriente negativa siendo reducido en su totalidad sin embargo no ocurre la oxidación de la especie por completo, probablemente siendo una reacción casi reversible. Esto se refleja en la tabla 6 donde se ven los valores de las corrientes de los picos catódicos y anódicos, y la relación entre ellas, mostrando que ninguna relación entre corrientes se acerca a 1, es decir que no hubo la misma cantidad de especies reducidas y oxidadas. (Elgrishi, N., et al., 2018)

Para el caso del electrodo de grafeno, en la figura 18 se muestran los VC tomados de [-1 a 1V vs Ag] con 6 variaciones de velocidad de barrido de potencial, donde se puede apreciar mayor simetría en la forma de los voltamperogramas, mostrando un mejor comportamiento de la reacción de reducción del  $H_2O_2$  catalizada por la MPO, pues en la tabla 6 se aprecia que los picos de corrientes catódicas y anódicas fueron semejantes, especialmente para el caso de la velocidad de 0,150 [V/s] donde la relación fue más cercana a 1, y por lo cual se eligió esta velocidad de barrido de potencial como parámetro para los siguientes VC de muestras reales.

#### **4.5. Medición de MPO en muestras de saliva**

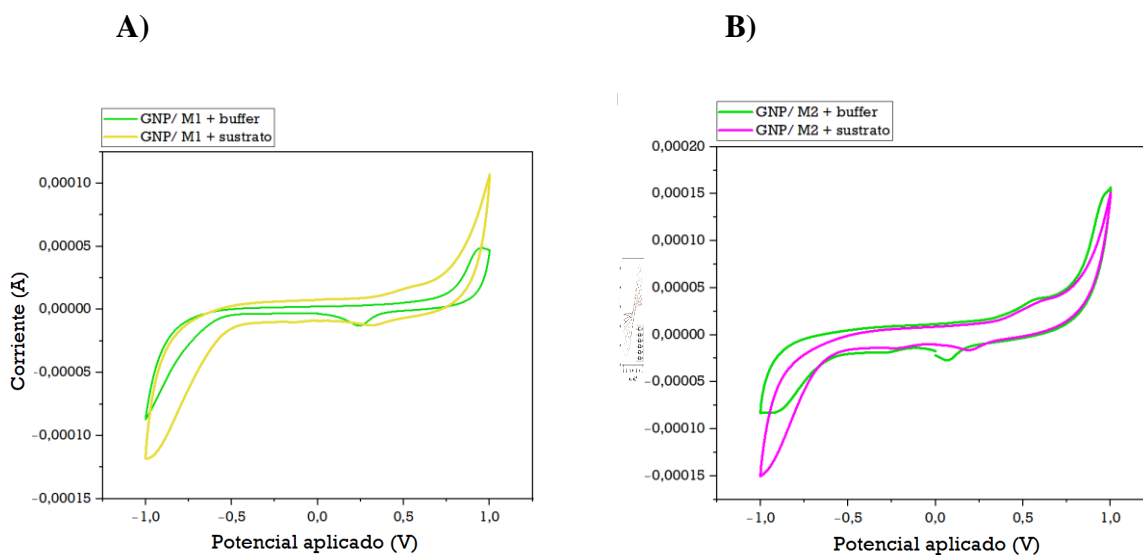
##### ***4.5.1. Estudios preliminares***

Una vez se comprobó la existencia de un incremento significativo en la reducción del peróxido de hidrógeno en presencia de la enzima, se inició el análisis preliminar con dos muestras reales de saliva (M1 y M2) (figura 19), se midieron dos VC para cada muestra, uno en presencia de buffer y el otro con peróxido de hidrógeno, con el fin de verificar que sí se está detectando la

MPO disuelta en un fluido biológico tan diverso en sus componentes como lo es la saliva, viéndose reflejado en el aumento de la señal de corriente generada cuando el  $H_2O_2$  está presente.

### Figura 19

VC de muestras reales de saliva preliminares A) Muestra 1 B) Muestra 2, en electrodo de nanopartículas de oro con y sin peróxido de hidrógeno [0.5mM]

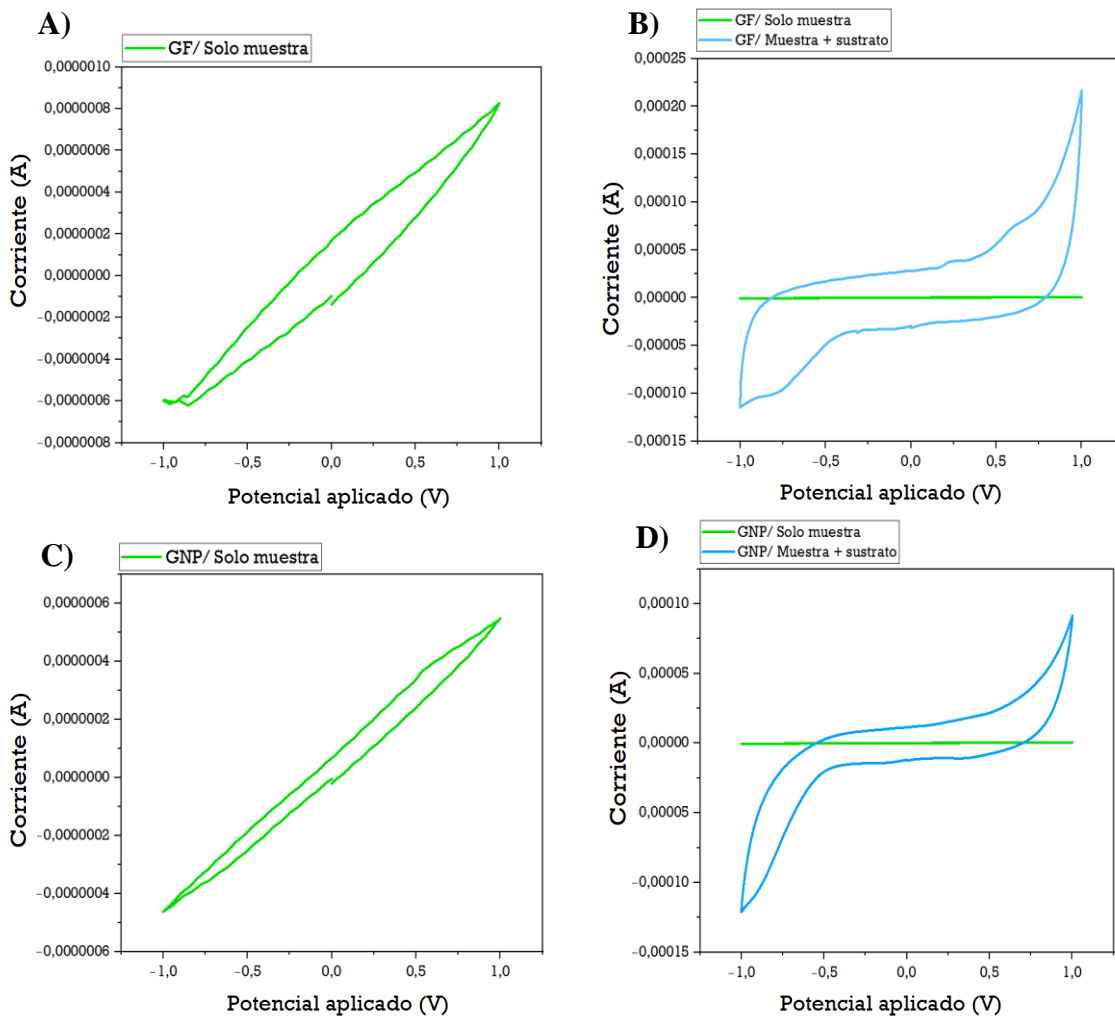


Es posible ver en la figura 19 que los VC de las muestras producen una señal de corriente catódica mayor cuando la muestra se encuentra en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que sugiere que probablemente la MPO está catalizando la reducción del peróxido y que la elección del sustrato permite la selectividad de la enzima en la saliva. Además, las muestras analizadas en la figura 19 B), se tratan de un fumador activo (M2) contra la muestra de una persona sin comorbilidades conocidas ni otros factores que estimulen considerablemente la evolución de una EP (M1) (Pizzorno, et al., 2016), lo anterior se sabe por declaraciones de las personas que dispusieron las muestras para el estudio. Se hace esta aclaración pues comparando los VC de la

M1 y M2 fue posible percibir un aumento significativo en la señal de la corriente catódica en la muestra de la persona fumadora activa. Este resultado es consistente con las expectativas teóricas, ya que se espera una mayor presencia de MPO en un individuo más susceptible a contraer la enfermedad por la influencia de comorbilidades y factores de riesgo, como lo es el tabaquismo (Nesbit et al., 2017; Polizzi et al., 2020), lo que se observa como una señal de corriente más alta generada por el incremento de las interacciones MPO-sustrato y permite continuar con el estudio.

### Figura 20

*VC de M1 sola y con peróxido de hidrógeno en electrodo serigrafado de A) y B) grafeno C) y D) nanopartículas de oro.*



Además, también se realizó el VC de las muestras M1 y M2 solas sin buffer, y se muestran en la figura 20. Esto con el fin de verificar que la saliva por sí sola no genera una señal significativa al ser sometida a una diferencia de potencial y que, probablemente, lo que está provocando la señal de corriente es la interacción de la MPO en saliva con su sustrato, el peróxido de hidrógeno, al catalizar su reducción.

#### 4.5.2. Muestras de participantes del estudio

En la etapa final de este proyecto se recolectaron 6 muestras al azar en el campus central de la Universidad Industrial de Santander y 29 muestras de pacientes del consultorio odontológico de la Clínica Carlos Ardila Lulle.

**Tabla 7**

*Muestras recolectadas con su respectiva clasificación y posible factor de riesgo.*

<b>Muestra</b>	<b>Estado del paciente</b>	<b>Factor de riesgo</b>
<i>A1</i>	no clasificado	No aplica
<i>L1</i>	no clasificado	<b>Fumador</b>
<i>S1</i>	no clasificado	No aplica
<i>A2</i>	no clasificado	No aplica
<i>M2</i>	no clasificado	<b>Fumador</b>
<i>N2</i>	no clasificado	No aplica
<i>A3</i>	presencia de EP	No aplica
<i>E3</i>	presencia de EP	No aplica
<i>G3</i>	presencia de EP	<b>Diabetes</b>
<i>B4</i>	<b>no presenta EP</b>	<b>E. cardiovascular</b>
<i>L4</i>	<b>no presenta EP</b>	No aplica
<i>C4</i>	<b>no presenta EP</b>	No aplica
<i>J5</i>	presencia de EP	<b>Gingivitis</b>
<i>M5</i>	presencia de EP	No aplica
<i>C6</i>	presencia de EP	No aplica
<i>M6</i>	presencia de EP	<b>Gingivitis</b>
<i>S6</i>	presencia de EP	No aplica
<i>FM7</i>	presencia de EP	No aplica
<i>FP7</i>	presencia de EP	<b>Gingivitis</b>

<i>LA7</i>	presencia de EP	<b>Gingivitis</b>
<i>LU7</i>	presencia de EP	<b>Diabetes</b>
<i>S7</i>	presencia de EP	No aplica
<i>A8</i>	presencia de EP	<b>E. cardiovascular</b>
<i>F8</i>	presencia de EP	<b>E. cardiovascular</b>
<i>H8</i>	presencia de EP	<b>E. cardiovascular</b>
<i>M8</i>	presencia de EP	No aplica
<i>S8</i>	presencia de EP	No aplica
<i>Y8</i>	presencia de EP	<b>E. cardiovascular</b>
<i>E9</i>	<b>no presenta EP</b>	No aplica
<i>I9</i>	no clasificado	No aplica
<i>JA9</i>	presencia de EP	No aplica
<i>JR9</i>	presencia de EP	No aplica
<i>JU9</i>	presencia de EP	<b>Diabetes</b>
<i>N9</i>	<b>no presenta EP</b>	<b>Diabetes</b>
<i>Y9</i>	presencia de EP	No aplica

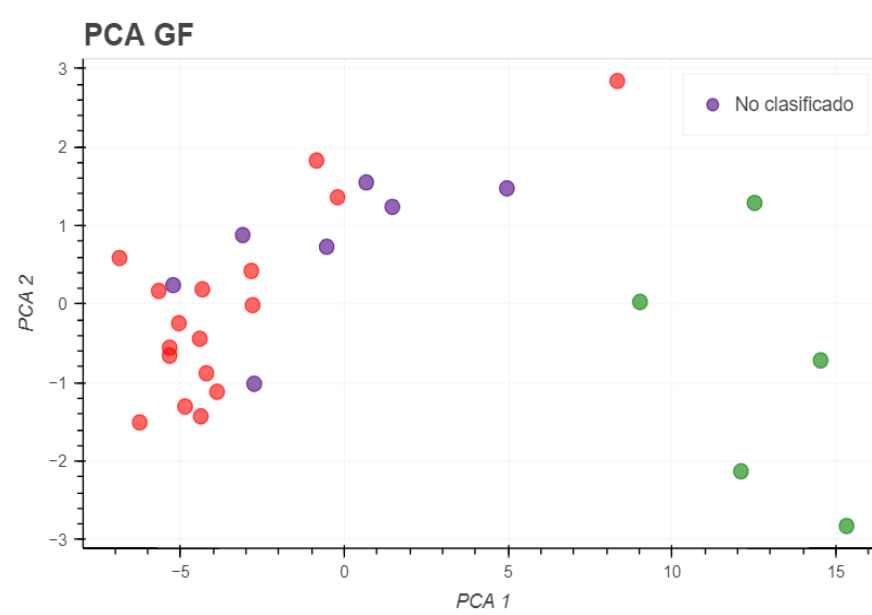
---

Con los valores de corriente generados por cada muestra se realizó un análisis de componentes principales (PCA), con el fin de segregarlas en grupos según la condición de los pacientes y ver si la respuesta de corriente era un parámetro útil para esta agrupación.

Las muestras tomadas en el campus se etiquetaron como ‘no clasificadas’, ya que los participantes no eran conscientes sobre el estado de su salud periodontal. Las muestras tomadas en el consultorio odontológico se etiquetaron según la presencia (verde) o ausencia (rojo) de EP teniendo en cuenta el estado del periodonto registrado por el personal médico en el consentimiento informado.

**Figura 21**

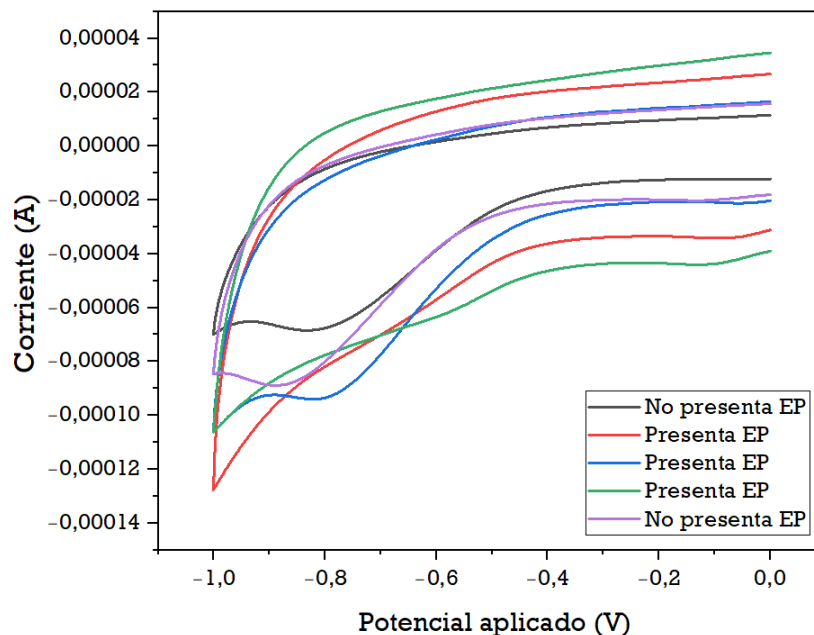
*PCA de muestras analizadas en electrodo serigrafiado de grafeno.*



El análisis de PCA permitió hacer la distribución de las muestras respecto a su condición de presencia y ausencia de EP. Se pudo percibir que la segregación de muestras en el electrodo de nanopartículas de oro (figura 22) fue más dispersa, es decir, menos precisa en comparación con la de los electrodos de grafeno (figura 21) que este sí agrupó las muestras respecto a su condición, es decir que las corrientes detectadas según las muestras fueron significativas según los niveles de MPO presentes en ellas. Esto se podría interpretar como una mayor sensibilidad para la detección de niveles de MPO en las muestras de saliva en el electrodo de grafeno. La falta de sensibilidad en los análisis sobre el electrodo de nanopartículas de oro se puede entender como consecuencia de la alteración del paso de la corriente por el electrodo ocasionada por la interferencia, o falta de interacción, que se genera al tener las nanopartículas de oro de la superficie del electrodo en contacto con un medio biológico (Pinilla-Torres et al., 2023).

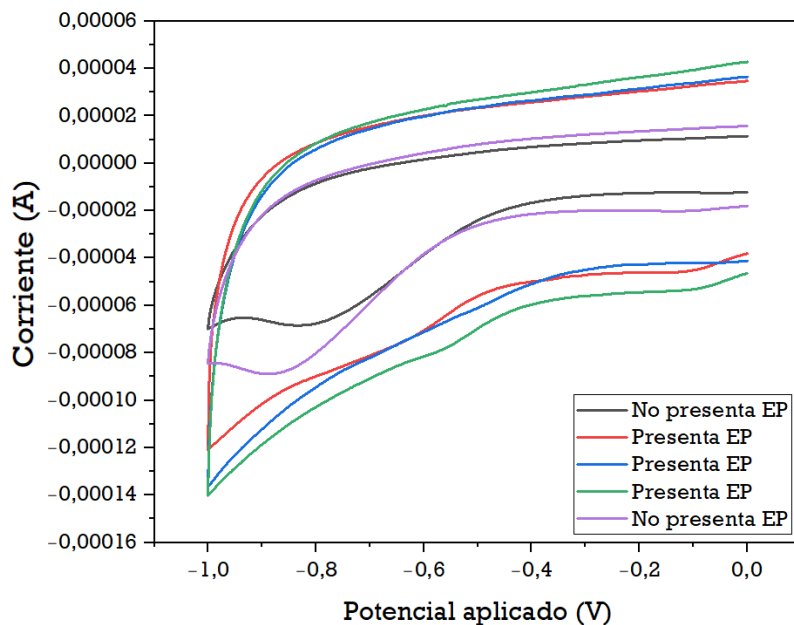
### Figura 23

*VC de 5 muestras de saliva representativas en presencia de peróxido de hidrógeno [0.5mM], con un barrido de potencial de [-1,1V vs Ag] a una velocidad de 0.150 [V/s] en electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro.*



**Figura 24**

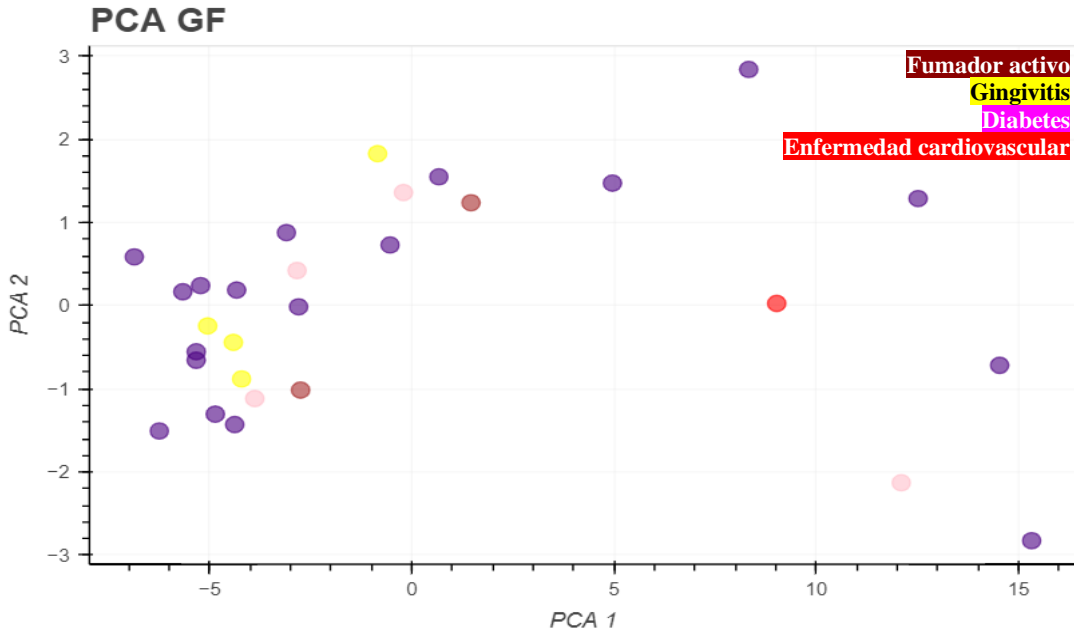
VC de 5 muestras de saliva representativas en presencia de peróxido de hidrógeno [0.5mM], con un barrido de potencial de [-1,1V vs Ag] a una velocidad de 0.150 [V/s] en electrodo serigrafado de grafeno.



En las figuras 23 y 24 se graficó la zona de reducción de un conjunto de muestras analizadas en ambos electrodos. En teoría, se espera una señal más alta en individuos que presentan EP puesto que supone la presencia de una mayor concentración de enzima, lo que implica una mayor velocidad de reacción y en consecuencia una corriente más alta. Con esta consideración en mente podemos decir que las muestras analizadas en electrodo de grafeno se pudieron distribuir de una mejor manera en el PCA gracias a que esto se cumple y la diferencia en las corrientes se percibe con facilidad. En contraste, en el electrodo de nanopartículas de oro es común ver que los voltamperogramas se superponen y tienden a presentar mayor interferencia, logrando que la diferenciación en las señales no sea precisa.

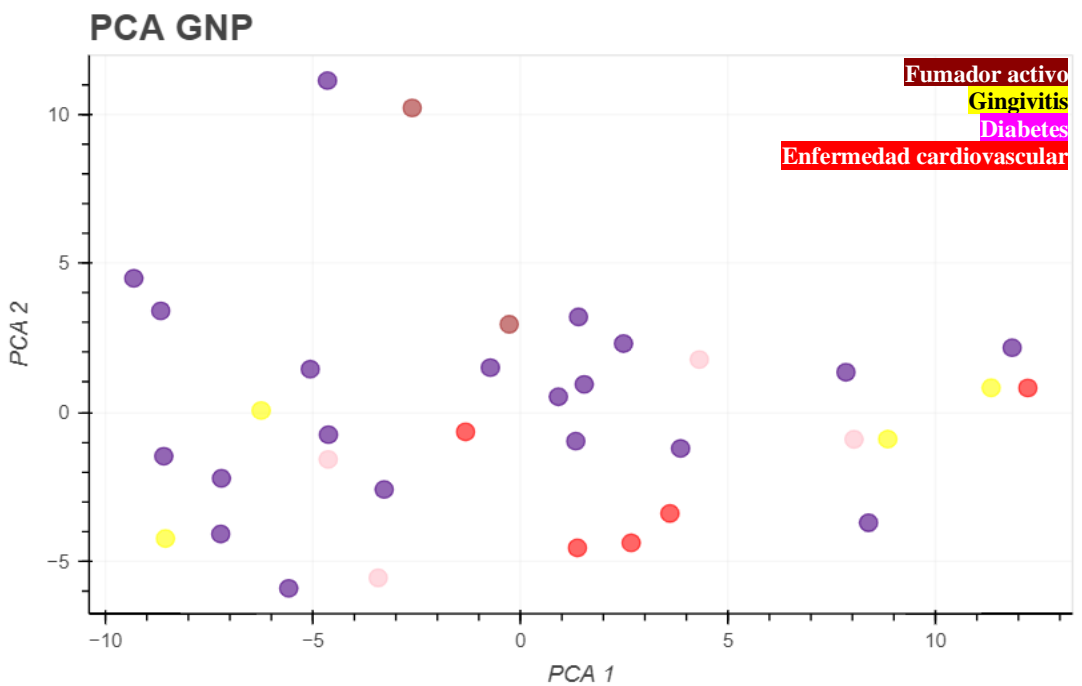
**Figura 25**

*PCA de muestras analizadas en electrodo serigrafado de grafeno clasificadas según la condición del paciente.*



**Figura 26**

*PCA de muestras analizadas en electrodo serigrafado de nanopartículas de oro clasificadas según la condición del paciente.*



Además, en las figuras 25 y 26 se muestra el análisis de PCA para cada electrodo, pero con las muestras etiquetadas según la presencia de comorbilidades y otros factores que estimulan el desarrollo de una EP (Nesbit et al., 2017; Polizzi et al., 2020). Se observa que, los fumadores activos y los individuos con gingivitis muestran una clara tendencia a la presencia de una EP, pues se ubican en el mismo sector que los pacientes con EP analizados (ver figura 21). Sin embargo, este no fue el caso para pacientes con enfermedad cardiovascular y diabetes. Esto se entiende gracias a que es probable que el diagnóstico de gingivitis o el hecho de que la persona sea fumadora activa implica una afectación a la salud del periodonto en tiempo real, mientras que las personas con diabetes y enfermedades cardiovasculares generalmente mantienen estas condiciones controladas con fármacos y tratamientos médicos, por lo que el diagnóstico de estas afecciones no es sinónimo de la ocurrencia actual de inflamación y estrés oxidativo, las cuales son causas principales de la evolución de una EP en un paciente con dichos diagnósticos (Takahiko et al., 2002; Shinjo y Nishimura, 2024), pues es posible que estas condiciones estén reguladas en el organismo del paciente durante el muestreo.

## CONCLUSIONES

---

El presente estudio ha arrojado resultados significativos sobre la eficacia de los electrodos serigrafados de grafeno y nanopartículas de oro, para la detección de enfermedad periodontal (EP) a través de muestras de saliva. La diferencia en la precisión de la distribución de las muestras entre los dos tipos de electrodos sugiere que el electrodo de grafeno podría ser más adecuado para este propósito. Esta disparidad podría atribuirse a la interferencia generada por las nanopartículas de oro en contacto con el medio biológico, lo que afecta la precisión de las mediciones. Los resultados del análisis de componentes principales (PCA) respaldan esta observación, mostrando una mejor diferenciación entre las muestras en el electrodo de grafeno en comparación con el de nanopartículas de oro. Además, al considerar factores como el tabaquismo y la gingivitis, se evidencia una asociación clara entre estos y la presencia de EP, lo que subraya la importancia de abordar estos factores de riesgo en la prevención y el manejo de la enfermedad periodontal. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para el futuro desarrollo de dispositivos de detección temprana de EP, destacando la necesidad de considerar la sensibilidad y precisión de los electrodos utilizados en estos dispositivos. En última instancia, estos hallazgos tienen el potencial de mejorar la atención clínica al permitir una detección más oportuna de EP con el desarrollo de métodos no invasivos, lo que podría conducir a mejoría en la salud y calidad de vida de los pacientes.

## REFERENCIAS

---

- 2017 Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions. (2022, 31 agosto). American Academy of Periodontology. <https://www.perio.org/research-science/2017-classification-of-periodontal-and-peri-implant-diseases-and-conditions/>
- Absi, H., Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *WIREs Computational Statistics*, 2, 433-459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>
- Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.*, 640, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
- Baggiolini, M., Bretz, U., Dewald, B., & Feigenson, M. E. (1978). The polymorphonuclear leukocyte. *Agents and Actions*, 8(1-2), 3-10. <https://doi.org/10.1007/bf01972395>
- Barbosa, V. L., Angst, P. D. M., Finger Stadler, A., Oppermann, R. V., & Gomes, S. C. (2016). Clinical attachment loss: estimation by direct and indirect methods. *International Dental Journal*, 66(3), 144-149. <https://doi.org/10.1111/idj.12218>
- Barhoumi, L., Baraket, A., Bellagambi, F.G., Karanasiou, G.S., Ali, M.B., Fotiadis, D.I., Bausells, J., Zine, N., Sigaud, M., Errachid, A. (2018) A novel chronoamperometric immunosensor for rapid detection of TNF in human saliva. *Sensors and Actuators B: Chemical*. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.135>
- Bascones-Martínez, A., & Figuero-Ruiz, E. (2005). Periodontal diseases as bacterial infection. *Avances En Periodoncia E Implantología Oral*, 17(3). <https://doi.org/10.4321/s1699-65852005000300002>

- Belting, S.M., Hiniker, J.J., Dummett, C.O. (1964). Influence of diabetes mellitus on the severity of periodontal disease. *J. Periodontol.* 35, 476–480
- Bertl, K., Pandis, N., Stopfer, N., Haririan, H., Bruckmann, C., & Stavropoulos, A. (2021). The impact of a “successfully treated stable periodontitis patient status” on patient-related outcome parameters during long-term supportive periodontal care. *Journal of Clinical Periodontology*. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13582>
- Botero, J., & Bedoya, E. (2010). Determinantes del diagnóstico periodontal. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 3(2), 94-99. <https://doi.org/10.4067/s0719-01072010000200007>
- Breed, C. M., Lieb, A., Nijhout, F. H. (2010). The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *Bioessays*, 32, 422-439. DOI 10.1002/bies.200900167
- Büyüктаş, D., Ghaani, M., Rovera, C., Carullo, D., Olsson, R.T., Korel, F., Farris, S. (2023). A screen-printed electrode modified with gold nanoparticles/cellulose nanocrystals for electrochemical detection of 4,4'-methylene diphenyl diamine. *Heliyon*, Volume 9, Issue 4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15327>
- Cano Luna, M. (2008). *Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras* [Tesis doctoral]. Universidad de Córdoba.
- Carlsson, J. (1987). Salivary peroxidase: an important part of our defense against oxygen toxicity. *J Oral Pathol*, 16, 412-416. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1987.tb02077.x>

- Choudhary, Y.S., Jothi, L., Nageswaran, G. (2017). *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization. Electrochemical Characterization*. 19–54. doi:10.1016/B978-0-323-46140-5.00002-9
- Cote, S. E., & Singh, H. (2007). Dental Diseases and Disorders. *Immigrant Medicine*, 597-610. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-03454-8.50049-8>
- Council of the British Society of Periodontology. (2019). Basic Periodontal Examination. British Society of Periodontology. [www.bsperio.org.uk](http://www.bsperio.org.uk)
- Dagar M, Deepa DK, Molly M, Sharma A, Khattak BP. (2015). Effect of nonsurgical periodontal therapy on salivary myeloperoxidase levels: A biochemical study. *J Indian Soc Periodontol*, 19(5). doi: 10.4103/0972-124X.162199
- Davies, M. J., & Hawkins, C. L. (2020). The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(13), 957-981. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8030>
- De Miguel-Infante, A., Martinez-Huedo, M.A., Mora-Zamorano, E., Hernández-Barrera, V., Jiménez-Trujillo, I., de Burgos-Lunar, C., Cardenas Valladolid, J., Jiménez-García, R., Lopez-de-Andrés, A. (2018). Periodontal disease in adults with diabetes, prevalence and risk factors. Results of an observational study. *Int. J. Clin. Pract.* DOI: 10.1111/ijcp.13294
- Deo, P.N. & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 23, 122. Disponible: [https://journals.lww.com/jpat/fulltext/2019/23010/oral\\_microbiome\\_\\_unveiling\\_the\\_fundamentals.25.aspx](https://journals.lww.com/jpat/fulltext/2019/23010/oral_microbiome__unveiling_the_fundamentals.25.aspx)

- Desser, R.K., Himmelhoch, S.R., Evans, W.H., Januska, M., Mage, M., and Shelton, E. (1972) Arch. Biochem. Biophys.,148, 452-465
- Dietrich, T., Ower, P., Tank, M., West, N. X., Walter, C., Needleman, I., Hughes, F. J., Wadia, R., Milward, M. R., Hodge, P. J., & Chapple, I. L. C. (2019). Periodontal diagnosis in the context of the 2017 classification system of periodontal diseases and conditions – implementation in clinical practice. *British Dental Journal*, 226. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2019.3>
- Doerge, D.R., Divi, R.L., Churchwell, M.I. (1997). Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *250(1)*, 10–17. doi:10.1006/abio.1997.2191
- EKE, P. I., Borgnakke, W. S., & Albandar, J. M. (2021). Measurement and Distribution of Periodontal Diseases. *Burt and Eklund’s Dentistry, Dental Practice, and the Community*, 171-188. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-55484-8.00015-0>
- Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T., Dempsey, J.L. (2018). A practical beginner’s guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*. 95 (2), 197-206 DOI: 10.1021/acs.jchemed.7b00361
- Engbretson, S., Vossughi, F., Hey-Hadavi, J., Emingil, G., Grbic, J. (2006). The influence of diabetes on gingival crevicular fluid bglucuronidase and interleukin-8. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 784–790. Disponible: [https://www.preserveyourteeth.com/forms/publications/SPE\\_JCP\\_2006\\_b\\_14.pdf](https://www.preserveyourteeth.com/forms/publications/SPE_JCP_2006_b_14.pdf). doi: 10.1111/j.1600- 051X.2006.00984
- Faggion, C.M., Cullinan, M.P., Atieh, M. (2016). An overview of systematic reviews on the effectiveness of periodontal treatment to improve glycaemic control. *J. Periodontal Res.* 51, 716–725. doi:10.1111/jre.12358

- Fiedler, T. J., Davey, C. A., & Fenna, R. E. (2000). X-ray Crystal Structure and Characterization of Halide-binding Sites of Human Myeloperoxidase at 1.8 Å Resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11964-11971. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11964>
- Furtmüller, P. G., Burner, U., & Obinger, C. (1998). Reaction of Myeloperoxidase Compound I with Chloride, Bromide, Iodide, and Thiocyanate. *Biochemistry*, 37(51), 17923-17930. <https://doi.org/10.1021/bi9818772>
- Ghallab, N. A. (2018). Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of Oral Biology*, 87, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.022>
- Gómez García, A., Rivera Rodríguez+, M., Gómez Alonso, C., Rodríguez Ochoa, D. Y., & Álvarez Aguilar, C. (2015). Myeloperoxidase Is Associated with Insulin Resistance and Inflammation in Overweight Subjects with First-Degree Relatives with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes & Metabolism Journal*, 39(1), 59. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.1.59>
- Gonçalves, J. P., da Cruz, A. F., Nunes, A. M., Meneghetti, M. R., de Barros H. R., Borges B. S., de Medeiros, L., Soares M. J., dos Santos M. P., Grassi M. T., Rossi, G. R., Bellan, D. L., Biscaia, S., Cristal A. M., Buzzo J., Ribeiro Y. C., Acco, A., Cardoso, M. B., Simas, F.F., ..., de Oliveira, C. C. (2021). Biocompatible gum arabic-gold nanorod composite as an effective therapy for mistreated melanomas. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 551-561. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.172>

- Huang, J., Milton, A., Arnold, R. D., Huang, H., Smith, F., Panizzi, J. R., & Panizzi, P. (2016). Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(4), 541-548. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru0615-256r>
- Jolliffe, I. T., Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Phil. Trans. R. Soc. A* 374. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Klangprapan, S., Chaiyarit, P., Hormdee, D., Kampichai, A., Khampitak, T., Daduang, J., Boonsiri, P. (2016). Salivary Myeloperoxidase, Assessed by 3,3'-Diaminobenzidine Colorimetry, Can Differentiate Periodontal Patients from Nonperiodontal Subjects. *Enzyme Research*, 1–6. [doi:10.1155/2016/7517928](https://doi.org/10.1155/2016/7517928)
- Koç, Y., Morali, U., Erol, S., & Avci, H. (2021). Investigation of electrochemical behavior of potassium ferricyanide/ferrocyanide redox probes on screen printed carbon electrode through cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. *Turkish journal of chemistry*, 45(6), 1895–1915. <https://doi.org/10.3906/kim-2105-55>
- Kumar, P., Reddy, J. & Babu, R. (2015). Biomarkers in periodontal disease. *Dental, Oral and Craniofacial Research*, 1(2), 48-52.
- Lalla, E., & Papapanou, P. N. (2011). Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(12), 738–748. [doi:10.1038/nrendo.2011.106](https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.106)

- Leppilahti, J., Hernández-Ríos, P., Gamonal, J., Tervahartiala, T., Brignardello-Petersen, R., Mäntylä, P., Sorsa, T., & Hernández, M. (2014). Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(4), 348–356. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12223>
- Liccardo, D., Cannavo, A., Spagnuolo, G., Ferrara, N., Cittadini, A., Rengo, C., & Rengo, G. (2019). Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1414; doi:10.3390/ijms20061414
- Loria, V., Dato, I., Graziani, F., Biasucci, L.M. (2008). *Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes. Mediators of Inflammation*, 1–4. doi:10.1155/2008/135625
- Lu L.L., Liu B., Xie G. (2010). Amperometric immunosensor for myeloperoxidase in human serum based on a multi-wall carbon nanotubes–ionic liquid–cerium dioxide film-modified electrode. *Bull Kor Chem Soc* 31(31):3259–3264. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2010.31.11.3259>
- Metrohm DropSens. Electroodos serigrafiados. Disponible: [https://www.dropsens.com/screen\\_printed\\_electrodes\\_pag.html](https://www.dropsens.com/screen_printed_electrodes_pag.html)
- Ministerio de salud y protección social. (2012). IV ESTUDIO NACIONAL DE SALUD BUCAL: ENSAB IV. En [minsalud.gov.co](http://minsalud.gov.co).
- Nandeshwar, R., & Tallur, S. (2024). Electrochemical detection of myeloperoxidase (MPO) in blood plasma with surface-modified electroless nickel immersion gold (ENIG) printed circuit board (PCB) electrodes. *Biosensors and bioelectronics*, volume 246. doi:10.1016/j.bios.2023.115891

Ndrepepa, G. (2019). Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.cca.2019.02.022

Nesbit, S. P., Broome, A., & Geist, S. M. R. (2017). Common diagnoses in dentistry. *Diagnosis and Treatment Planning in Dentistry*, 24-71.e12. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-28730-2.00011-x>

Nicu, E. A., & Loos, B. G. (2016). Polymorphonuclear neutrophils in periodontitis and their possible modulation as a therapeutic approach. *Periodontology* 2000, 71(1), 140-163. <https://doi.org/10.1111/prd.12113>

Nijakowski, K.; Jankowski, J.; Gruszczyński, D.; Surdacka, A. (2023). Salivary Alterations of Myeloperoxidase in Patients with Systemic Diseases: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 12078. <https://doi.org/10.3390/ijms241512078>

Ogunleye, R., Ukoha, O., Nasterska, W., McColl, E., Dantata, F., & Adetula, I. (2022). Necrotising periodontal diseases: an update on classification and management. *British Dental Journal*, 233(10), 855-858. <https://doi.org/10.1038/s41415-022-5201-y>

Organización Mundial de la Salud (17 de mayo de 2017). Enfermedades Cardiovasculares. Disponible: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Organización Mundial de la Salud, 2022. Informe sobre la situación mundial de la salud bucodental: hacia la cobertura sanitaria universal para la salud bucodental de aquí a 2030. Resumen ejecutivo. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- Organización Mundial de la Salud. (5 de abril de 2023). Diabetes. Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Ortega, S., Sendrós, S.K., De la cruz, M., Sin, C., Britos, M., Fernández, D. (2021). Diabetes y enfermedad periodontal. Facultad de Odontología, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.
- Palm, F., Lahdentausta, L., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Gokel, P., Bugge, F., Safer, A., Becher, H., Grau, A. J., & Pussinen, P. (2013). Biomarkers of periodontitis and inflammation in ischemic stroke: A case-control study. *Innate Immunity*, 20(5), 511-518. <https://doi.org/10.1177/1753425913501214>
- Patil, V.S., Patil, V.P., Gokhale, N., Acharya, A., Kangokar, P. (2016). Chronic Periodontitis in Type 2 Diabetes Mellitus: Oxidative Stress as a Common Factor in Periodontal Tissue Injury. *J. Clin. Diagn. Res.* 10, BC12–BC16. DOI: 10.7860/JCDR/2016/17350.7542
- Peng, L., Li, X., Li, Y., Zhao, W., Nie, S., Yu, H., Zhang, H. (2021). Increased concentrations of myeloperoxidase in serum and serum extracellular vesicles are associated with type 2 diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, 522, 70–76. doi:10.1016/j.cca.2021.08.010
- Peniche-Palma, D. C., Carrillo-Avila, B. A., Sauri-Esquivel, E. A., Acosta-Viana, K., Esparza-Villalpando, V., Pozos-Guillen, A., Martinez-Aguilar, V. M. (2019). Levels of Myeloperoxidase and Metalloproteinase-9 in Gingival Crevicular Fluid from Diabetic Subjects with and without Stage 2, Grade B Periodontitis. *BioMed Research International*, 1–8. doi:10.1155/2019/5613514
- Pinilla-Torres, A.M.; Sanchez-Dominguez, C.N.; Basilio-Bernabe, K.; Carrion-Garcia, P.Y.; Rocho-Perez, J.A.; Garza-Treviño, E.N.; Gallardo-Blanco, H.; Sanchez-Dominguez, M. (2023). Green Synthesis of Mesquite-Gum-Stabilized Gold Nanoparticles for Biomedical Applications:

Physicochemical Properties and Biocompatibility Assessment. *Polymers*, 15, 3533.  
<https://doi.org/10.3390/polym15173533>

Pizzorno, J. E., Murray, M. T., & Joiner-Bey, H. (2016). Periodontal disease. *The Clinician's Handbook of Natural Medicine*, 787-795. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-5514-0.00073-7>

Polizzi, A., Torrisi, S., Santonocito, S., Di Stefano, M., Indelicato, F., & Lo Giudice, A. (2020). Influence of Myeloperoxidase Levels on Periodontal Disease: An Applied Clinical Study. *Applied Sciences*, 10(3), 1037. <https://doi.org/10.3390/app10031037>

Roberts, S. M., Gibb, A. J. (2013). Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs en R. Ganelin, S. Roberts y R. Jefferis (Eds.), *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development* ( pp. 02-55). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00001-7>

Savage, A., Eaton, K. A., Moles, D. R., & Needleman, I. (2009). A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(6), 458-467. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2009.01408>.

Sen, S., Giamberardino, L. D., Moss, K., Morelli, T., Rosamond, W. D., Gottesman, R. F., Offenbacher, S. (2018). Periodontal disease, regular dental care use, and incident ischemic stroke. *Stroke*, 49, 355–362. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018990>

Shinjo, T., Nishimura, F. (2024). The bidirectional association between diabetes and periodontitis, from basic to clinic. *Japanese Dental Science Review*, 60, 15-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2023.12.002>

- Simões, F. R., & Xavier, M. G. (2017). Electrochemical Sensors. In *Elsevier eBooks* (pp. 155–178).  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-49780-0.00006-5>
- Sudhakara, P.; Gupta, A.; Bhardwaj, A.; Wilson, A. (2018). Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dent. J. (Basel)*. 6, 10. DOI: 10.3390/dj6020010
- Takahiko, N., Makiko, U., Kazuo, H., Van der Wal, A.C., Van der Loos, C.M., Itoh, A., Komatsu, R., Ikura, Y., Ogami, M. (2002). Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*, vol. 106, no. 23, pp. 2894–2900. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000042674.89762.20>
- Taleat, Z., Khoshroo, A., Mazloum-ardakani, M. (2014). *Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013)*. , 181(9-10), 865–891. doi:10.1007/s00604-014-1181-1
- Tao, Y., Zhao, Y., Wang, L., Huang, J., Chen, Y., Huang, Q., Song, B., Li, H., Chen, J., Liu. H. (2023). Flexible Amperometric Immunosensor Based on Colloidal Quantum Dots for Detecting the Myeloperoxidase (MPO) Systemic Inflammation Biomarker. *Biosensors* 13, no. 2: 255. <https://doi.org/10.3390/bios13020255>
- Teng, N., Maghzal, G.J., Talib, J., Rashid, I., Lau, A.K. & Stocker, R. (2017). The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Report*, 22:2, 51-73, DOI: 10.1080/13510002.2016.1256119
- Thomas B, Alva M, Ramesh A, Kumari S. (2010). Comparative evaluation of myeloperoxidase levels in healthy individuals and subjects with chronic periodontitis – A biochemical study. *J Soc Periodontists Implantologists Kerala*., 4:39–41.

- Wen, Y., Yuan, J., Chen, J., Zhao, Y., Niu, Y., Yu, C. (2017). Amperometric myeloperoxidase immunoassay based on the use of CuPdPt nanowire networks. *Microchimica Acta*, 185(1). doi:10.1007/s00604-017-2563-y
- Wignarajah, S., Suaifan, G. A. R. Y., Bizzarro, S., Bikker, F. J., Kaman, W. E., & Zourob, M. (2015). Colorimetric Assay for the Detection of Typical Biomarkers for Periodontitis Using a Magnetic Nanoparticle Biosensor. *Analytical Chemistry*, 87(24), 12161-12168. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03018>
- Windmiller, J. R., Chinnapareddy, S., Santhosh, P., Halámek, J., Chuang, M.-C., Bocharova, V., ... Wang, J. (2010). Strip-based amperometric detection of myeloperoxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2), 886-889. doi:10.1016/j.bios.2010.07.031
- Yamada, H., Yoshii, K., Asahi, M., Chiku, M., Kitazumi, Y. (2022). Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals. *Electrochemistry*. Volume 90. Issue 10. DOI: <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>
- Yamalik, N., Caglayan, F., Kiliç, K., Kiliç, A., Tümer, C. (2000). The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. *J Periodontol.*, 71:460–7
- Zhang R., Brennan M.L., Fu X., Aviles R.J., Pearce G.L., Penn M.S., Topol E.J., Sprecher D.L., Hazen S.L. (2001). Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*. 286:2136–2142. doi: 10.1001/jama.286.17.2136
- Zhang, S., Wang, W., Hu, F., Wang, S., Liu, Y., Ai, X., Fang, J., Li, H., Zhai, T. (2020). 2D CoOOH Sheet-Encapsulated Ni<sub>2</sub>P into Tubular Arrays Realizing 1000 mA cm<sup>-2</sup>-Level-Current-Density

Hydrogen Evolution Over 100 h in Neutral Water. *Nano-Micro Lett.* 12, 140.

<https://doi.org/10.1007/s40820-020-00476-4>

# ANEXOS

## Anexo 1. Carta de consentimiento informado



### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ identificado con el número de cédula de ciudadanía \_\_\_\_\_, declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el estudio titulado: **“DESARROLLO Y EVALUACION DE UN PROTOTIPO DE SENSOR ELECTROQUÍMICO USANDO ELECTRODOS DE NANOTUBOS DE ORO Y OXIDO DE GRAFENO PARA DETECCIÓN DE MIELOPEROXIDASA EN SALIVA COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD PERIODONTAL.”** que se desarrolla en la Universidad Industrial de Santander en la modalidad de plan de trabajo de grado.

Se me ha explicado que el estudio consiste en el análisis enzimático de muestra de saliva, que debe ser colectada sin haber ingerido alimentos previamente, ni haber fumado.

Es de mi conocimiento que estoy en libertad de abandonar el estudio cuando así lo considere adecuado. Que ni el abandono, ni la participación en el estudio influirán en mi relación profesional con los investigadores responsables; que estoy en libertad de solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios, así como los resultados derivados de mi participación en este estudio.

- ¿Ha padecido de enfermedades cardiovasculares, como hipertensión arterial o problemas cardíacos previos?

Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_

- ¿Ha sido diagnosticado o tiene conocimiento de tener diabetes?

Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_

- ¿Es usted fumador activo?

Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_

- ¿Ha sido diagnosticado con alguna enfermedad periodontal?

Sí \_\_\_\_ No \_\_\_\_

En caso de haber marcado sí, por favor indique cuál: \_\_\_\_\_

- Estado actual del periodonto: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_