

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA LA
DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO UTILIZANDO ELECTRODOS
SERIGRAFIADOS DE ORO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PALMA
REAL (*Roystonea regia*) Y NANOTUBOS DE PÉPTIDOS**

JESÚS ALBERTO VARGAS RAMIREZ

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

2016

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA LA
DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO UTILIZANDO ELECTRODOS
SERIGRAFIADOS DE ORO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PALMA
REAL (*Roystonea regia*) Y NANOTUBOS DE PÉPTIDOS**

JESÚS ALBERTO VARGAS RAMIREZ

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

Director

John Jairo Castillo León, Doctor en Química

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

2016

*A mi madre, por su valentía
A ella que es mi guía y fortaleza*

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, a ella que es mi guía y mi consejera, que lo dio todo sin pedir nada a cambio, por cada palabra de aliento, por siempre confiar en mí, sin ella nada de esto podría haber sido posible...

Al profesor John Jairo Castillo León, a quién le expreso mi más sincero agradecimiento. Gracias por su paciencia, ideas y orientación en la realización de este proyecto de grado.

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

A mis amigos, a esas grandes personas que estuvieron conmigo en cada momento de la realización de esta tesis dando palabras de alivio, a esos que entre risas e historias hacían más llevadero cada momento... Gracias a los cuatro fantásticos, ustedes me enseñaron que la vida es para disfrutar...

Gracias por brindar una amistad sincera, por esa cerveza brindada para la sed, por esas historias de amor no correspondido, por cada enseñanza, por esas traspasadas para estudiar, por esos compinches, a la primera y a la segunda, para ustedes esta tesis...

A esa persona que me brindo grandes y sinceros abrazos...

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	18
1. MARCO DE REFERENCIA.....	21
1.1 ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA Y ESTABILIDAD DE ALGUNAS PEROXIDASAS.....	21
1.2 ESTUDIOS SOBRE BIOSENSORES USANDO PEROXIDASA PARA LA DETECCIÓN DE PERÓXIDO.....	22
1.3 DESARROLLO DE BIOSENSORES USANDO PEROXIDASA DE PALMA REAL (<i>Roystonea regia</i>).....	24
1.4 USO DE NANOTUBOS DE PÉPTIDOS EN EL DISEÑO DE BIOSENSORES.....	24
2. MARCO TEÓRICO	26
2.1 BIOSENSORES.....	26
2.1.1 Clasificación de los biosensores	26
2.2 BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS.....	27
2.3 BIOSENSORES CON ENZIMAS	28
2.3.1 Biosensores con peroxidasas	29
2.3.1.1 Peroxidasa de palma real.	30
2.3.1.2 Mecanismo de reacción de peroxidasa de palma real.....	31
2.4 PERÓXIDO DE HIDROGENO	33
2.5 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.....	33
2.6 NANOTUBOS DE PÉPTIDOS: NANOTUBOS DE DIFENILALANINA.....	35
2.7 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.....	39
2.7.1 Métodos voltamperométricos	39
2.7.1.1. Voltamperometría de barrido lineal.	40
2.7.1.2. Voltamperometría cíclica.....	40
2.8.1.3 Cronoamperometría.....	41
3. METODOLOGÍA.....	43
3.1 REACTIVOS.....	43

3.2 METODOLOGÍA	43
3.2.1 Extracción y semipurificación de la peroxidasa de palma real.....	43
3.2.1.1 Recolección de las hojas de palma real y extracción de la peroxidasa.	43
3.2.1.2 Extracción de pigmentos por reparto bifásico.....	44
3.2.1.3 Cromatografía hidrofóbica	44
3.2.1.4 Cromatografía por exclusión de tamaño	45
3.2.1.5 Determinación de la actividad enzimática	45
3.2.1.6 Determinación de proteínas por el método Bradford.	46
3.2.2 Formación de los nanotubos de péptidos.....	47
3.2.3 Modificación de los electrodos de oro.	47
3.2.4 Modificación de la superficie del electrodo de oro por adsorción física del sistema PPR/GA/NTP.....	48
3.2.5 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferrocianuro de potasio como electrolito modelo.....	48
3.2.6 Reducción bioelectroquímica del peróxido de hidrógeno.	50
3.2.7 Estudio del efecto de la velocidad de barrido	50
3.2.8 Estudio del efecto del pH	50
3.2.9 Estudio de los parámetros analíticos.....	50
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	52
4.1 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL	52
4.2 MODIFICACIÓN FÍSICA DE LOS ELECTRODOS DE ORO PARA LA DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	57
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS POR VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA	59
4.4 REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.	61
4.5 ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO LINEAL EN LA REDUCCIÓN BIOELECTROCATALÍTICA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.	66
4.6 EFECTO DEL PH EN LA DETECCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.	68
4.7 RESPUESTA DEL BIOSENSOR A ADICIONES SUCESIVAS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR CRONOAMPEROMETRÍA.	70
5. CONCLUSIONES	76
6. RECOMENDACIONES.....	78

BIBLIOGRAFÍA..... 79

ANEXOS 84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palma real y peroxidasa de palma real.	30
Figura 2. Electrodo serigrafiado y sus partes	35
Figura 3. Mecanismo de formación de los NTP	36
Figura 4. Posición del agua dentro de los canales en las estructuras de FF..	38
Figura 5. Magnitudes de un voltamperograma cíclico.....	41
Figura 6. Forma de la onda de potencial para cronoamperometría y curva i vs t resultante	42
Figura 7. Purificador de proteínas Bio-Rad Biologic y sus partes	45
Figura 8. Montaje usado para las mediciones electroquímicas.....	49
Figura 9. celda de acrílico y electrodo serigrafiado de oro.....	49
Figura 10. A) Hojas molidas de palma real y buffer extractora B) Agitación C) Reparto bifásico	53
Figura 11. Cromatografía hidrofóbica de la peroxidasa de palma real sobre fenil sefarosa	55
Figura 12. Cromatografía de exclusión de tamaño molecular de la peroxidasa de palma real sobre Sephadex 200	56
Figura 13. Voltamperogramas cíclicos de los diferentes electrodos en 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$ con 0,1 M de KCl.....	59
Figura 14. Voltamperogramas cíclicos en una solución tampón fosfatos 10 mM, pH 7, KCl 0,1 M.	62
Figura 15. Voltamperogramas cíclicos en una solución tampón fosfatos 10 mM, pH 7, KCl 0,1 M, H_2O_2 . 5 mM	64
Figura 16. Voltamperogramas cíclicos en una solución tampón fosfatos 10 mM, pH 7, KCl 0,1 M con A)1 B)3 C)5 mM de H_2O_2	65
Figura 17. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con PPR/GA/NTP en una solución tampón 10 mM pH 7 KCl 0,1 M H_2O_2 a diferentes velocidades de barrido lineal.....	67

Figura 19. Dependencia de la respuesta del biosensor en función del pH.	70
Figura 20. Respuesta corriente vs tiempo para la adición de H ₂ O ₂ a una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag.	72

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema de un biosensor y sus partes	26
Esquema 2. Clasificación de los biosensores.	27
Esquema 3. Ciclo catalítico de la peroxidasa de palma real	32
Esquema 4. Extracción y semipurificación de la peroxidasa de palma real	46
Esquema 5. Esquema del biosensor diseñado.	58
Esquema 6. Mecanismo de la reducción del H ₂ O ₂ en el biosensor	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de rendimientos del proceso de purificación de la peroxidasa de palma real (<i>Roystonea regia</i>).....	57
Tabla 2. Características de los voltamperogramas cíclicos del $K_3Fe(CN)_6$	61
Tabla 3. Biosensores electroquímicos con nanotubos de péptidos	66
Tabla 4: Comparación de los parámetros analíticos con algunos biosensores ya reportados.....	74

LISTA DE ANEXO

ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE BRADFORD	84
ANEXO B. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PPR SOLUBLE .	85
ANEXO C: CRONOAMPEROMETRÍA PARA ELECTRODOS SIN MODIFICAR Y MODIFICADOS CON NTP Y PPR/GA/NTP.....	86

ABREVIATURAS

°C	grados celcius
Ag	Plata
Au	Oro
BSA	Albumina de suero bovino
E	Diferencia de potencial
ET	Transferencia electrónica
FF	Difenilalanina
GA	Glutaraldehído
HFP	Hexafluoropropanol
HRP	Peroxidasa de rabano picante
I	Corriente
IUPAC	Unión Internacional de Química pura y aplicada
μA	microamperios
mL	microlitros
mV	milivoltios
NTP	nanotubos de péptidos
PEG	polietilenglicol
POD	Peroxidasa
pm	peso molecular
PPR	Peroxidasa de palma real
p/v	peso/volumen
UIS	Universidad Industrial de Santander

RESUMEN

TITULO: DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE ORO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*) Y NANOTUBOS DE PÉPTIDOS*:

AUTORES:

Vargas Ramirez Jesús Alberto,
Castillo León John Jairo**

PALABRAS CLAVES: biosensor, peroxidasa de palma real, electrodo de oro, nanotubos de péptidos.

DESCRIPCION

En este trabajo de grado se desarrolló un biosensor amperométrico utilizando electrodos serigrafiados de oro que fueron modificados con nanotubos de difenilalanina, glutaraldehído como agente entrecruzante y peroxidasa de palma real como agente de reconocimiento biológico para la detección de peróxido de hidrógeno.

Este proyecto consistió de cuatro etapas, la primera fue la extracción y semipurificación de la peroxidasa proveniente de las hojas de palma real. La enzima se obtuvo con un grado de purificación de 6,5 y una actividad específica final de 504 U/mg. Seguidamente se modificaron por adsorción física los electrodos con una solución que contenía nanotubos de péptidos, glutaraldehído y peroxidasa de palma real.

La reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno se observó a un potencial redox de -0.4 V vs Ag. Este proceso fue controlado en la superficie del electrodo por los procesos de difusión en un rango de velocidad de barrido lineal de 50- 500 mV/s. Posteriormente se estudió la influencia del pH hacia la respuesta del biosensor, dando un rango de trabajo entre 5-10

El rango lineal exhibido del biosensor fue 500- 6000 μM con un límite de detección de 432.7 μM para la detección de peróxido de hidrógeno, Estos parámetros analíticos se dedujeron de analizar los resultados que se obtuvieron al utilizar cronoamperometría.

*Trabajo de grado

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

ABSTRACT

TITLE

DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR HYDROGEN PEROXIDE BY USING PEPTIDE NANOTUBES AND ROYAL PALM PEROXIDASE (*Roystonea regia*) ON GOLD SCREEN PRINTED ELECTRODE *:

AUTHOR

Vargas Ramirez Jesús Alberto, Castillo León John Jairo**

Keywords: biosensor, royal palm peroxidase, gold screen printed electrode, peptide nanotubes.

DESCRIPTION

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

The development of the enzyme electrode consisted in four steps. The first step was the extraction and semi-purification of the peroxidase from royal palm tree. This process allowed to increase the specific activity and purification factor to 504.34 U / mg and 6.5 respectively. Then the electrode surface was modified with royal palm peroxidase by using peptide nanotube and glutaraldehyde, which allowed the electronic communication between the enzyme and the electrode surface. This step allowed the adsorption of peroxidase on the electrode surface.

Bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxide is observed at a redox potential -0.4 V vs Ag. This fact was demonstrated by the increasing on the electrocatalytic current of reduction at different concentrations of hydrogen peroxide. It was found that the electron transfer process was controlled superficially and depended on the pH of the solution.

Based on the results from chronoamperometry, the enzyme electrode showed a linear response to hydrogen peroxide over a concentration range from 500 μM to 6000 μM with a detection limit of 432.71 μM and a sensibility of 0.024.

* Degree of Project

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

INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas analíticas, ya sea en análisis cuantitativos o cualitativos, a menudo presentan desventajas en cuanto a posibles interferencias por parte de la matriz. Otras veces se necesita un elevado consumo de tiempo dada la necesidad de realizar pretratamientos de la muestra que en algunas ocasiones son costosos y laboriosos. Además, estas técnicas no suelen ser adecuadas en los casos en que el parámetro analítico debe controlarse de manera adecuada y en tiempo real.

La utilización de sensores para resolver los problemas analíticos que la sociedad demanda hoy en día es, sin lugar a duda, una de las tendencias más claras en la química analítica moderna. De los sensores, podemos destacar un grupo denominado los biosensores.

Los biosensores son dispositivos capaces de dar una información cualitativa o cuantitativa acerca de un analito en una matriz utilizando un mecanismo o principio biológico. A la hora de diseñar un biosensor se deben tener en cuenta dos aspectos fundamentales, el elemento de reconocimiento biológico (por ejemplo. enzimas, proteínas, virus, anticuerpos) y el fundamento y material del transductor (electrodo). Es bien sabido que las enzimas son específicas con sus sustratos y que las reacciones en las que participan son rápidas, lo cual puede dar una información rápida y confiable. En cuanto al fundamento del transductor, existe una categoría especial, los denominados “biosensores amperométricos” en donde se mide una corriente, a un potencial constante, que es proporcional a la concentración del analito en la muestra.

La ingeniería de biosensores ha utilizado como elemento de reconocimiento biológico: enzimas, ácidos nucleicos o anticuerpos según sea el analito a

determinar; estos biosensores encuentran gran aplicación en campos como: ingeniería de alimentos, medicina, química ambiental, entre otros. (Monosik, 2012) Estudios relacionados con los biosensores amperométricos han usado la peroxidasa de rábano picante (HRP), debido a su estabilidad térmica y el rango de pH al cual puede trabajar. Sin embargo, esta enzima presenta algunos inconvenientes cuando se requieren pHs extremos y altas temperaturas y en algunas ocasiones es inactivada a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Otra desventaja que puede surgir, es que en ocasiones la transferencia de electrones, entre la enzima y el electrodo, no es óptima y es necesario modificar los electrodos para mejorar la respuesta en la corriente generada. Por ejemplo Wang y col., 2012 modificaron la superficie de electrodos de oro con nanotubos de carbono para incrementar el valor de la corriente dada por el biosensor cuando se ensayaron diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

El uso de la nanotecnología, es sin duda, una herramienta potente a la hora de diseñar biosensores, ya que estos materiales (nanotubos de carbono, nanotubos de péptidos o cualquier estructura con al menos una dimensión menor a 1 μM) presentan propiedades únicas como buena conductividad y biocompatibilidad por lo que mejoran la transferencia de carga desde las enzimas hacia los electrodos. Los nanotubos de péptidos surgen como una alternativa hacia los ya usados nanotubos de carbono, además, presentan otras ventajas en comparación a estos últimos como facilidad a la hora de su síntesis y mayor reactividad.

En este trabajo de grado se desarrolló un prototipo de biosensor amperométrico mediante la modificación de electrodos de oro con peroxidasa de palma real *Roystonea regia* (PPR) y con nanotubos de péptidos, usando glutaraldehído como agente entrecruzante entre estos dos.

Para el desarrollo del prototipo del biosensor, se plantearon cuatro (4) etapas. En la primera se extrajo y semipurificó la peroxidasa (POD) de palma real. La siguiente

etapa consistió en la modificación de los electrodos con la enzima que previamente se unió a los nanotubos de péptidos mediante el uso de glutaraldehído como entrecruzamiento.

Una tercera etapa es la caracterización por métodos electroquímicos (voltamperometría y cronoamperometría) de los electrodos modificados. Finalmente, en la cuarta etapa se evaluaron los siguientes parámetros analíticos: rango lineal, sensibilidad, nivel mínimo de detección del biosensor.

1. MARCO DE REFERENCIA

Se presenta a continuación algunos estudios que demuestran la estabilidad térmica, rango de pH en el que trabajan, y especificidad de algunas peroxidasas, lo que las convierten en enzimas atractivas para el diseño de biosensores.

1.1 ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA Y ESTABILIDAD DE ALGUNAS PEROXIDASAS.

La alta estabilidad de la peroxidasa de aceite de palma africana fue estudiada por Sakharov y col., 2001. A temperatura ambiente la peroxidasa presentó actividad en un rango de pH de 2 hasta 12. La inactivación por temperatura fue observada solo hasta los 70 °C. El estudio de la cinética de inactivación en presencia de ditioneitol (DTT) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) mostraron que los iones de calcio, enlaces disulfuro y la interacción con el grupo hemo son importantes elementos estructurales responsables de la estabilidad de la enzima. La inactivación inducida con clorhidrato de guanidina (GdHCl) indicó que la red de enlaces de hidrógeno también juega un papel importante en la estabilización de la estructura activa de la enzima.

En el año 2008, Zamorano publicó en su tesis doctoral un estudio sobre la caracterización físico química de la peroxidasa de palma real. En este estudio, cabe destacar que la peroxidasa de palma real presentó 2, 11, 15 y 17 veces mayor actividad enzimática que las peroxidasas de palmeras *Chamaerops excelsa*, *Whashingtonia filifera*, *Phoenix canariensis* y *Phoenix dactylifera*. Además demostraron que la enzima forma dímeros lo cual probablemente podría ser una razón de su alta estabilidad. Esta enzima específica puede trabajar en rangos de pH desde 2 hasta 13. El análisis térmico de la PPR indicó que tenía alta estabilidad

a temperaturas mayores de 70°C, y la desnaturalización está acoplada a la disociación del dímero.

En otro estudio, Abdurrahman y col, en el 2011 caracterizaron fisicoquímicamente la peroxidasa de palma datilera (*Phoenix dactylifera L*). En este trabajaron observaron una elevada actividad catalítica, buena estabilidad debido a cambios extremos de pH (<3,0 >12,0), termoestabilidad, especificidad en un amplio rango de sustratos y estabilidad en la presencia de una alta concentración de metales. Concluyendo así que esta peroxidasa tiene buen potencial para aplicaciones industriales y biomédicas.

1.2 ESTUDIOS SOBRE BIOSENSORES USANDO PEROXIDASA PARA LA DETECCIÓN DE PERÓXIDO

Si se hace una revisión del desarrollo de biosensores amperométricos usando peroxidases se encuentra que la mayoría son diseñados usando la peroxidasa de rábano picante. La razón es la alta estabilidad de esta enzima en soluciones acuosas como lo reportan Chattopadhyay y col. 2000.

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente químico usado ampliamente en la industria química debido a sus propiedades físicas y químicas. Algunas de las aplicaciones que podemos destacar es en la industria alimenticia como desinfectante no tóxico; o aplicaciones ambientales para el tratamiento de aguas residuales.

En los procesos celulares, la enzima oxidasa hace posible la formación de peróxido de hidrógeno, un compuesto que es en extremo tóxico para las células vivas por lo que, inmediatamente, las catalasas escinde el H_2O_2 , lo que da como productos agua e hidrógeno y evita así cualquier daño a la célula. Además, se ha detectado en diversos tipos de tejidos tumorales la producción de H_2O_2 a velocidad constante en

rangos de hasta 4 h, lo que podría explicar por qué algunas células son resistentes a la citolisis (Szatrowsky, 1991).

Las siguientes investigaciones resaltan la utilidad de la HRP a la hora de desarrollar un biosensor para la detección de peróxido de hidrógeno.

Wang y col. en el 2002, publicaron los resultados del diseño de un biosensor para la detección de peróxido de hidrógeno por adsorción de la peroxidasa de rábano picante sobre monocapas de nanotubos de carbono. La caracterización de los electrodos se hizo por voltamperometría cíclica y con microscopia electrónica de barrido observaron la morfología de estos. En el artículo destacan que el límite de detección de $2,1 \cdot 10^{-13}$ M ha sido el más bajo reportado hasta ese momento.

Liu y col. en el 2006 inmovilizaron la HRP sobre electrodos de platino modificados con oro, cisteína y nafión para la detección de peróxido de hidrógeno. Las características del biosensor fueron estudiadas con voltamperometría cíclica y cronoamperometría. Este sensor respondió a los cambios de concentración de H_2O_2 sin el uso de ningún mediador, es decir, hubo una transferencia directa de electrones entre el centro catalítico de la HRP y el electrodo.

Aún más reciente, para el año 2014, Xu, Shu Xia y col. desarrollaron un biosensor de peroxidasa de rábano picante. En esta ocasión, la HRP fue inmovilizada sobre nanotubos de carbono de pared múltiple. Los resultados muestran que el pH óptimo de este dispositivo fue de 7, el rango lineal para la detección de peróxido de hidrógeno estuvo entre 70 μ mol – 3 mmol. Al concluir los autores resaltan la gran utilidad de los nanomateriales para mejorar la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y el electrodo, finalizando con una rápida respuesta por parte del dispositivo.

1.3 DESARROLLO DE BIOSENSORES USANDO PEROXIDASA DE PALMA REAL (*Roystonea regia*)

Aunque la peroxidasa de rábano picante ha sido la elección más común, un estudio hecho por Alpeeva y col., 2005, demostró las características únicas y superiores de la peroxidasa de palma real para diseñar un biosensor. Los resultados obtenidos muestra la alta estabilidad de la enzima en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ (2000 µM). Cabe resaltar que esta resultado superior en comparación con la HRP y la peroxidasa de batata dulce. La PPR dio mejor respuestas a pH por debajo de 5 y concentraciones de peróxido cercanas a las 2000 µM.

1.4 USO DE NANOTUBOS DE PÉPTIDOS EN EL DISEÑO DE BIOSENSORES

Una clase de nanoestructura de péptidos está basado en el uso de péptidos aromáticos cortos para formar estructuras bien ordenadas. La fuerza impulsora para el descubrimiento de estos fue el estudio de péptidos amiloides. Estas estructuras nanoestructuras peptídicas auto-ensambladas son entidades biológicas que son capaces de autoorganizarse en condiciones suaves y con rapidez y sin el empleo de equipos especializados o altas temperaturas. Estos péptidos autoensamblados se han destacado como biomateriales prometedores para el diseño de dispositivos funcionales en su aplicación en bionanotecnología. Entre la lista de péptidos capaces de auto-organizarse en nanoestructuras se destaca la difenilalanina como un bloque de construcción con propiedades eléctricas y biocompatibles únicas, lo que la hace un candidato a la integración de biosensores (Hamley, 2014)

Las propiedades eléctricas de estas nanoestructuras fueron demostradas por Yemini y col. 2004, usando voltamperometría cíclica y cronoamperometría a una solución con K₃Fe(CN)₆. El aumento en la conductividad y la mejora en la transferencia de carga por parte de los nanotubos de péptidos están asociados a su morfología.

El uso de los nanotubos de péptidos ha sido reportado por Yemini y col. en el año 2005, en donde muestran como los nanotubos de péptidos unidos a la glucosa oxidasa usando glutaraldehído pueden dar una respuesta amperométrica a compuestos como etanol y β -D-glucosa. Sus resultados muestran un biosensor estable y sensible con transferencia directa de electrones.

Para el año 2013, Castillo y col. desarrollaron un biosensor modificando la superficie de un electrodo de grafeno con nanotubos de péptidos y ácido fólico para detectar células de cáncer. Los resultados muestran que este electrodo reconoce los receptores de folato presentes en la membrana celular. Se obtuvo además un límite de detección de 250 células de cáncer cervical humana por mL.

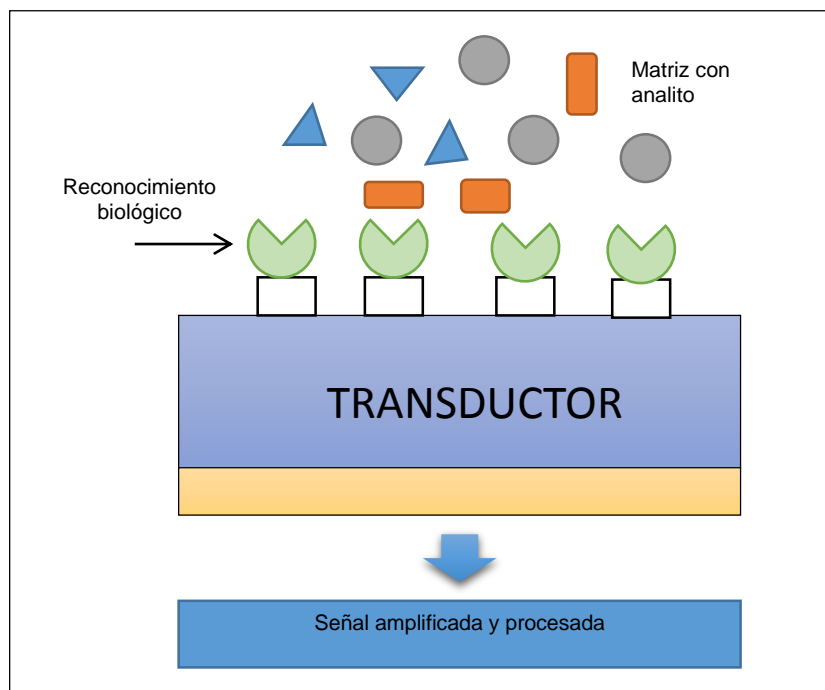
Las propiedades únicas nombradas anteriormente hacen que estos materiales ofrezcan una alternativa nueva para el diseño de biosensores en donde no se requieren mediadores.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 BIOSENSORES

La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor. El esquema 1 muestra un biosensor y sus partes básicas.

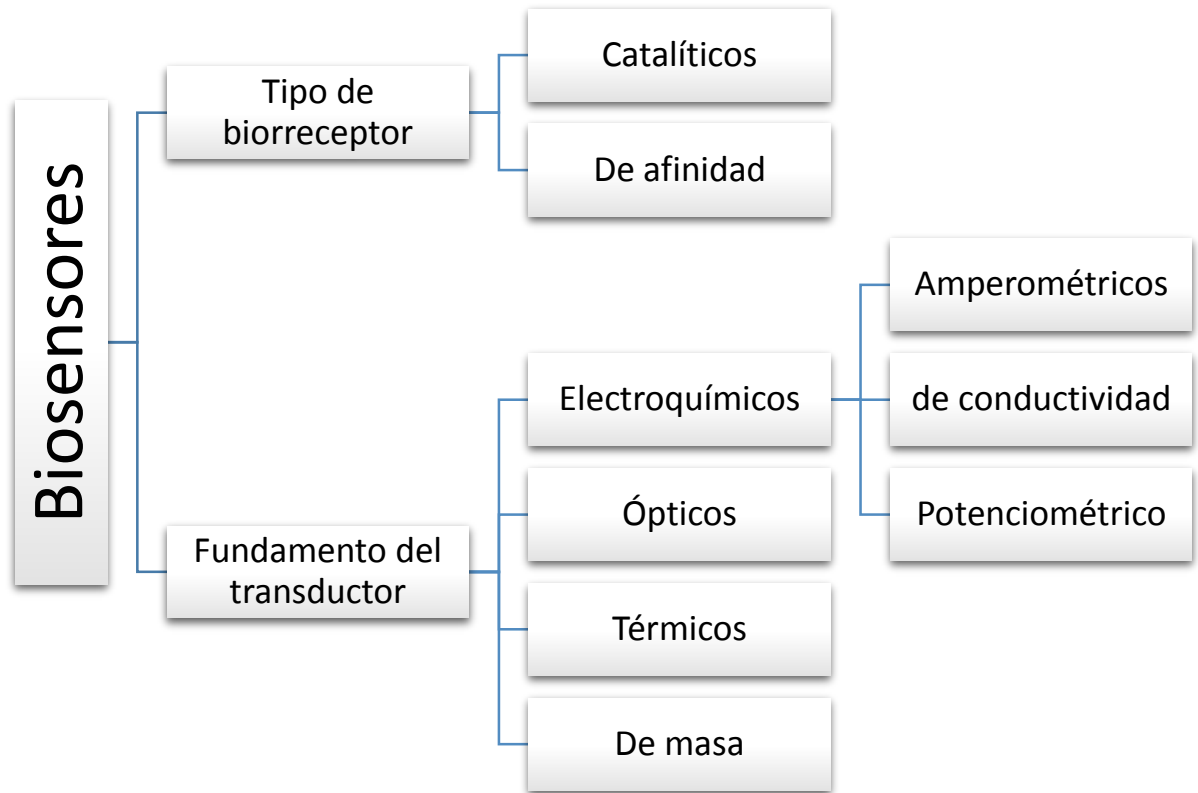
Esquema 1. Esquema de un biosensor. Nótese las tres partes básicas: analito, elemento biológico y un transductor



2.1.1 Clasificación de los biosensores

Los biosensores se pueden clasificar de acuerdo a dos criterios: el fundamento de la transducción o el tipo de biorreceptor. El esquema 2 muestra la clasificación de los biosensores.

Esquema 2. Clasificación de los biosensores.



2.2 BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS

En los biosensores electroquímicos, el principio básico se fundamenta en que la interacción enzima-analito genere un flujo de electrones que cambie las propiedades eléctricas de la solución tales como: una corriente eléctrica, conductancia, potencial o fuerza iónica.

Los biosensores amperométricos se basan en la medición de la corriente resultante del proceso de oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva. La medición, se lleva a cabo mediante la aplicación de un potencial fijo sobre el electrodo de trabajo, con respecto a un electrodo de referencia. La corriente resultante se correlaciona directamente con la concentración de la especie electroactiva o su tasa de producción o el consumo dentro de la capa biocatalítica adyacente del transductor.

Los biosensores electroquímicos presentan grandes ventajas,

- Las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños.
- La señal obtenida, obviamente, es eléctrica, y por tanto es factible la transducción directa de la velocidad de reacción en la señal de lectura.
- Los límites de detección que se obtienen, normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} mol l^{-1} , son suficientes y adecuados para la detección de numerosos analitos de interés.
- La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

2.3 BIOSENSORES CON ENZIMAS

Cuando se clasifica de acuerdo al tipo de biorreceptor se generan dos categorías: sensores catalíticos que usan enzimas, o sensores de afinidad los cuales usan proteínas de unión, ácidos nucleicos o inmunosensores.

Los biosensores que usan enzimas son dispositivos prometedores ya que presentan ciertas ventajas:

- Comúnmente, las enzimas poseen gran selectividad por sus sustratos.
- La fuerza motriz, el potencial redox, que se necesita para lograr la biocatálisis enzimática es a menudo muy cerca de la del sustrato, por esta razón, los biosensores pueden trabajar a potenciales moderados.
- En muchos casos, la inmovilización de la enzima sobre el transductor mejora la estabilidad y actividad de estas.

En contraste, estos sensores pueden presentar algunas desventajas como:

- Las enzimas son generalmente compuestos grandes. Por lo tanto, a pesar de la alta rotación catalítica en el sitio activo, la densidad global del catalizador es baja.

- Generalmente el centro activo de las enzimas está rodeado por lo que dificulta una transferencia directa con el transductor, haciendo que se deben usar mediadores.
- Las enzimas tienen un tiempo de vida limitado, lo que se traduce en un tiempo de vida para el biosensor.

Existen dos formas por las cuales se puede dar la transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y el electrodo: transferencia mediada o directa. En el primer caso, la enzima empleada debe ser capaz de donar y aceptar electrones del mediador. El mediador es altamente específico para realizar la transferencia de electrones con la superficie del electrodo. Por ejemplo, el ferroceno (compuesto organometálico cuya estructura se basa en una disposición centrada del metal entre dos aniones ciclopentadienilos, los cuales dan gran estabilidad al compuesto), ha sido uno de los mediadores más empleados en la fabricación de biosensores amperométricos de glucosa (Cass, 1984).

Si la enzima se inmoviliza sobre una superficie de carbono, grafito, oro, oro modificado o platino puede haber una transferencia electrónica (ET) directa entre la superficie del electrodo y el centro activo de la enzima. De este modo, la enzima inmovilizada en el electrodo puede ser oxidada por el peróxido de hidrógeno y, después, reducida por electrones procedentes del electrodo.

2.3.1 Biosensores con peroxidasas

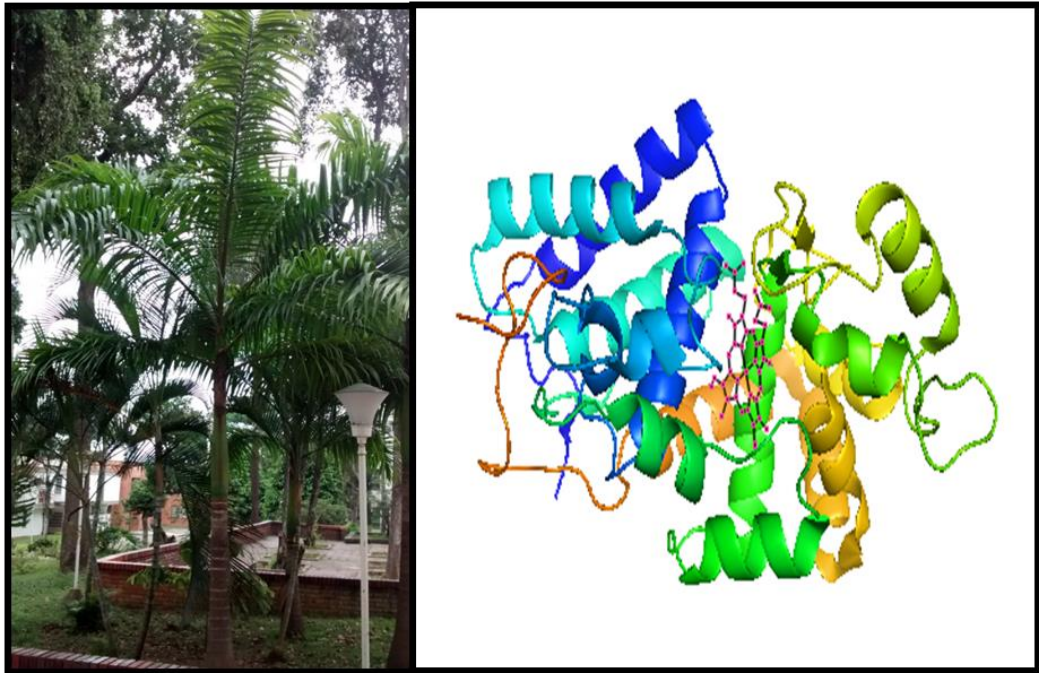
Las peroxidasas son unas enzimas ampliamente usadas en la construcción de electrodos enzimáticos, ya que son capaces de utilizar el peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos.

Los biosensores de peroxidasas basados en la ET directa se usan para la detección de peróxido de hidrógeno y pequeñas cantidades de hidroperóxidos orgánicos.

Cuando, además, se inmoviliza, el peróxido de hidrógeno en el electrodo, se puede determinar la concentración de sustratos oxidados tales como glucosa, alcoholes, glutamato, colina (Zamorano, 2009)

2.3.1.1 Peroxidasa de palma real. La peroxidasa de palma real es una glicoproteína de peso molecular 51 KDa, que se encuentra con una mayor concentración en las hojas verdes de dicha planta. Posee un punto isoeléctrico pI : 3.5 y un máximo de absorción a los 403 nm.

Figura 1. Palma real y PPR. A la izquierda palma real (foto tomada en la Universidad Industrial de Santander), a la derecha la estructura tridimensional de la PPR, se muestran las 13- α -hélices y el grupo hemo (negro). La estructura 3D de PPR fue obtenida de Proteín Data Bank (código PDB: 3HDL) y visualizada usando Pymol 0.99



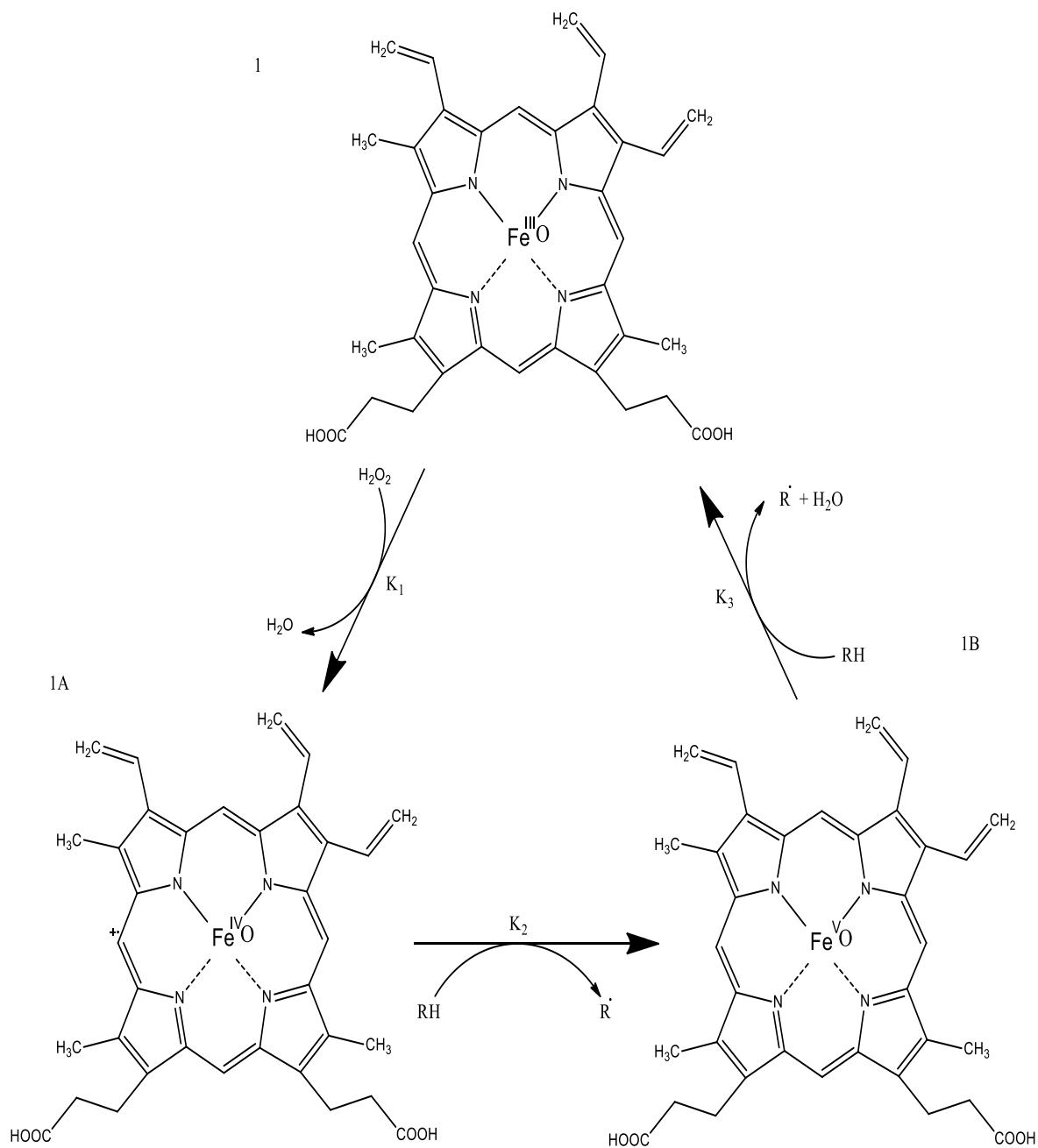
Las hojas de la PPR presentan un alto contenido de peroxidasas (Sakharov, 2001), aproximadamente 700 U/gramo de hoja, en donde U es la unidad de actividad

enzimática que se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto.

Esta enzima puede trabajar en rangos de pH desde 2 hasta 13. Además el análisis térmico muestra que la peroxidasa tiene alta estabilidad a 70°C , y la desnaturalización está acoplada a la disociación del dímero que puede formar.

2.3.1.2 Mecanismo de reacción de peroxidasa de palma real. Estas enzimas catalizan la oxidación de los sustratos por el peróxido de hidrógeno. En otras palabras es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en presencia de un compuesto oxidable al que transfiere un átomo de oxígeno.

Esquema 3. Ciclo catalítico de la peroxidasa de palma real



La primera reacción (1a) engloba una oxidación de dos electrones del grupo ferrihemoprostético de la peroxidasa nativa por el H₂O₂. Esta reacción da lugar a un producto intermedio, compuesto I (estado de oxidación +5), que consiste en un ion

oxiferrilo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y un radical catiónico porfirínico π . En la siguiente reacción (1b), el compuesto I es reducido por un dador de electrones AH_2 originando el compuesto II (estado de oxidación +4), el cual en la tercera etapa (1c) capta electrones de AH_2 , con lo que la enzima vuelve a su estado inicial de ferriperoxidasa

2.4 PERÓXIDO DE HIDROGENO

Los peróxidos son compuestos binarios que contienen mayores proporciones de oxígeno que los óxidos simples. El óxido simple del hidrógeno es el agua, H_2O . Anualmente se producen más de 2.2 millones de toneladas al año, las cuales son usadas con distintos fines, algunos mencionados a continuación:

- H_2O_2 al 3% es vendido en las farmacias para fines de desinfección y limpieza de heridas y raspaduras en la piel.
- H_2O_2 al 30%, aunque puede ser corrosivo, es usado en investigación científica. También es recomendable en las terapias bio-oxidantes.
- H_2O_2 al 35%, se ha usado tradicionalmente en la industria alimenticia como desinfectante no tóxico.

Así el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente químico usado ampliamente en la industria química debido a sus propiedades físicas y químicas. Sin embargo, el uso excesivo de H_2O_2 puede afectar la salud de las personas, las especies activas, el anión superóxido y el radical hidroxil están implicados en la muerte celular.

Tenemos ahora nuestro analito (H_2O_2) y nuestro elemento de reconocimiento biológico (PPR), luego los electrodos serigrafados son la alternativa propuesta como transductor por su sencillez y su bajo costo.

2.5 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.

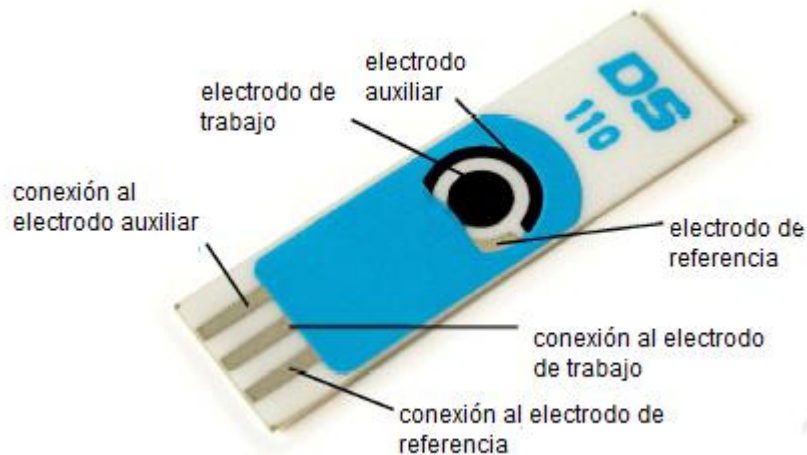
La utilización de electrodos convencionales de oro, platino o carbono como transductores de biosensores viene siendo una práctica habitual en trabajos de investigación, pero difícilmente serán herramientas válidas para la construcción de sensores de interés en el diagnóstico clínico en general, porque el contacto del elemento de reconocimiento con la muestra invalida el sensor para posteriores determinaciones, Además, la necesidad cada vez mayor de realizar análisis en microvolúmenes.

En cambio la técnica de serigrafado se ha adaptado a la producción de electrodos con grandes ventajas frente a otras tecnologías:

- Flexibilidad del diseño.
- Automatización del proceso de producción.
- La gran variedad de tintas de serigrafado permite combinar distintos materiales electródicos en la misma celda electrolítica.

En la figura 2 podemos observar las distintas partes de una tarjeta serigrafada con un diseño de tres electrodos.

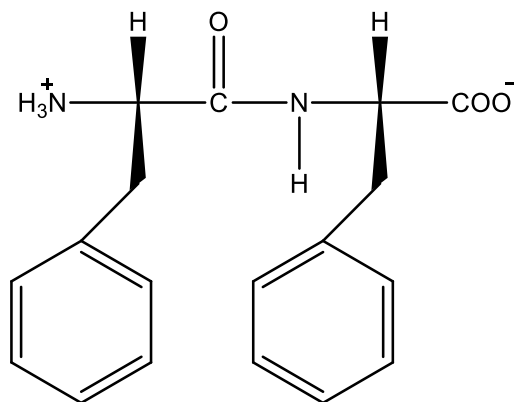
Figura 2. Electrodo serigrafiado y sus partes



Finalmente usaremos nanomateriales para mejorar la comunicación entre los electrodos serigrafiados y la peroxidasa de palma real.

2.6 NANOTUBOS DE PÉPTIDOS: NANOTUBOS DE DIFENILALANINA

Görbitz notó que dipéptidos hidrofóbicos tales como difenilalanina (FF) pueden formar estructuras de canales a través del análisis por rayos X. Estos sistemas eran de particular interés desde el punto de vista biológico como modelos para canales iónicos, poros de las membranas, y más.



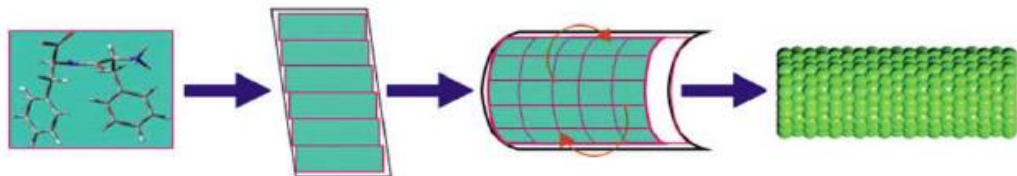
Difenilalanina (FF)

Él noto más tarde la formación de nanotubos autoensamblados de FF en soluciones acuosas, lo que impulsó a futuras investigaciones sobre este péptido. El dipéptido fue disuelto en HFP inicialmente y luego diluido en solución acuosa. Nanotubos con diámetro en el rango de 100-150 nm fueron observados. Estos fueron usados como bloques para la deposición de plata dentro de la cavidad de los nanotubos, produciendo nanohilos.

La razón por la cual los dipéptidos en la FF ocurren en tal conformación llegó a ser bastante clara con los resultados de la celda unidad obtenidos por Görbitz. En la FF, la traslación de 6 moléculas forman los canales. Las cadenas laterales parecen emanar desde el centro del canal, el cual está lleno de agua.

El autoensamble ocurre por medio de interacciones hidrofóbicas, interacciones del tipo π - π de apilamiento y por medio de puentes de hidrógeno. En la siguiente figura tomada de Gazit, 2006, se puede apreciar el mecanismo de formación para los NTP.

Figura 3. Mecanismo de formación de los NTP



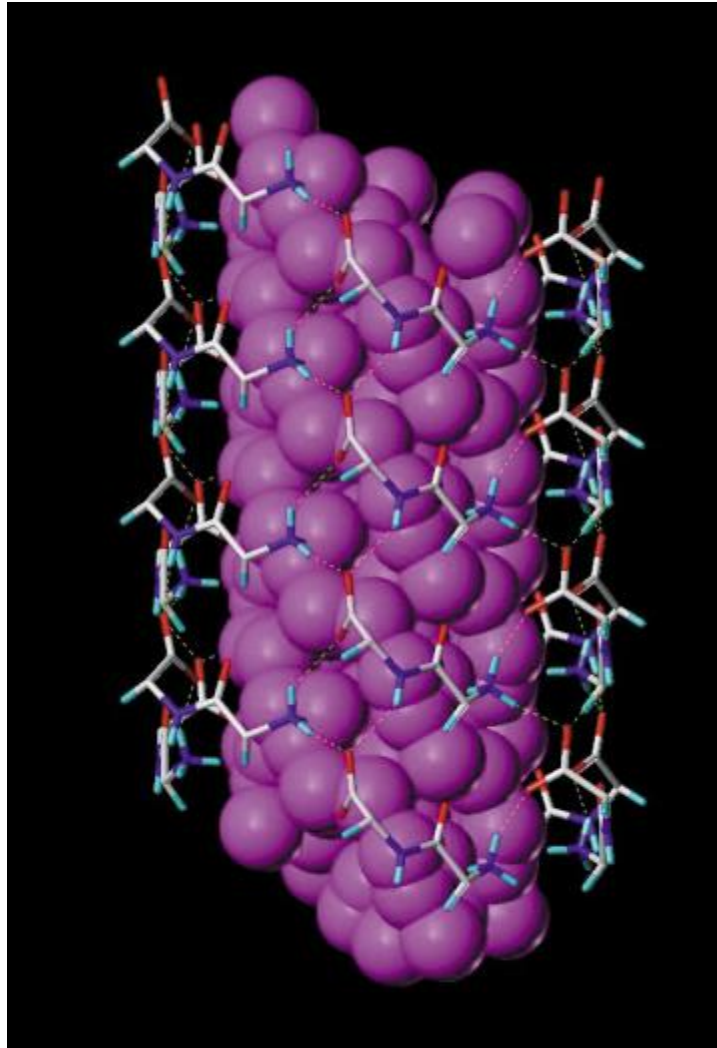
Este mecanismo está basado en interacciones de apilamiento formadas principalmente por los anillos bencénicos de la difenilalanina (interacciones π - π). Posteriormente cuando los NTP se están formando son disueltos en agua y a través de interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno se autoensamblan formando los nanotubos con la presencia de grupos aminos sobre su superficie.

Los nanotubos de FF son robustos, siendo estables en agua cerca a su punto de ebullición, y en solventes orgánicas tales como el etanol y la acetona y en condiciones acidas o alcalinas (Abramovich y col., 2010).

Hay muchos ejemplos de las interesantes aplicaciones de nanotubos FF. Por ejemplo, los nanotubos de péptidos depositados sobre electrodos de grafitos pueden mejorar las propiedades electroquímicas y la producción enzimática de peróxido de hidrógeno puede ser mejorada. (Gazit, 2006)

El desarrollo de biosensores para la detección de glucosa es otro ejemplo para destacar. Park y col., 2012 desarrollaron un método para la detección de glucosa conjugando los NTP con HRP y glucosa oxidasa. Este método fue comparado el método YSI 2300 STAT y se obtuvo una desviación estándar máxima de 3,88 %.

Figura 4. Posición del agua (esferas moradas) dentro de los canales en las estructuras de FF. Las líneas punteadas muestran los puentes de hidrógenos. Las cadenas laterales no son mostradas. Tomado de: Görbitz; Nanotube formation by Hydrophobic dipeptides; 2001.



Explicado así los componentes de nuestro biosensor, pasaremos dar una breve revisión de las técnicas analíticas usadas para la caracterización de este mismo.

2.7 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Los métodos electroquímicos conforman una de las principales divisiones de la química analítica instrumental. Mediciones eléctricas básicas de corriente, resistencia o voltaje se ha utilizado sola o en combinación con fines analíticos

En esta rama podemos encontrar dos grupos:

- Métodos potenciométricos: la información analítica se obtiene a partir de una señal de potencial eléctrico que idealmente es proporcional (de forma logarítmica) a la concentración de la especie involucrada.
- Métodos Amperométricos y voltamperométricos: la información analítica se obtiene a partir de la medida de la corriente de respuesta bajo la aplicación de un potencial constante (amperometría) o de un potencial variable (Voltamperometría) con el tiempo.

2.7.1 Métodos voltamperométricos

La voltamperometría engloba un grupo de métodos electroanalíticos en los cuales la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, obtenidas en condiciones que favorecen la polarización de un electrodo indicador o de trabajo.

Esta técnica, además de su uso analítico, presenta principalmente otra función de ayuda para químicos inorgánicos, bioquímicos y fisicoquímicos la cual incluye estudios fundamentales de procesos de oxidación y reducción en diversos medios, procesos de adsorción sobre superficies y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados.

Existen varias ramas de la Voltamperometría tales como: la voltamperometría de barrido de potencial, voltamperometría de corriente alterna con detección de fase, Voltamperometría de redisolución

2.7.1.1. Voltamperometría de barrido lineal. El primer método voltamperométrico, y el más simple, fue el del barrido lineal. En esta técnica, el potencial del electrodo de trabajo aumenta o disminuye a una velocidad típica de 2 a 5 mV/s. La intensidad de corriente, normalmente en microamperios, se registra y se obtiene un voltamperograma, el cual representa la intensidad de corriente en función del potencial aplicado al electrodo de trabajo.

2.7.1.2. Voltamperometría cíclica. En la voltamperometría cíclica, la variación de potencial en un electrodo estacionario es producida por una señal de forma triangular.

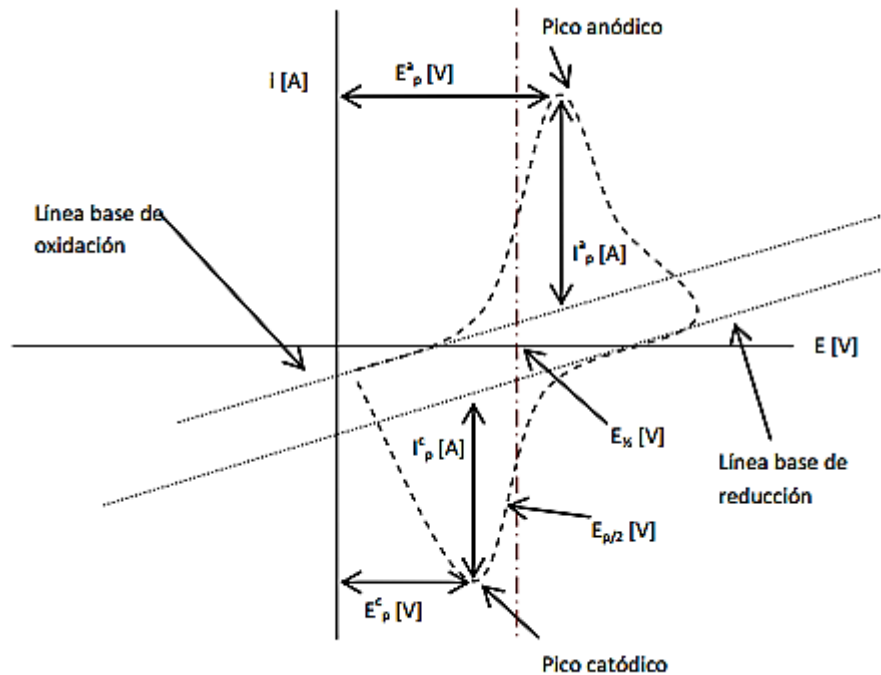
El potencial se varia linealmente desde un potencial inicial E_o hasta un potencial final E_f , cuando se ha alcanzado este valor el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_o , este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces lo requiera la experiencia. Los potenciales a los que tiene lugar la inversión se llama potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio elegido para un experimento dado, es aquel en el que tiene lugar la oxidación o reducción controlada por difusión de una o más especies. Dependiendo del tipo de estudio, la dirección del barrido inicial puede ser negativa o positiva.

La respuesta consecuente se llama voltamperograma cíclico y se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado. En la figura 4 se muestra un ejemplo de voltamperograma donde se señala las magnitudes físicas de este patrón de respuesta.

Según la figura 5:

- E_{pi} = potencial del pico catódico
- E_{pa} = Potencial de pico anódico
- i_{pi} = intensidad de corriente de pico catódico
- i_{pa} = intensidad de corriente de pico anódico

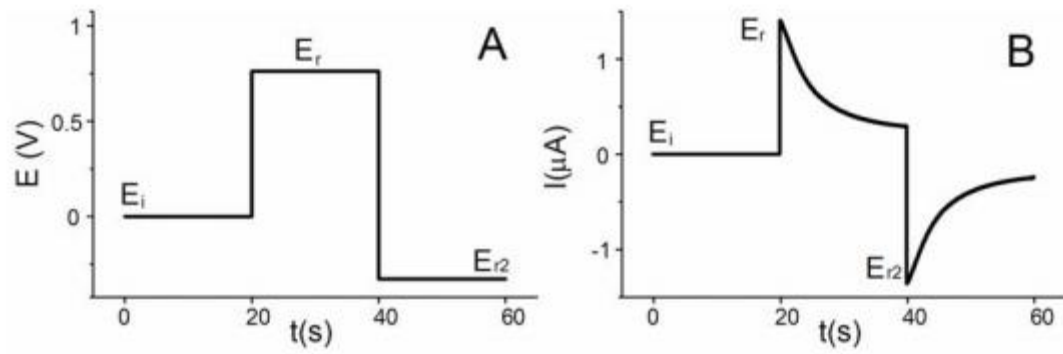
Figura 5. Magnitudes de un voltamperograma cíclico.



2.8.1.3 Cronoamperometría. Esta técnica electroquímica consiste en medir, en función del tiempo, la intensidad de corriente que fluye por un electrodo de trabajo estacionario sumergido en una disolución y sometido a un potencial constante.

Esta técnica lleva consigo, primero, la aplicación de un potencial inicial E_i , en el que no ocurre ninguna reacción de tipo faradaico. Una vez se alcanza el equilibrio, se produce un pulso de potencial hasta un potencial final, E_r , el cual provoca que se lleve a cabo la reacción redox del compuesto de interés. El potencial se mantiene durante un tiempo, t_r , determinado (Figura 6). Simultáneamente se registra la intensidad generada en función del tiempo, dando lugar a una curva $I-t$ como la que se muestra en la figura 6b.

Figura 6. A) Forma de la onda de potencial para la técnica. B) Curva i-t resultante



3. METODOLOGÍA

3.1 REACTIVOS

Los reactivos y materiales utilizados en este estudio fueron adquiridos de la siguiente manera: Merck: peróxido de hidrógeno (30 % p/v), sulfato de amonio y polietilenglicol (peso molecular 15000); J.T. Baker: guayacol; Sigma-Aldich: glutaraldehído (50 % p/v). Los reactivos utilizados para las soluciones tampón fueron todas de grado analítico y proporcionados por J.T Baker

La peroxidasa de palma real (PPR) fue extraída y parcialmente purificada en el laboratorio perteneciente al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander (UIS)

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Extracción y semipurificación de la peroxidasa de palma real

Se purificó la peroxidasa de las hojas de la palma real (*Roystonea regia*) que se encuentra en el campus de la Universidad Industrial de Santander. La metodología con pequeñas modificaciones fue similar a la usada por Sakharov y col., 2001.

3.2.1.1 Recolección de las hojas de palma real y extracción de la peroxidasa. Las hojas se recolectaron y fueron lavadas con agua destilada. La nervadura central fue retirada, se cortó y se trituró en molinos de granos el mismo día de su recolección.

Se pesó 60 g de hoja previamente triturada y se separaron en dos porciones de igual masa. Se tomó una de las fracciones, mientras la otra fue conservada a 4 °C, y se procedió a la extracción a 20 °C de la peroxidasa. Para este propósito se utilizó

una solución tampón de fosfatos (pH= 6; 10 mM) en una relación 1:4 (es decir por cada gramo de hojas molidas se adicionaron 4 mL de buffer), y se dejó en agitación durante 12 h. Posteriormente, el extracto se filtró al vacío y con el sobrenadante obtenido se procedió con la extracción de la segunda porción de hojas que contiene la peroxidasa. Posteriormente se determinó la actividad enzimática (ver sección 3.2.1.5)

3.2.1.2 Extracción de pigmentos por reparto bifásico. Se llevó a cabo la eliminación de fenoles, polifenoles y productos de oxidación de estos compuestos mediante un método de reparto bifásico con polietilenglicol (PEG, peso molecular 15.000-20.000) y sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). El método se describe a continuación.

Sobre el extracto se adicionó PEG a una concentración de 14% p/v y se agitó a temperatura ambiente hasta su completa disolución con la ayuda de un agitador magnético. Cuando el PEG se haya solubilizado, se adicionó (NH₄)₂SO₄ al 10% y se agitó hasta disolución. Esta solución se dejó en reposo en un embudo de decantación durante 5 h para la formación y posterior separación de las dos fases. La fase inferior y clara contenía la peroxidasa de palma real.

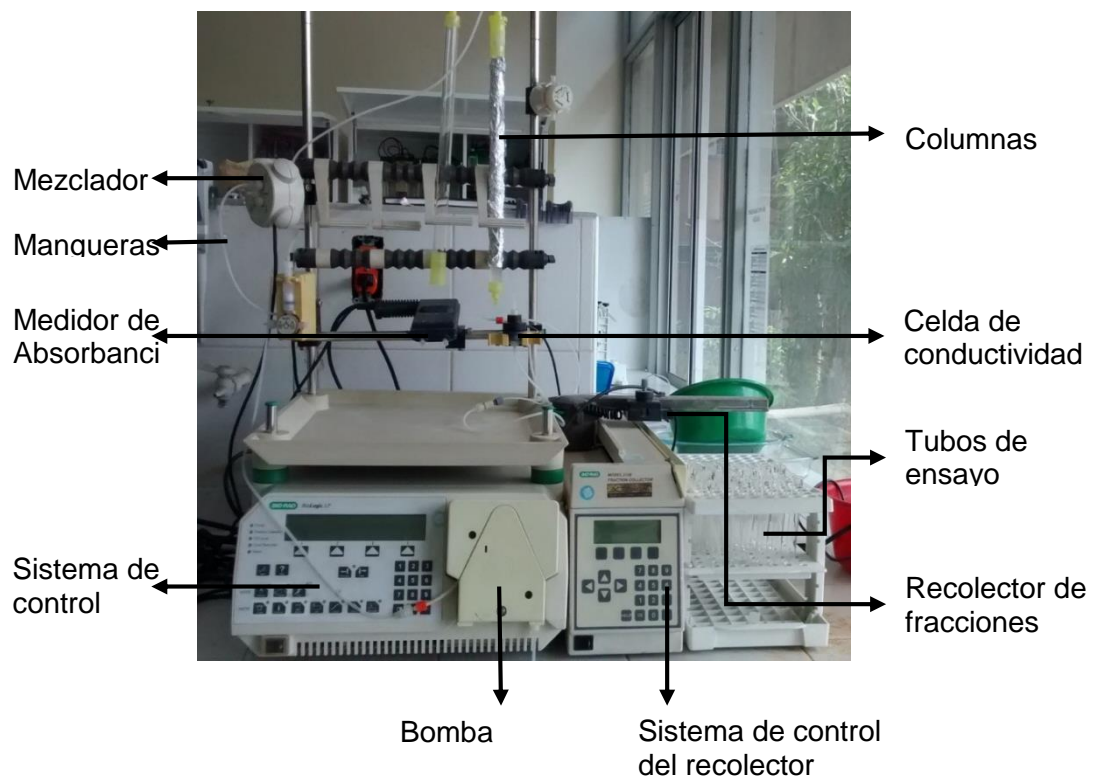
3.2.1.3 Cromatografía hidrofóbica . La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente, usando un purificador de proteínas Bio-Rad biologic (ver Fig. 7) equipado con una bomba peristáltica de baja presión. Se utilizó una columna de vidrio con una capacidad de 50 cm³ que se empacó manualmente con Fenil-Sefarosa CL-4B (tamaño de partícula 90 μm). Una vez la columna se empacó, se procedió a equilibrar con tampón fosfato 100 mM pH 6,5, 1,7 M (NH₄)₂SO₄ a un flujo de 1 ml/min. Luego de equilibrada la columna, se adicionó la solución que contiene la peroxidasa a un flujo de 0.7 ml/min y seguidamente se eluyó la enzima utilizando un gradiente de (NH₄)₂SO₄. Las fracciones que presentaron actividad enzimática fueron unidas en un mismo recipiente para la siguiente cromatografía.

Adicionalmente 1 mL de la enzima fue almacenado para la determinación de proteínas.

3.2.1.4 Cromatografía por exclusión de tamaño

Esta cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente. Como fase estacionaria se utilizó Sephadex 200. La columna se equilibró con tampón TRIS-básica 100 mM pH 8.3 a un flujo de 1 ml/min, esta misma solución sirvió de fase móvil. Luego de adicionada, la enzima fue eluída a un flujo de 0,7 ml/min. Un recolector automático tomó fracciones cada 10 min, a cada una de estas se le midió la actividad enzimática. Aquellas que presentaron actividad fueron unidas y se determinó la concentración de proteínas. Finalmente esta solución que contenía la PPR semipurificada fue almacenada a 4°C para el diseño del biosensor.

Figura 7. Purificador de proteínas Bio-Rad Biologic y sus partes.



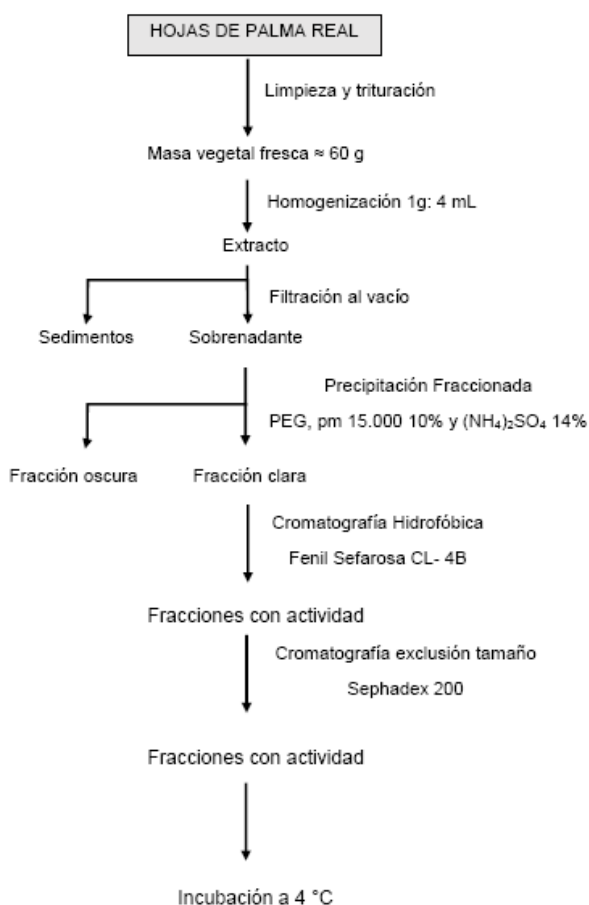
3.2.1.5 Determinación de la actividad enzimática. El medio de reacción utilizado para la determinación de la actividad catalítica de la peroxidasa se preparó

adicionando a 50 ml de solución tampón de fosfatos 10 mM (pH 6.0), 10 μ L de H₂O₂ al 30 % (p/v). La actividad catalítica de la peroxidasa se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción. Se utilizó como sustrato el guayacol y se determinó la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol, a 470 nm, con un coeficiente de extinción molar del producto de 5200 M⁻¹cm⁻¹. Para el ensayo se adicionaron 10 μ L de PPR a 2.5 mL de medio de reacción y 5 μ L de guayacol. Posteriormente se siguió la formación del producto mediante el aumento de absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 SHIMADZU.

3.2.1.6 Determinación de proteínas por el método Bradford. La determinación de la concentración de proteínas en la solución enzimática de peroxidasa de palma real se hizo utilizando el método de Bradford. Primero se realizó la curva de calibración utilizando albumina de suero bovino (BSA) como patrón en un rango entre 0,1-1 ppm. La concentración de proteínas se obtuvo por interpolación con la curva de calibrado que correlaciona la concentración de proteínas con la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 SHIMADZU.

A continuación se aprecia el esquema que resume la semipurificación de la peroxidasa de palma real.

Esquema 4. Extracción y semipurificación de la peroxidasa de palma real.



3.2.2 Formación de los nanotubos de péptidos

Para la formación de los nanotubos de péptidos (NTP) se añadieron 100 mg de difenilalanina a 1 mL de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP). De esta solución se tomaron 20 μL y se diluyeron a 1 mL, usando agua tipo I. La concentración final es de 2 mg/mL. Esta metodología ha sido descrita anteriormente (Yemini, 2005).

3.2.3 Modificación de los electrodos de oro.

Los electrodos serigrafados de oro (DRP-220 AT) fueron obtenidos de DropSens (Oviedo, España). Para la modificación de los electrodos se preparó una solución que contenía nanotubos de péptidos y solución de peroxidasa de palma real en relación 1:1 v/v, luego se añadió glutaraldehído (GA) en concentración 0,25 % p/v y se agito durante 1 minuto a 50 rpm. La solución se conservó a una temperatura de

4 °C durante 24 hrs antes de su uso. Esta solución se denomina PPR/GA/NTP en relación a sus componentes y al uso del glutaraldehído.

3.2.4 Modificación de la superficie del electrodo de oro por adsorción física del sistema PPR/GA/NTP.

10 µL de solución de la solución preparada anteriormente se depositaron sobre la superficie del electrodo de trabajo y se almacenó a 4 °C durante 12 h. Posteriormente la superficie del electrodo fue lavada suavemente con buffer fosfato pH 7.0 para eliminar el exceso de enzima, GA y NPTs que no se adsorbieron sobre el electrodo.

3.2.5 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferrocianuro de potasio como electrolito modelo

Las medidas electroquímicas se hicieron utilizando un Potenciostato/Galvanostato PGSTAT101 en una celda de acrílico especial para mediciones electroquímicas. La figura 8 muestra el montaje usado para llevar a cabo estas mediciones. La figura 9 muestra en detalle la celda de acrílico y los electrodos serigrafados.

El ferrocianuro de potasio se utilizó como estándar en la caracterización química de los electrodos, ya que se observan claramente los picos de oxidación y reducción del hierro. Se añadieron 7 mL de solución de $K_3Fe(CN)_6$ 0.1 M, KCl 0,1 M a la celda de acrílico y se tomó el voltamperograma cíclico utilizando una velocidad de barrido de 100 mV/s en un rango de potencial de -0,6 V a 0,6 V.

Figura 8. Montaje usado para las mediciones electroquímicas.

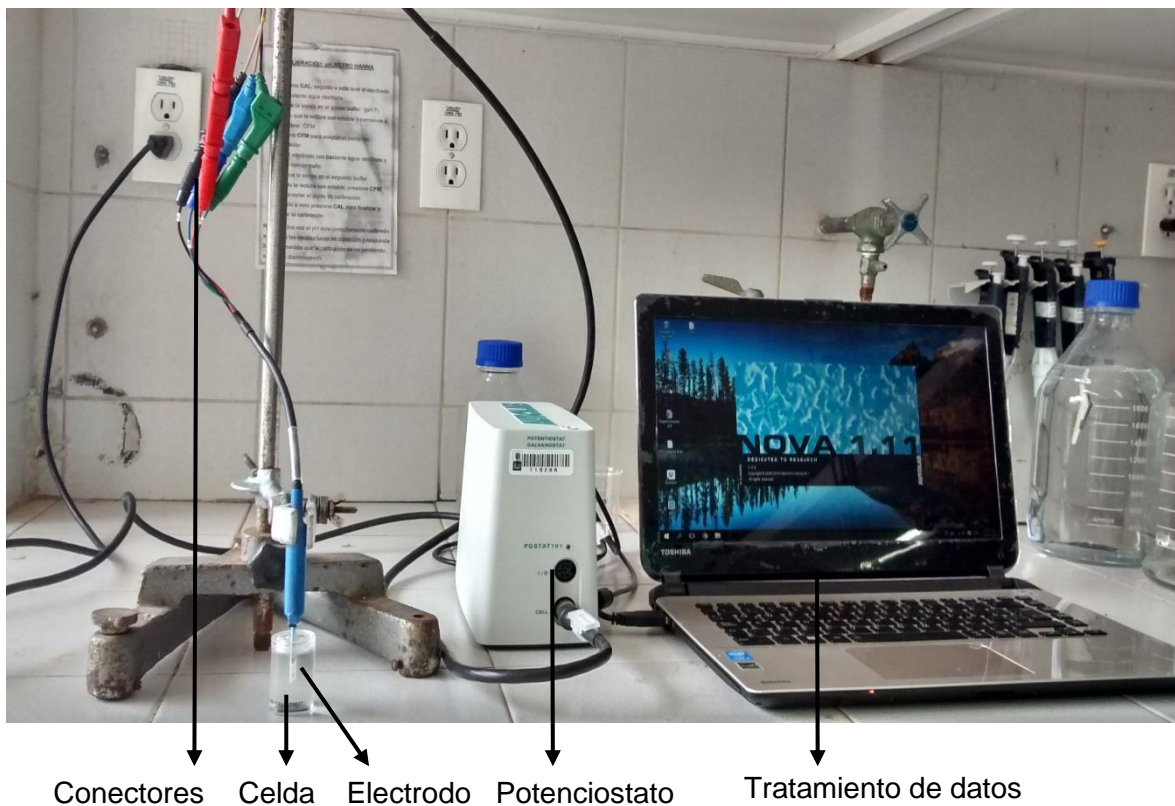


Figura 9. A la izquierda celda de acrílico. A la derecha electrodo serigrafiado de oro



3.2.6 Reducción bioelectroquímica del peróxido de hidrógeno.

La caracterización cualitativa de la reducción bioelectroquímica del peróxido de hidrógeno se hizo por voltamperometría cíclica. Para ello se tomaron voltamperogramas cíclicos de electrodos previamente modificados en una solución tampón de fosfatos 10 mM, pH 7; KCl 0,1 M y H₂O₂ 5 mM.

3.2.7 Estudio del efecto de la velocidad de barrido

Este estudio se hizo para encontrar si el proceso es reversible o irreversible, es decir, la etapa determinante en la reacción es el transporte de H₂O₂ a la superficie del electrodo. Para este estudio, se tomaron voltamperogramas cíclicos de una solución tampón de fosfatos 10 mM pH 7; H₂O₂ 1 mM a velocidades de barrido comprendidas entre 25 y 500 mV/s.

3.2.8 Estudio del efecto del pH

Como es bien sabido, la actividad biológica de las peroxidasas es dependiente del pH en el que trabajan. Por lo tanto, se tomaron el voltamperograma cíclico de las siguientes soluciones tampón: 10 mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), 10 mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), 10 mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0, 7.0 y 8.0) y 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0). Cada solución contenía H₂O₂ en concentración de 5 mM. La velocidad de barrido lineal fue de 100 mV/s.

3.2.9 Estudio de los parámetros analíticos

Mediante la construcción de curvas de calibración a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno se determinaron los siguientes parámetros analíticos: rango lineal del método, límite de detección y sensibilidad del método, para ello se utilizó cronoamperometría, la cual consiste en medir la intensidad corriente en función del tiempo a un potencial fijo. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno que se usaron se encontraban en el rango de 1 a 5000 μM. Los parámetros serán determinados por tratamientos estadísticos de la curva de calibración obtenida.

Todas las mediciones fueron realizadas utilizando triplicados o duplicados mediante la fabricación de electrodos preparados bajo las mismas condiciones.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 EXTRACCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LA PEROXIDASA DE PALMA REAL

Según estudios previos, se destacó una mayor actividad enzimática de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) frente a peroxidasas de palmeras tales como: *Chamaerops excelsa*, *Washingtonia filifera*, *Phoenix canariensis* y *Phoenix dactylifera*. (Zamorano, 2009) Además cuando se utilizó la PPR para diseñar un biosensor se resaltaron las características únicas y superiores de esta enzima frente a peroxidasas provenientes de rábano picante (*Armoracia rusticana*) y de batata dulce (*Ipomoea batatas*). (Alpeeva y Castillo, 2005)

De este modo, nuestra enzima llega a ser una candidata preferencial que, combinada con electrodos serigrafados de oro pueden proveer un biosensor amperométrico sencillo, y sensible para la detección de peróxido de hidrógeno. Para cumplir tal objetivo, se homogenizaron 60 g de hojas de palma real, utilizadas como fuente, previamente cortadas y molidas obtenidas en la Universidad Industrial de Santander (UIS). Para la extracción de la enzima se utilizó una solución tampón fosfato pH 6, 10 mM en una relación 1 g hoja / 4 mL de buffer (Sakharov, 2002). Para concentrar la enzima, los 60 g de hojas se dividieron en dos porciones iguales y el volumen inicial de solución tampón (120 mL) se usó como solución extractora para las dos porciones. El extracto obtenido presentaba un color verde oscuro. Para eliminar los sedimentos y material sólido, se filtró al vacío con un embudo Buchner; el extracto obtenido presentaba un color marrón. La actividad enzimática total del extracto crudo fue de 4560 U. La alta concentración de pigmentos y polifenoles son la causa del color del extracto.

Precisamente para la eliminación de fenoles, polifenoles y productos de oxidación de estos compuestos, se hace un reparto bifásico añadiendo polietilenglicol y

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en concentraciones de 14% y 10% respectivamente. Durante esta etapa se observó la separación de dos capas, una de color marrón y otra amarillo claro. En la capa más oscura se encuentran la mayoría de pigmentos, fenoles, polifenoles, productos de oxidación, PEG y enzimas de naturaleza hidrofóbica precipitadas por acción del sulfato de amonio. En la capa más clara se encuentran las proteínas hidrosolubles. Este proceso aumentó la actividad específica en 14 U/mg y redujo el volumen en un 59% como se espera comúnmente en la purificación de proteínas.

Luego de la separación de las dos capas en un embudo de separación, la capa más clara que contiene la peroxidasa se aplicó sobre una columna rellena con Fenil-Sefarosa.

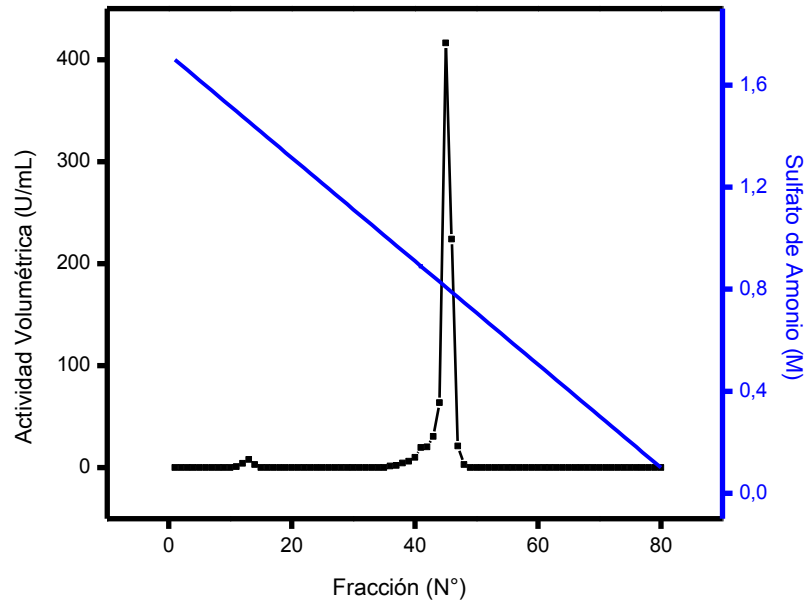
Figura 10. A) Hojas molidas de palma real y buffer extractora B) Agitación por 12 hrs C) Reparto bifásico: se observan las dos capas: parte clara y parte oscura



✓ Cromatografía hidrofóbica

La cromatografía hidrofóbica se realiza en un equipo de baja presión que no está conectado a ningún sistema controlador de absorbancia, por ello, el único modo de hacer un seguimiento proteico es medir la actividad enzimática de cada una de las fracciones que se recogen. (Fig. 11). La fase estacionaria, en este caso, fue Fenil-Sefarosa CL -4B, este relleno contiene grupos fenilos covalentemente unidos a una matriz que contiene un 4% de agarosa. En esta etapa de purificación se elimina proteínas y pigmentos por medio de las interacciones hidrofóbicas entre el analito y la fase estacionaria, las cuales se fortalecen con la alta concentración de sal que hay inicialmente. Con el gradiente de sal (comenzando con 1.7M hasta 0.2M) como fase móvil, las interacciones analito-fase estacionaria disminuyen y así la peroxidasa eluye de la columna, a este proceso se le conoce como “*salting out*”. El pico de la peroxidasa se presenta entre las fracciones 36-45 cuando la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es aproximadamente de 0,8 M, resultado similar al encontrado por (Castillo, 2001)

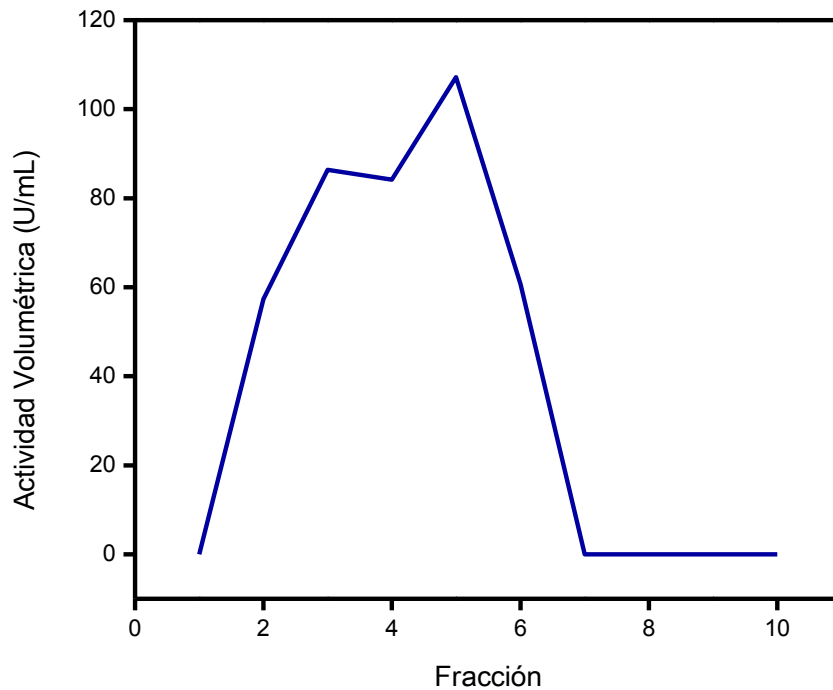
Figura 11. Cromatografía hidrofóbica de la peroxidasa de palma real sobre fenil sefarosa



✓ Cromatografía de exclusión de tamaño molecular

Las fracciones que presentaron la mayor actividad enzimática en la etapa anterior (fracciones 44-45-46) se recogieron y se unieron para pasar a través de una columna con fase estacionaria Sephadex 200, en donde se usó como fase móvil TRIS-básica 100 mM pH 8,3. El propósito en esta etapa es separar la peroxidasa del sulfato de amonio, hecho que se demuestra por la disminución de los valores de conductividad de 167 mS a 15 mS registrados por la celda de conductividad que posee el equipo.

Figura 12. Cromatografía de exclusión de tamaño molecular de la peroxidasa de palma real sobre Sephadex 200



La tabla 1, se conoce como tabla de rendimientos, en ella se puede ver la efectividad de cada una de las etapas usadas durante la purificación proteica de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*). Como es normal, a medida que transcurre el proceso, el rendimiento se reduce y la muestra se va enriqueciendo en el compuesto de interés.

Tabla 1. Tabla de rendimientos del proceso de purificación de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*).

Etapa de Purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de Purificación	Porcentaje de Rendimiento
Extracción	112	58.9	4559.4	77.467	1.0	100.0
Reparto bifásico	46	12.8	2512.0	196.942	2.5	55.1
Cromatografía Hidrofóbica	14.8	5.3	1372.6	259.652	3.4	30.1
Cromatografía Exclusión Tamaño	20	5.0	2505.4	504.343	6.5	55.0

Finalmente las fracciones recogidas de la cromatografía por exclusión de tamaño molecular fueron incubadas a 4 °C para la modificación de los electrodos de oro y el diseño del biosensor.

4.2 MODIFICACIÓN FÍSICA DE LOS ELECTRODOS DE ORO PARA LA DETERMINACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

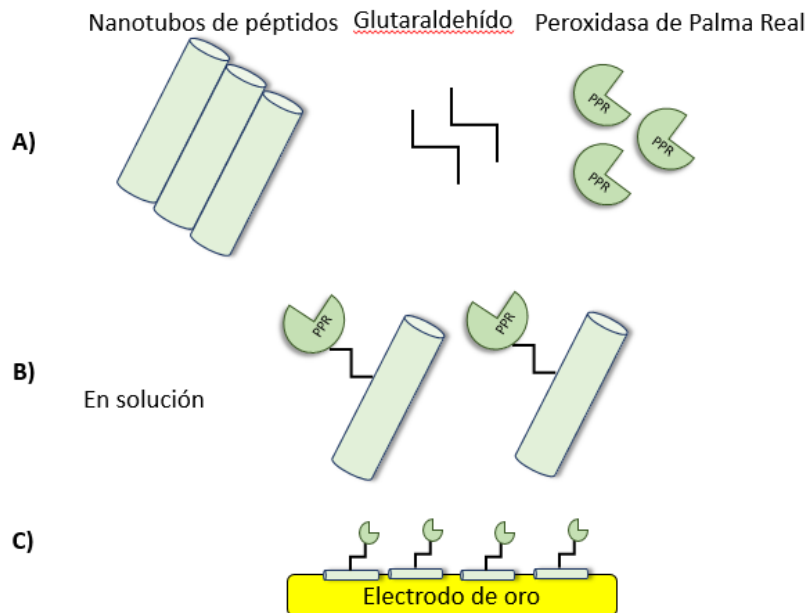
Para el desarrollo del biosensor, los electrodos de oro se modificaron depositando una solución que contenía nanotubos de péptidos (NTP), peroxidasa de palma real (PPR) en una relación 1:1 y glutaraldehído en concentración 0.25% p/v para la determinación de peróxido de hidrógeno. Este proceso no es posible con un electrodo de oro, grafeno o carbono vítreo sin modificar.

En esta conformación del biosensor, cada elemento juega un rol importante. Por un lado, los nanotubos de péptidos ofrecen una alternativa hacia los ya usados nanotubos de carbono (NTC), en cuanto a sus propiedades eléctricas, biocompatibilidad y lo más importante, al proceso de transferencia de carga desde las proteínas hacia el electrodo, además, químicamente los NTP son más reactivos en contraste con los NTC, por lo que no requiere su funcionalización (Santhanamorthi y col., 2011).

En segundo lugar, el glutaraldehído (GA) sirve como un agente entrecruzante entre la enzima y los nanotubos. El grupo aldehído del GA puede reaccionar con los grupos aminos de los aminoácidos tanto de los nanotubos como de la enzima para formar bases de Schiff (Pauliukaite, 2009). El uso del glutaraldehído ha sido reportado anteriormente tanto para hacer uniones NTC-enzima (Xu, Zhou, & Chen, 1998), como para NTP-enzima (Yemini, 2005)

Finalmente la peroxidasa de palma real transfiere los electrones desde el grupo hemo hacia el peróxido de hidrogeno para su reducción. La peroxidasa de palma real es el componente biológico en nuestro biosensor. El esquema 5 muestra la configuración del electrodo.

Esquema 5. Esquema del biosensor. A) componentes del biosensor. B) Unión PPR-NTP mediante el uso de glutaraldehído en solución. C) Adsorción sobre el electrodo del sistema

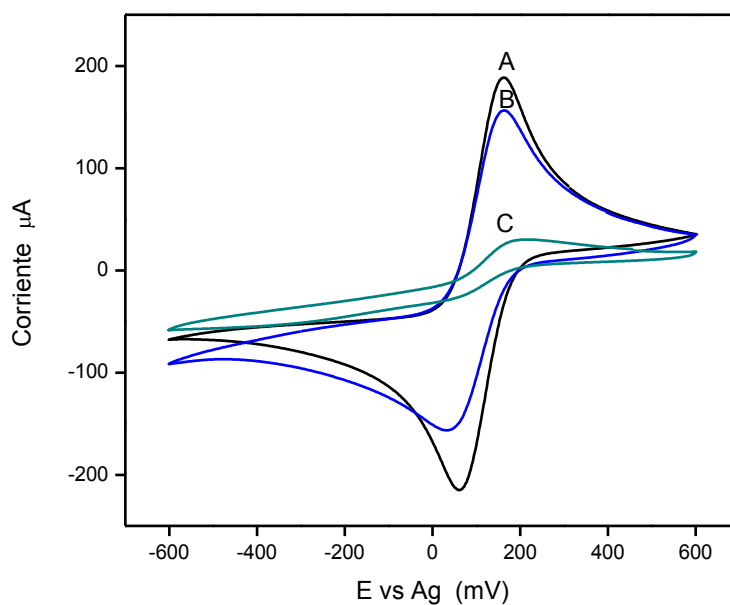


4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS POR VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.

Para la caracterización de la superficie del electrodo se utilizó voltamperometría cíclica del ferrocianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$). Para monitorear la modificación del electrodo se llevaron varios controles a saber: electrodo sin modificar (Au); electrodo de oro modificado con nanotubos de péptidos (NTP/Au) y PPR/GA/NTP/Au hace referencia a nuestro sistema final.

En la figura 13 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para cada configuración del electrodo. Los valores de potencial utilizados estuvieron en un rango desde -0,6V hasta 0,6V, la velocidad de barrido lineal fue de 100 mV/s

Figura 13. Voltamperogramas cíclicos de los diferentes electrodos en 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$ con 0,1 M de KCl. A) electrodo de oro sin modificar. B) NTP/Au. C) PPR/GA/NTP/Au. Velocidad de barrido lineal 100 mV s⁻¹.



Los voltamperogramas cíclicos del electrodo sin modificar y del electrodo modificado con nanotubos de péptidos presentan el pico catódico y anódico bien definido característico de un proceso reversible, es decir, controlado por la difusión. El voltamperograma cíclico muestra un pico anódico a $E_{pa} = 0,150$ V vs Ag para el electrodo sin modificar (figura 13 A) y $0,163$ V para el electrodo modificado con nanotubo de péptidos (figura 13 B), y un pico complementario catódico $E_{pc} = 0,060$ V para Au y $0,037$ V para NTP/Au. La diferencia entre E_{pc} y E_{pa} (ΔE_p) aumenta de $0,103$ V para el electrodo sin modificar a $0,126$ V para aquel con nanotubo de péptidos. El ΔE_p es un parámetro evaluador de la reversibilidad del sistema. Cuando la reacción es reversible, es decir, el proceso total viene controlado exclusivamente por la difusión de las sustancias que llegan al electrodo, el ΔE_p es siempre cercano a $2.3RT/nF$ (o $59/n$ mV a 25 °C). (Bard, 2001)

Por otro lado hay una disminución de la corriente de 30 μ A en el pico anódico y de aproximadamente 100 μ A para el picó catódico del electrodo modificado con NTP respecto al electrodo sin modificar. Estos resultados son similares a los encontrados por Castillo y col., 2013 en donde se explica que la respuesta electroquímica de los electrodos de oro radica en sus altas propiedades conductoras y alta velocidad en la transferencia de carga al compararla con electrodos de carbono y grafeno. Además en un trabajo realizando por Wang (Wang y col., 2012) se observó el mismo efecto, de disminución de la corriente, cuando sobre un electrodo de oro eran inmovilizadas varias capas con polímeros conductores y no conductores, a pesar de la inmovilización de estos polímeros los valores de corriente siguen disminuyendo. Así, cada capa de polímero actúo como aislante.

La relación de corrientes (i_{pc}/i_{pa}) es cercano a 1, lo que indica que la cantidad de especies oxidada fue similar a la que se redujo en la superficie del electrodo.

En la siguiente tabla se resumen los aspectos más importantes de los voltamperogramas cíclicos del $K_3Fe(CN)_6$. El potencial catódico (E_{pc}) y la corriente catódica (i_{pa}) corresponden al potencial y a la corriente de la reducción $Fe^{+3} \leftrightarrow Fe^{+2}$

respectivamente. Del mismo modo, E_{pa} e i_{pa} corresponden a la reacción de oxidación $Fe^{+2} \leftrightarrow Fe^{+3}$.

Tabla 2. Características de los voltamperogramas cíclicos del $K_3Fe(CN)_6$

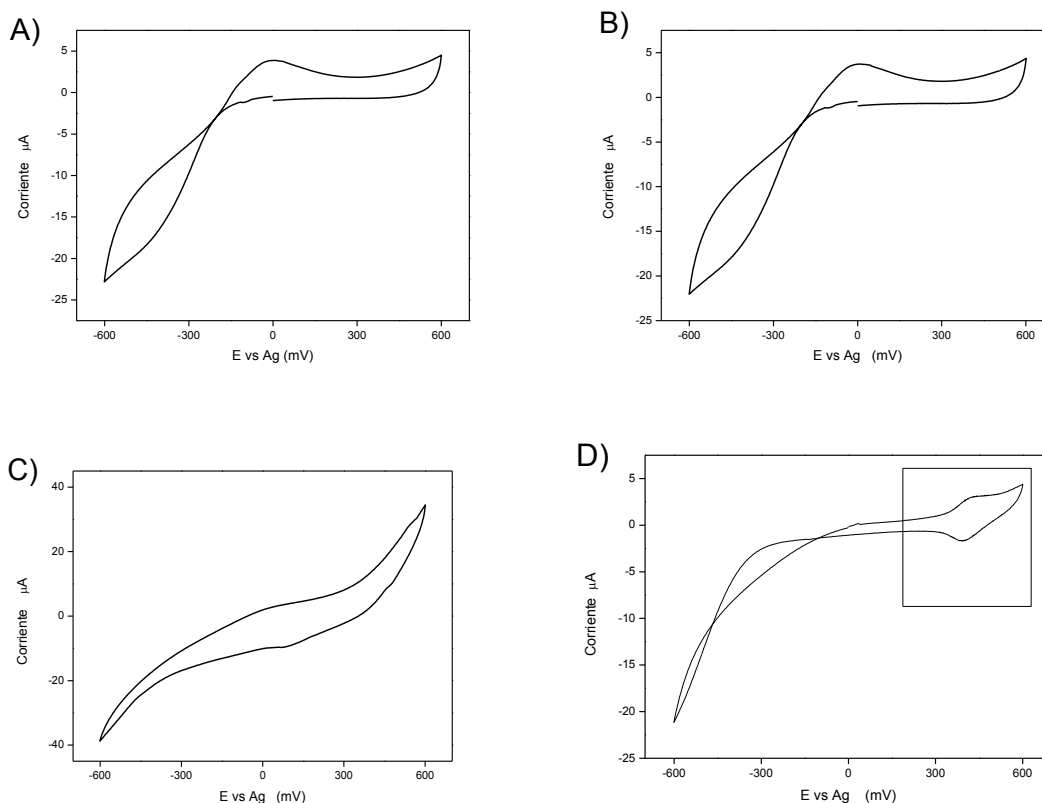
Sistema	E_{pa} mV	E_{pc} mV	I_{pa} μA	I_{pc} μA	ΔE_P mV	I_{pc}/i_{pa} I	$(E_{pa}+E_{pc})/2$ mV
Au	150,5 6	60,4 4	188,2 7	215,0 6	103,1 2	1,05	112
NTP/Au	163,5 0	37,6 9	155,8 6	102,9 3	125,8 8	0,65	100,63
PPR/GA/NTP/Au	181,0 6	53,1 7	30,06	-26,98	127,8 9	1,12	117,16

4.4 REDUCCIÓN BIOELECTROQUÍMICA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

La reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno fue estudiada mediante voltamperometría cíclica a soluciones en ausencia/presencia de peróxido de hidrógeno a una velocidad de barrido lineal de 100 mV/s y observando los cambios que presenten en los resultados.

La figura 14 muestra los voltamperogramas cíclicos del A) electrodo sin modificar, electrodo modificado con B) PPR, C) NTP y D) PPR/GA/NTP obtenidos en una solución tampón 10 mM pH 7 con KCl 0,1 M como electrolito soporte en el rango de potencial de -0,6 V a 0,6 V. Los electrolitos soporte disminuyeron la corriente generada por los procesos de migración, por lo que la reacción de reducción del peróxido fue solo dependiente de los procesos de difusión.

Figura 14. Voltamperogramas cíclicos en una solución tampón fosfatos 10 mM, pH 7, KCl 0,1 M. Velocidad de barrido lineal 100 mV/s. A) Electrodo sin modificar. B) PPR/Au. C) NTP/Au. D) PPR/GA/NTP/Au.



En estas gráficas se puede observar los voltamperogramas cíclicos para las diferentes configuraciones de electrodos control y para el electrodo modificado con PPR/GA/NTP.

Los electrodos de oro muestran un pico cerca a los -20 mV vs Ag, propio de posibles óxidos de oro que se forman en los barridos de potencial. El electrodo modificado con PPR no mostró cambio significativo respecto al electrodo sin modificar, esto indica que probablemente hay una desorción de la enzima desde la superficie del electrodo a la solución al no existir una interacción enzima-electrodo. Para el caso de los nanotubos de péptido, se presenta un aumento significativo en los valores de la corriente.

Finalmente el electrodo modificado con la solución de nanotubos de péptidos/glutaraldehído/peroxidasa de palma real muestra un par de picos a la altura de los 0.4 V vs Ag, más exactamente 0,38 mV para el pico catódico y 0,43 mV para el pico anódico. Estos picos pertenecen a la reducción y oxidación respectivamente del hierro presente en el grupo hemo de las peroxidasas.”.

Una explicación de este efecto parece estar relacionado directamente con la morfología de los nanotubos. Previamente se sugirió que un apilado en paralelo de restos aromáticos puede ser el mecanismo posible para la transferencia de electrones entre sistemas aromáticos espacialmente alineados que puedan contribuir a la conductividad eléctrica (Gazit, 2005).

Seguidamente, se estudió la reducción del peróxido de hidrogeno. Para ello se utilizó voltamperometría cíclica a una solución tampón que contenía peróxido de hidrógeno con las diferentes configuraciones de electrodo (sin modificar, PPR/Au, NTP/Au, PPR/GA/NTP/Au)

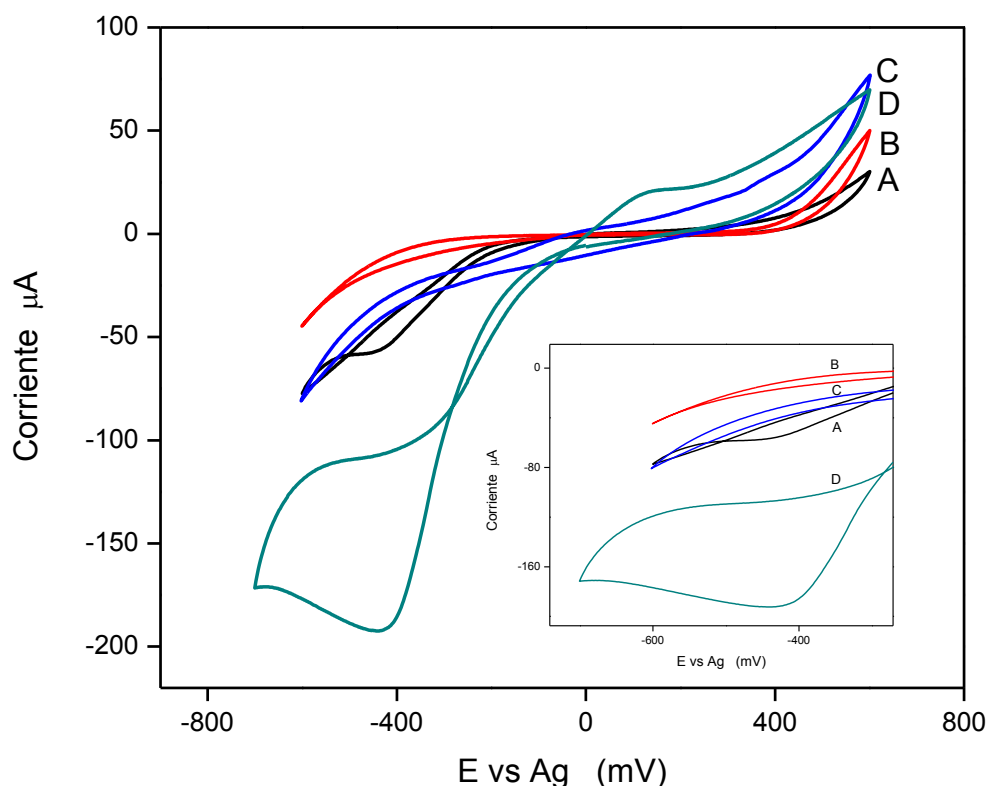
La Figura 15 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos en una solución tampón fosfato 10 mM pH 7 con H₂O₂ en una concentración 5 mM. Estas curvas muestran la respuesta de las diferentes configuraciones de electrodos

Las curvas A y C, electrodo sin modificar y electrodo modificado con NTP respectivamente, de la figura 15 no muestran una señal como respuesta hacia la adición de peróxido de hidrógeno a la solución, esto demuestra que la PPR es un componente esencial para la construcción biosensor. La curva B que pertenece al electrodo modificado con PPR no muestra señal alguna debido a la débil transferencia de carga entre el sitio activo de la enzima y el electrodo de oro.

La curva D muestra un pico bien definido de la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por electrodo modificado con PPR/GA/NTP alrededor de los

-0.4 vs Ag. Este hecho demuestra la transferencia directa de electrones desde la enzima hacia el electrodo, gracias al puente de comunicación formado por los nanotubos y el glutaraldehído como agente entrecruzante. Además el método de unión entre los componentes no involucra el sitio catalítico de la enzima.

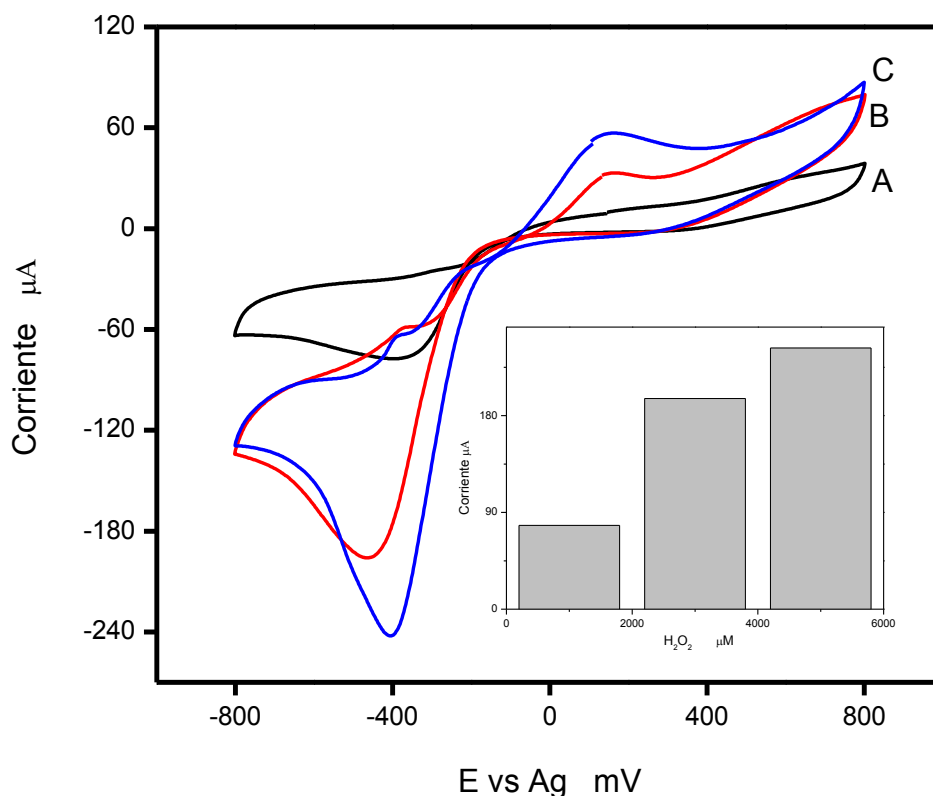
Figura 15. Voltamperogramas cíclicos en una solución tampón fosfatos 10 mM, pH 7, KCl 0,1 M, H₂O₂ 5 mM Velocidad de barrido lineal 100 mV/s. A) Electrodo sin modificar. B) PPR/Au. C) NTP/Au. D) PPR/GA/NTP/Au. Inseto: Aumento de la corriente proveniente de la reducción bioelectrocatalítica del H₂O₂



Para demostrar la veracidad de la señal correspondiente a la reducción bioelectroquímica del peróxido de hidrógeno se tomó el voltamperograma cíclico de soluciones que contenían 1, 3 y 5 mM de peróxido de hidrógeno. Las curvas A, B y C de la figura 16 representan los resultados obtenidos para las soluciones con 1, 3 y 5 mM de peróxido de hidrógeno. Nótese que en cada una de ellas hay un aumento

de la corriente catódica alrededor de los -0,4 V vs Ag que aumenta proporcionalmente a la concentración de peróxido de hidrógeno.

Figura 16. Voltamperogramas cíclicos en una solución tampón fosfatos 10 mM, pH

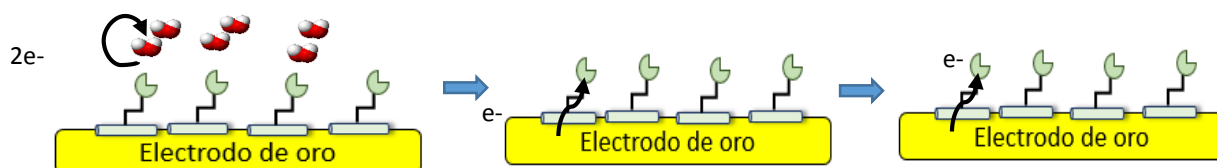


7, KCl 0,1 M para el electrodo modificado con PPR/GA/NTP/Au con concentraciones de A) 1 B) 3 C) 5 mM de H₂O₂. Inserto: Grafico de barras de corriente vs [H₂O₂]

El mecanismo de detección engloba una oxidación de dos electrones del grupo ferrihemoprostético de la peroxidasa nativa por el H₂O₂. Esta reacción da lugar a un producto intermedio, compuesto I (estado de oxidación +5), que consiste en un ion oxiferrilo (Fe⁴⁺=O) y un radical catiónico porfirínico π. El compuesto I tiene actividad catalítica y su radical porfirínico capta un electro del electrodo originando el compuesto II el cual toma de nuevo otro electrón del electrodo para volver a su estado inicial de ferropoxidasa. Además el compuesto II muestra una mayor estabilidad que el compuesto I, y el proceso de reducción del compuesto II hacia la

PPR nativa es lento. Se concluye entonces que el proceso de reducción del compuesto II es el detectado en este experimento (Yi, 2000), (Ferapontova, 2016).

Esquema 6. Mecanismo de la reducción del peróxido de hidrógeno sobre un electrodo modificado con PPR/GA/NTP



La tabla 3 muestra trabajos relacionados con nuestro biosensor, en cuanto al uso de nanotubos de péptidos en su diseño.

Tabla 3. Biosensores electroquímicos con nanotubos de péptidos

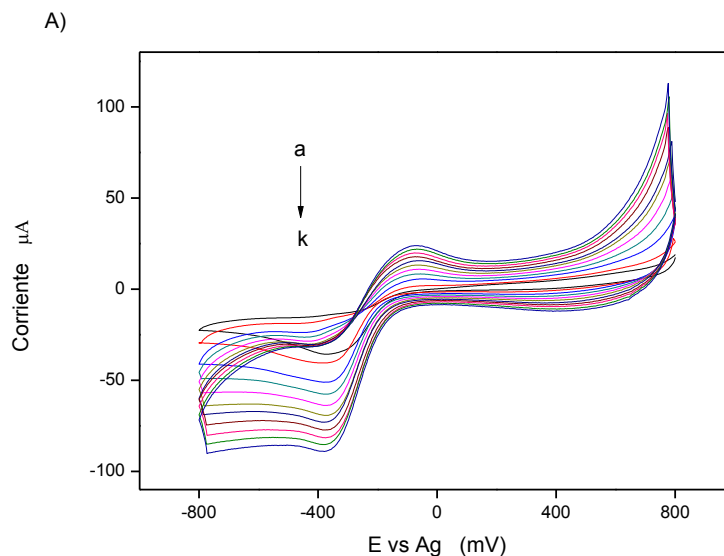
Nanopéptido	Electrodo	Analito	Referencia
Difenilalanina/glucosa oxidasa	Oro	Glucosa	(Yeimini y col. 2005)
Difenilalanina	Grafito	Fenol	(Matos y col. 2011)
Difenilalanina	Carbono vidrioso	Dopamina	(Viguiet y col. 2011)
Octapéptido N-C-G-A-I-T-I-G	Oro	Cobre	(Viguiet y col. 2011)
Difenilalanina/Ácido fólico	Grafeno	Células cancerígenas	(Castillo y col., 2013)

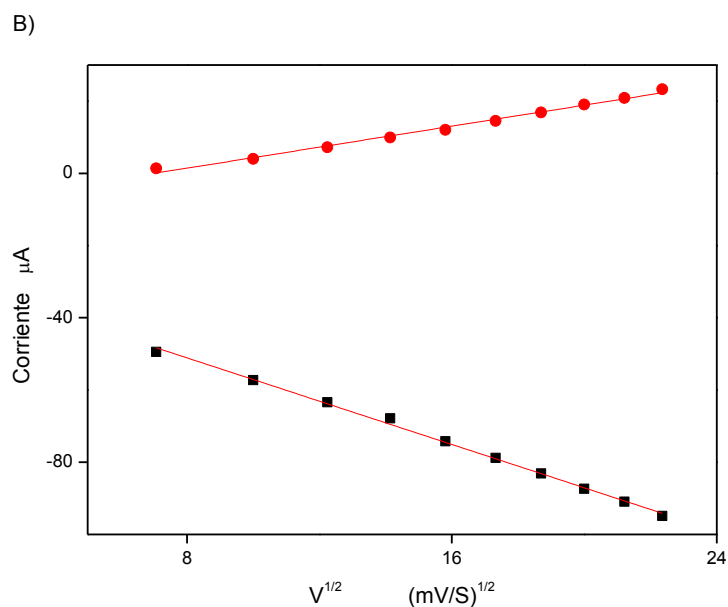
4.5 ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO LINEAL EN LA REDUCCIÓN BIOELECTROCATALÍTICA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

El comportamiento electroquímico del electrodo enzimático construido fue estudiado mediante la medida de voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido.

Con el incremento de la velocidad de barrido lineal de 50 a 500 mV/s, la corriente del pico de reducción del H_2O_2 incrementa de manera proporcional en este rango. Así la reacción en el electrodo es típica de un proceso reversible controlado en la superficie. (Liu y col. 2006) (Tan y col., 2009). La figura 17 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos en solución tampón 10 mM pH 7 con H_2O_2 1 mM a diferentes velocidades de barrido lineal.

Figura 17. A) Voltamperogramas cíclicos de un electrodo modificado con PPR/GA/NTP en una solución tampón 10 mM pH 7 KCl 0,1 M, H_2O_2 1 mM a diferentes velocidades de barrido lineal de la (a) a la (k): (a) 25, (b) 50, (c) 100, (d) 150, (e) 200, (f) 250, (g) 300, (h) 350, (i) 400, (j) 450, (k) 500 mV/s. B) Corriente del pico catódico y anódico vs raíz cuadrada de la velocidad del barrido lineal.





Ambos pico anódico y catódico incrementan linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido desde 50 hasta 500 mVs^{-1} .

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 1,45 v (\text{mV/s}^{-1}) - 10,19 \quad (r^2=0,997)$$

$$I_{pc} (\mu\text{A}) = -2,99 v (\text{mV/s}^{-1}) - 27,12 \quad (r^2=0,990)$$

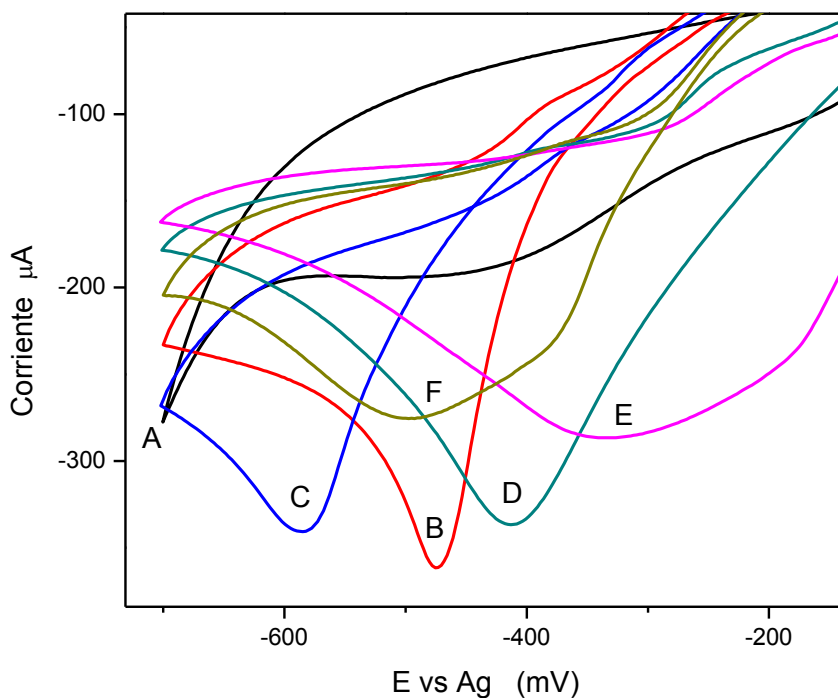
Anteriores autores tales como Liu y col reportan para electrodos de oro modificados con HRP, procesos reversibles en el rango de 50-700 mVs^{-1} en contraste a Xu y col que reportan solo en el intervalo entre 50 a 200 mVs^{-1} para electrodos de carbono.

4.6 EFECTO DEL PH EN LA DETECCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

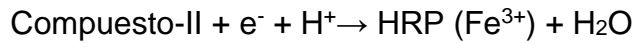
Es bien sabido que el pH influye en la conformación de la enzima y sus propiedades biocatalíticas. Para tal estudio se prepararon las siguientes soluciones tampón: 10 mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3.0), 10 mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), 10 mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6.0, 7.0 y 8.0) y 10mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10.0). A cada una de las soluciones anteriores se le añadió H_2O_2 a concentración de 5 mM.

La figura 18 muestra los voltamperogramas obtenidos para las soluciones descritas anteriormente de un electrodo modificado con PPR/GA/NTP a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1}

Figura 18 muestra los voltamperogramas cíclicos para un electrodo PPR/GA/NTP obtenidos para los diferentes pH, H_2O_2 5mM. A) 3 (—), B) 5 (—), C) 6 (—), D) 7 (—), E) 8 (—), F) 10 (—).

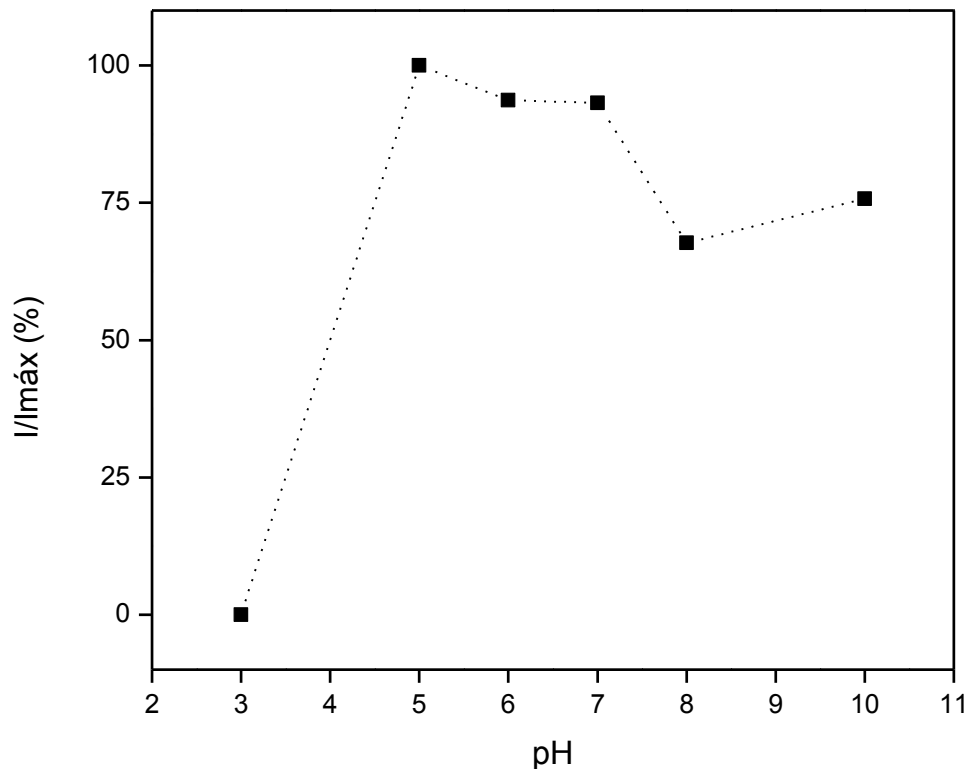


En los voltamperogramas cíclicos de la figura 18 se puede apreciar un desplazamiento del potencial de reducción del H_2O_2 . Ferapontova y col. dedujeron que este hecho se debía a que la concentración de protones aumenta drásticamente la velocidad de la transferencia de electrones entre el electrodo y la enzima. Así entonces en la etapa determinante de la reacción (sección 4.3) está dada por la ecuación:



La figura 19 muestra la respuesta del biosensor a los diferentes pH trabajados. El pH a la cual se presentó mayor respuesta fue a pH 5.

Figura 19. Dependencia de la respuesta del biosensor en función del pH.

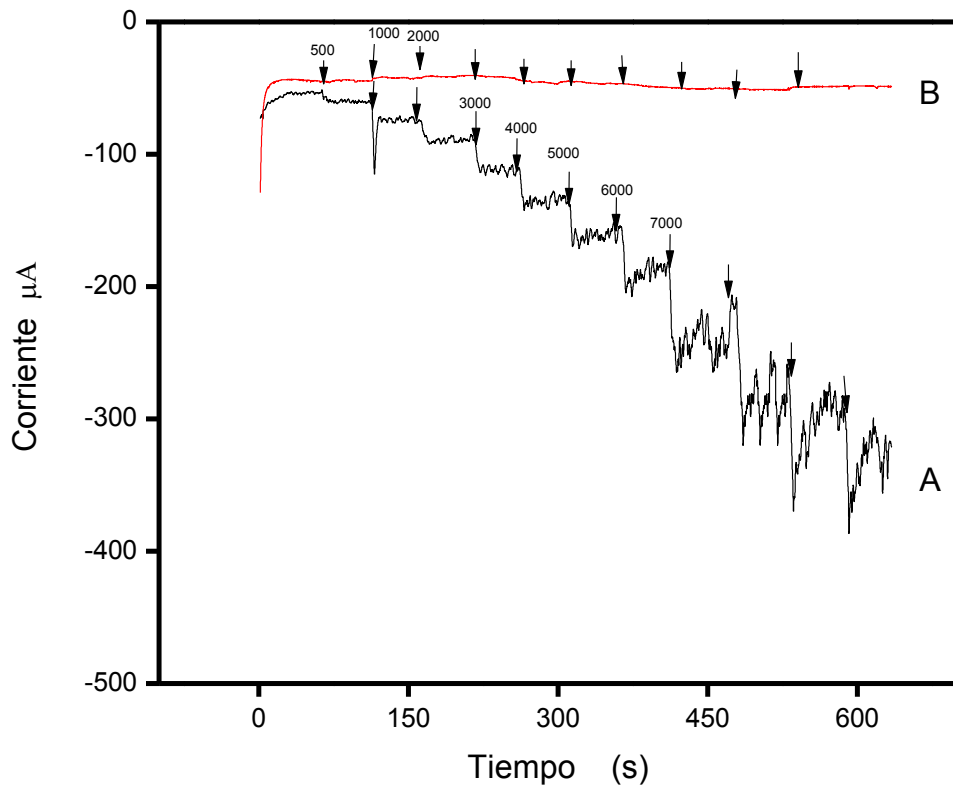


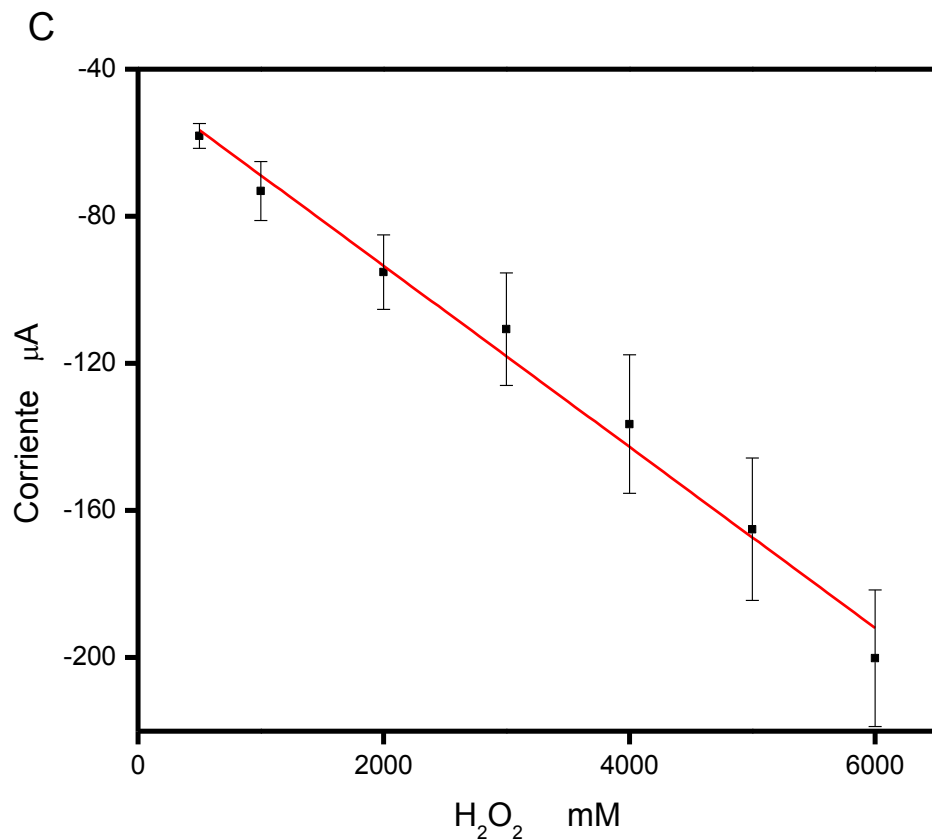
Entre pH 5 y pH 7, la enzima mantiene hasta un 93% de su actividad catalítica, a medida que nos acercamos a pH ácidos no hay respuesta por parte del biosensor, pero, en cambio hay respuesta significativa a pH básico (pH: 10). El rango en el que la HRP da una respuesta está entre 6-8 (Wang y col., 2012) (Xu y col., 2014) en comparación con el de la PPR 5-10 reportado en el presente trabajo.

4.7 RESPUESTA DEL BIOSENSOR A ADICIONES SUCESIVAS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR CRONOAMPEROMETRÍA.

Se usó cronoamperometría para evaluar el cambio de corriente en el tiempo cuando se variaba la concentración de H_2O_2 en una solución tampón y así hallar la sensibilidad y la linealidad de la respuesta del electrodo PPR/GA/NTP mediante la construcción de curvas de calibración. El voltaje aplicado fue de -0.4 V resultado que se dedujo de la señal obtenida en los voltamperogramas cíclicos (sección 4.4) La figura 20 A) muestra el resultado de la cronoamperometría de un electrodo PPR/GA/NTP para sucesivas adiciones de soluciones de H_2O_2 de diferente concentración B) cronoamperograma de un electrodo sin modificar para variaciones de la concentración de H_2O_2 , C) Curva de calibración obtenida del cronoamperograma A.

Figura 20. Respuesta corriente vs tiempo para la adición de H₂O₂ a una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag. A) Electrodo modificado con PPR/GA/NTP B) electrodo sin modificar. C) Curva de calibración obtenida de la curva A. Cada flecha indica la adición de una solución concentrada de H₂O₂ y encima de esta la concentración de peróxido en la solución. Potencial aplicado -0.4 V





Según la curva C de la figura 20, hay una relación lineal entre la corriente y la concentración de peróxido en el rango de 500 μM hasta 6000 μM . La ecuación que se ajusta por regresión lineal de los datos está dada a continuación:

$$i (\mu A) = -0,02461 ([H_2O_2] mM) - 44,2620$$

Esta ecuación presenta un coeficiente de correlación r^2 de 0,9853. Este valor indica que tanto se ajusta la ecuación de la recta a los datos obtenidos. La sensibilidad del método se define entonces como el valor absoluto de la pendiente, es decir, 0,02461 para un electrodo modificado PPR/GA/NTP en un rango de 500-6000 μM .

El límite de detección (LD) entonces sería la menor concentración de peróxido cuya señal puede ser distinguida de la del ruido. Para esta técnica analítica el límite de detección fue de 432,71.

El LD fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{k * s_b}{m}$$

Donde k es el llamado factor de confianza, ($K=3.$), s_b corresponde a la desviación estándar de la determinación del blanco y m es la sensibilidad de calibrado. (Gary y col., 1983)

A continuación se presentan algunos trabajos en donde se usan algunos elementos usados en este trabajo, ya sea la enzima el electrodo o la forma de inmovilización.

Tabla 4: Comparación de los parámetros analíticos con algunos biosensores ya reportados.

Enzima /Sustrato	Inmovilización/Tipo de electrodo	Parámetros analíticos	Referencia
PPR/H ₂ O ₂	Adsorción física ayudada por NTP y GA /Oro	R.L.: 500-6000 μM L.D.: 425 μM	Este trabajo
PPR/ H ₂ O ₂	Adsorción física/Grafeno	R.L.: 1-700 μM L.D.: ----	Castillo y Col., 2005
HRP/ H ₂ O ₂	Unión con cisteamina y oro coloidal/Oro	R.L.: 1,4- 5200 μM L.D.: 0,8 μM	Yi i Col. 2000
HRP/ H ₂ O ₂	Entrecruzamiento con GA/Carbono vidrioso	R.L.: 3,4-2000 μM L.D.: 0,1 μM	Zhou y Col., 1998
HRP/ H ₂ O ₂	Entrecruzamiento con GA/Carbono modificado	R.L.:2-5000 μM L.D.:0.3 μM	Ruan y Col., 1997
HRP/ H ₂ O ₂	Electrodos serigrafados modificados	L.D.: 49,5 μM	Moody y Col., 2001

R.L.: Rango lineal; L.D: Límite de detección

Según la tabla 4, el rango lineal del biosensor diseñado es similar a los reportados anteriormente, en el orden de 100-5000 micromolar, y aunque el límite de detección está por encima de la media, este podría ser mejorado haciendo modificaciones químicas sobre los NTP o con la purificación de la enzima trabajada

En el desarrollo del presente biosensor se explora nuevas fuentes de obtención de enzima. La peroxidasa de palma real es una alternativa con mejores características (rango de trabajo según el pH, estabilidad térmica) a la ya estudiada peroxidasa de rabano picante. Además como se puede observar en la tabla 3, el uso de nanotubos de péptidos es una herramienta que ha tenido su auge en la última década. . Aquí volvemos afirmar el uso del glutaraldehido como un agente entrecruzante entre enzimas y NTP o NTC.

Este proyecto de grado podría ser un primer paso para el desarrollo de nuevos biosensores usando materia prima cultivada en nuestro territorio y aumentar las investigaciones en nuestro país hacia el diseño de estos, ya que prometen ser una potente herramienta analítica hacia los problemas que la sociedad demanda hoy en día.

5. CONCLUSIONES

- ✓ Se diseñó un biosensor amperométrico mediante la adsorción física de nanotubo de péptido unidos a la peroxidasa de palma real con glutaraldehído como agente entrecruzante sobre la superficie de electrodos de oro serigrafiados para la detección de peróxido de hidrógeno.
- ✓ La extracción y semipurificación de la peroxidasa proveniente de las hojas de palma real tuvo un factor de purificación de 6.5 y un rendimiento del 55%. En cada etapa del proceso se cumplió el objetivo, hecho que se afirma por el aumento de la actividad específica.
- ✓ La caracterización de la superficie de los electrodo de oro modificado mediante el uso de ferrocianuro de potasio y voltamperometría cíclica como técnica analítica, confirmaron que los nanotubos de péptidos aumentan la conductividad eléctrica y mejoran las propiedades electroquímicas del electrodo.
- ✓ El biosensor diseñado presentó transferencia de electrones desde el sitio catalítico de la enzima al electrodo mediante el uso de nanopéptidos de difenilalanina.
- ✓ La reducción del peróxido de hidrógeno se observó como un aumento de la corriente hacia los -0.4 V vs Ag y solo fue observado para el electrodo modificado con PPR/GA/NTP
- ✓ El estudio por voltamperometría cíclica del efecto de la variación de la velocidad de barrido lineal demostró que la reducción del peróxido de hidrógeno es un proceso reversible controlado en la superficie.

- ✓ El pH óptimo para el electrodo modificado con PPR/GA/NTP fue de 5. A pH 3 la respuesta fue nula y la mínima respuesta fue a pH 10.

- ✓ El método analítico presentó un rango lineal para la detección de peróxido de hidrógeno en el rango de 500 μM hasta 6000 μM con una sensibilidad de 0,02461 y un límite de detección de 432 μM .

6. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar la selectividad del electrodo PPR/GA/NTP en presencia de posibles interferencias como glucosa, etanol, ácido cítrico utilizando cronoamperometría.
- ✓ Evaluar el efecto de la temperatura para el electrodo PPR/GA/NTP a la respuesta de peróxido de hidrógeno.
- ✓ Caracterizar la superficie del electrodo con técnicas como espectroscopia de impedancia o imágenes SEM.
- ✓ Modificar los nanotubos de péptidos con grupo tioles para crear un enlace químico con la superficie del electrodo.

BIBLIOGRAFÍA

- (s.f.). En J. M. Gutiérrez, *El diagnóstico bioquímica de las micobacterias* (pág. 39). Sevilla.
- Abramovich, L., Mossberg, M., & Gazit, E. (2010). Characterization of Peptide-Nanostructure-Modified Electrodes and Their Application for Ultrahigh Sensitivity Environmental Monitoring. *InterScience*.
- Alpeeva, I., Niculescu-Nistor, M., Castillo, J., Csoregi, E., & Sakharon, I. (2005). Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*.
- Al-Senaidy, A., & Ismael, M. (2011). Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Altman, N. (1993). El peróxido de hidrógeno. En N. Altman, *Terapias de oxígeno: para una óptima salud y vitalidad*.
- Baynton, K., Bewtra, J., Biswas, N., & Taylor, K. (1993). Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a Kinetic investigation. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Borgmann, S., Schulte, A., Neugebauer, S., & Schuhmann, W. (s.f.). Amperometric Biosensors.
- Bowers, L. (s.f.). Immobilized enzymes in chemical analysis. *trends in analytical chemistry*.
- Capacho, L. (07 de Junio de 2015). *Estudio electroquímico y espectroelectroquímico de componentes de sales orgánicas conductoras*.
Obtenido de
<http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/4459/9788469416419.pdf?sequence=1>
- Cass, A., Davis, G., & Francias, G. (1984). Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical Chemistry*, 667-671.

- Castillo, J. (2001). Separación y caracterización de las isoenzimas de la peroxidasa de palma real (*Roystonea Regia*). *UIS*.
- Castillo, J., Svendsen, W., Rozlosnik, N., & Castillo, J. (2013). Detection of cancer cells using a peptide nanotube-folic acid modified graphene electrode. *Analyst*.
- Castillo, J., Svendsen, W., Rozlosnik, N., Escobar, P., Martinez, F., & Castillo, J. (2013). Detection of cancer cells using a peptide nanotube-folic acid modified graphene electrode. *RSC Publishing*.
- Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. (2000). Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH. *Biochemistry*.
- Ferapontova, E., & Gorton, L. (2002). Effect of pH on direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase. *Bioelectrochemistry*, 83-87.
- Gazit, E. (2006). Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chemical Society Reviews*.
- González, M., & Costa, A. (s.f.). Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico.
- Gorbitz, C. H. (2001). Nanotube Formation by Hydrophobic Dipeptides. *Chem Eur Journal*.
- Gutiérrez, J. M. (1973). *El diagnóstico bioquímico de las microbacterias*. Sevilla.
- Gutiérrez, J. M. (s.f.). *El diagnóstico bioquímico de las microbacterias*. Sevilla.
- Hamley, I. (2014). Peptides Nanotubes. *Angewandte Reviews*.
- Hamley, I. (2014). Peptides Nanotubes. *Angewandte Reviews*.
- Jeppe, W. T., & Karen, G. W. (1997). Glycosylation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish. *FEBS letter*.
- Jiaying, Q., Ying, D., Yong, W., Tongfang, L., & Xueping, D. (2014). Determination of hydrogen peroxide using a biosensor based on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and horseradish peroxidase with graphene–chitosan composite. *Micro & Nano Letters*.

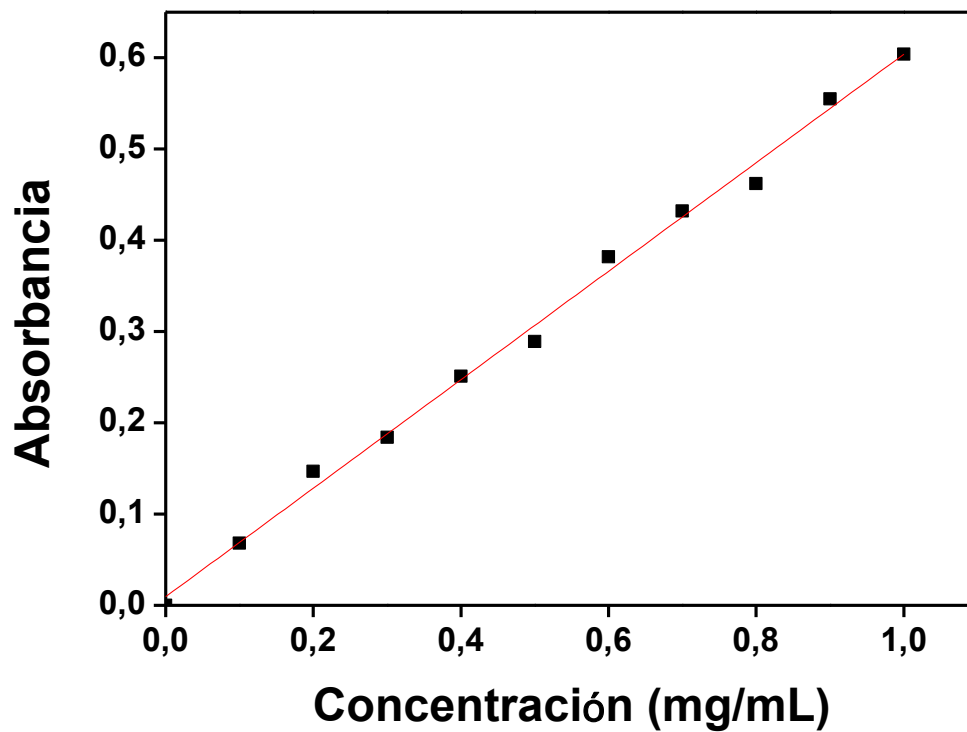
- Krishnaperumal, I., & Lakshmanan, R. (2012). An Approximate Analytical Method for the Evaluation of the Concentrations and Current for Hybrid Enzyme Biosensor. *Advances in Physical Chemistry*.
- Leandra, W., Ribeiro de Moura, P., Zamorano, L., Calvete, J., & Perez, A. (2010). Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Structural Biology*.
- Liu, Y., Yuan, R., Chai, Y., Tang, D., Dai, J., & Zhong, X. (2006). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on gold colloid/cysteine/nafion-modified platinum disk electrode. *Sensors and actuators*.
- Monosik, R., Ansky, M., & Sturdik, E. (2012). Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* , 22-34.
- Ortiz, R., Martínez, Y., & Hernández, R. (05 de Abril de 2015). *Técnicas electroanalíticas*. Obtenido de http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/rmhr/Index_archivos/GuiAIV2.pdf
- Park, B.-W., Zheng, R., Ko, K.-., Cameron, B., & Yoon, D. (2012). A new glucose biosensor using bi-enzyme incorporated with peptide nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 295-301.
- Pauliukaite, R., Ghica, E. M., Filho-Fatibello, O., & Brett, C. (2009). Comparative Study of Different Cross-Linking Agents for the immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite- Epoxy Composite Electrode. *Analytical Chemistry*.
- Peña, N. (2003). *Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos*. Madrid.
- Reviejo, J., & José, P. (2000). Biosensores electroquímicos. Una herramienta útil para el análisis medioambiental alimentario y clínico. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*.

- Sakharov, I. Y., Vesga, M., Galaev, I. Y., Sakharova, I. V., & Pletjushkina, O. Y. (2001). Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Science*.
- Sakharov, I., & Sakharova, I. (2002). Extremely high stability of African oil palm tree peroxidase. *ELSEVIER*.
- Sakharov, I., M.K., V., Galaev, I., & Sakharov, I. (2001). Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: purification and some properties. *Plant Science*.
- Santhanamorthi, N., Kolandaivel, P., Abramovich, L., & Gazit, E. (2011). Diphenylalanine peptide nanotube: charge transport, band gap and its relevance to potential biomedical applications. *ADVANCED MATERIALS*.
- Sheng-fu, W., Dan, D., & Qi-Chao, Z. (2002). Electrochemical behavior of epinephrine at L-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode. *Talanta*.
- Szatrowsky, T., & Nathan, C. (1991). Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *CANCER RESEARCH*, 794-798.
- Thévenot, D., Toth, K., Durst, R., & Wilson, G. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*.
- Wang, Y., Jie, D., Li, Y., Shan, D., Zhou, X., Xue, Z., & Lu, X. (2012). A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. *ELSEVIER*.
- Weber, W. (2003). *Control de la calidad del agua: procesos fisicoquímicos*. Madrid: Reverté.
- Xu, J.-J., Zhou, D.-M., & Chen, H.-Y. (1998). A Reagentless Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the coimmobilization of Thionine and Horseradish Peroxidase by Their Cross-Linking with Glutaraldehyde on Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*.

- Xu, X.-S., Li, J.-I., & Zhou, Z.-L. (2014). A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol-gel thin film on a multi-wall carbon nanotube modified electrode. *Analytical Methods*.
- Yañez, P., & Ana, C. (2005). Biosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro. *Real academia española de química*, 1.
- Yemini, M., Reches, M., Gazit, E., & Rishpon, J. (2005). Peptide Nanotube-Modified Electrodes for Enzyme-Biosensor Applications. *Analytical Chemistry*.
- Yemini, M., Reches, M., Gazit, E., & Rishpon, J. (2005). Peptide Nanotube-Modified Electrodes for Enzyme-Biosensor Applications. *Analytical Chemistry*.
- Yemini, M., Reches, M., Rishpon, J., & Gazit, E. (2005). Novel Electrochemical Biosensing Platform Using Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Nano Letters*.
- Yi, X., Huang-Xian, J., & Chen, H.-Y. (2000). Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on a Colloid/Cysteamine-Modified Gold Electrode. *Analytical Biochemistry*.
- Zamorano, L. (2009). *Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma real (Roystonea regia) una enzima con elevada estabilidad*. Salamanca.
- Zhang, Q., Hao, F., Zhang, J., Zhang, L., Liu, D., Mao, H., . . . Song, X.-M. (2014). Fabrication of an Amino Acid Interlinked Redox Enzyme/Gold Nanoparticles/Graphene Hybrid System for Electrochemical Biosensing. *American Scientific Publishers*.
- Zúñiga, W., & Ruiz Luis Fernando, V. M. (s.f.). *Bioingeniería*.

ANEXOS

ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE BRADFORD



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

$$R^2 = 0.9951$$

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

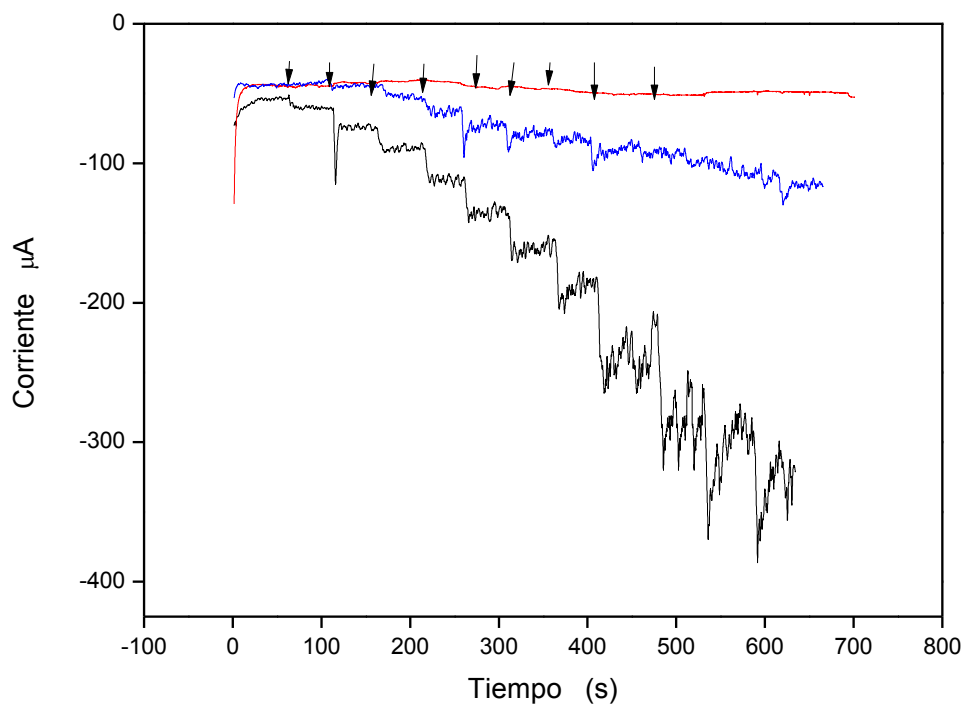
La actividad específica de la peroxidasa soluble se determinó de la siguiente manera

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

Dónde:

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

ANEXO C: CRONOAMPEROMETRÍA PARA ELECTRODOS SIN MODIFICAR Y MODIFICADOS CON NTP Y PPR/GA/NTP



El anexo muestra la respuesta de un electrodo sin modificar (rojo) modificado con NTP (azul) y PPR/GA/NTP (negro) a sucesivas adiciones de una solución concentrada de peróxido de hidrógeno