

Síntesis de nanoestructuras de carbono funcionalizadas con peroxidasa de rábano picante y
evaluación de su estabilidad por dinámica molecular.

Qca. Sandra Viviana Valcárcel Méndez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magíster en Química

Director

Rafael Cabanzo Hernández

Magíster en Física

Codirector

Enrique Mejía Ospino

Doctor en Ciencias Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

*“A Dios, quien me ha dado la vida, fortaleza y guía para superar
cada desafío en este proceso académico”*

“A mi hijo Daniel David, por ser mi mayor inspiración...”

Agradecimientos

A Dios misericordioso, por darme el regalo de la vida, la salud y por poner en mi camino a personas y experiencias que han sido pilares en mi crecimiento personal y académico.

A mi familia, quienes ha sido la fuerza que han impulsado este logro. Su amor constante y sus consejos han sido mi mayor motivación.

A Jorge Quintero, por su invaluable amistad, esfuerzo y paciencia. Su dedicación y conocimientos fueron clave para avanzar en esta investigación.

Al Doctor Enrique Mejía Ospino y al Magíster Rafael Cabanzo Hernández, por su guía excepcional, paciencia y valiosa orientación. Su apoyo y conocimientos han sido fundamentales en mi desarrollo profesional y en la culminación de este proyecto.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Marco conceptual.....	19
1.1 Nanoestructuras de carbono	20
1.2 Puntos de carbono	21
1.2.1 Clasificación de los CDs.....	23
1.2.2 Métodos de síntesis de puntos de carbono.....	24
1.2.2.1 Síntesis Top-Down.....	25
1.2.3 Óxido de grafeno.....	26
1.2.4 Propiedades fotoluminiscente de los CDs.....	29
1.3 Peroxidasa de rábano picante (HRP)	33
1.4 Funcionalización de CDs con HRP.....	35
1.5 Dinámica molecular	36
1.6 Campos de fuerza.....	38
2. Objetivos	41
2.1 Objetivo General.....	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41
3. Materiales y métodos	42
3.1 Reactivos.....	42
3.2 Síntesis y funcionalización de Puntos de Óxido de Grafeno	42
3.1.1 Síntesis de óxido de grafeno (OG).....	42
3.1.2 Síntesis de GODs	43

3.1.3 Citotoxicidad de GODs.....	45
3.1.3 Funcionalización de GODs	45
3.1.4 Ensayos de la Actividad Enzimática.....	47
3.1.4 Caracterización de GODs y GODs-HRP.....	48
3.1.4.2 Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS):.....	48
3.1.4.3 Espectroscopia de Fluorescencia:	48
3.1.4.4 Espectroscopia Raman:	49
3.1.4.5 Espectroscopia Infrarroja-ATR:.....	50
3.1.4.6 Difracción de rayos X (DRX):.....	51
3.2 Simulaciones computacionales	52
3.2.1 Modelos moleculares y campos de fuerza	53
3.2.2 Simulaciones de dinámica molecular.....	58
3.2.3 Cálculos MM-GBSA y acoplamiento molecular.....	61
4. Resultados y discusión.....	63
4.1 Síntesis y caracterización de OG	63
4.1.1 Espectroscopia UV-Vis.....	64
4.1.2 Espectroscopía de Fluorescencia	64
4.2 Síntesis y caracterización de GODs	67
4.2.1 Efecto del pH	67
4.2.1 Efecto de la temperatura en la síntesis de GODs.....	70
4.2.2 Efecto de la concentración.....	72
4.2.3 Caracterización de GODs	74
4.2.3.1 Espectroscopía UV-Vis.....	74

4.2.3.2 Espectroscopía de fluorescencia.....	76
4.3 Funcionalización y caracterización de GODs.....	79
4.3.1 Análisis por Espectroscopia UV-Vis y DLS.....	79
4.3.2 Espectroscopia de fluorescencia.....	83
4.3.3 Actividad enzimática.....	86
4.3.4 Difracción de Rayos X (DRX).....	88
4.3.5 Espectroscopía Infrarroja-ATR.....	92
4.3.6 Espectroscopía Raman.....	94
4.3.7 Espectroscopía XPS.....	97
4.4 Resultados computacionales.....	100
4.4.1 Validación de los parámetros FF.....	101
4.4.2 Resultados MD del sistema GODs-HRP.....	108
4.2.3 Resultados MM-GBSA del compuesto GODs-HRP.....	112
4.2.3 Resultados de acoplamiento molecular.....	118
5. Conclusiones.....	124
6. Recomendaciones.....	126
Referencias Bibliográficas.....	127
Apéndices.....	145

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Relación entre los mecanismos PL, propiedades PL con los diferentes tipos de CDs ...	33
Tabla 2. Parámetros de adquisición para la síntesis hidrotérmica asistida por microondas de GODs	44
Tabla 3. Parámetros de adquisición para la toma de los espectros Raman.....	49
Tabla 4. Parámetros de adquisición para el registro de los espectros de FTIR	50
Tabla 5. Parámetros de adquisición para la toma de los espectros de XPS	51
Tabla 6. Parámetros de adquisición para la toma de los difractogramas.	51
Tabla 7. Transiciones electrónicas observadas en los espectros de absorción UV-Vis.....	81
Tabla 8. Constantes cinéticas y actividad específica de la HRP Y GODs-HRP.....	88
Tabla 9. Información estructural de los difractogramas de OG, GODs, GODs-HRP and HRP...	90
Tabla 10. Identificación de las bandas de absorción del OG, GODs, GODs-HRP en el Infrarrojo.	93
Tabla 11. Identificación de los modos vibracionales observados en el análisis Raman de OG, GODs, GODs-HRP.....	97
Tabla 12. Resultados de RMSD y RG para las unidades moleculares HRP, GODs y Hemo en la funcionalización GODs-HR, a partir de 100 ns de simulaciones MD.....	109
Tabla 13. Resultados de los cálculos MM-GBSA a partir de 100 ns de simulaciones MD para las 20 configuraciones de la funcionalización GODs-HRP. Valores de energía libre de Gibbs reportados en kJ/mol.....	113
Tabla 14. Resultados de los cálculos de acoplamiento molecular. Valores reportados en kJ/mol.	121

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Nanoestructuras de Carbono.....	20
Figura 2. Clasificación de los puntos de carbono (CDs)	23
Figura 3. Métodos de síntesis de CDs.....	25
Figura 4. Estructuras simplificadas de CDs: QCDs (izquierda); CQDs (central); y GO (derecha)	27
Figura 5. Esquema de la conversión de grafito en polvo en óxido de grafeno (OG) mediante el método de Hummer modificado	28
Figura 6. Esquemas de los diferentes mecanismos PL. (a) Diagramas de niveles energéticos tipo I, II y III; (b) esquema PL mediante confinamiento cuántico; (c) esquema PL mediante estados de superficies; (d) esquema PL mediante estado molecular; (e) esquema PL mediante emisión mejorada por entrecruzamiento.....	30
Figura 7. Estructura tridimensional de la enzima HRP (a); reacción general de la enzima HRP (b); esquema de formación de intermedios durante de la reactividad de la HRP (c)	34
Figura 8. Esquema general de la ruta de síntesis de la funcionalización entre CDs y la HRP.	36
Figura 9. Esquema general de las simulaciones computacionales para el estudio del sistema funcionalizado GODs-HRP	53
Figura 10. Modelo estructural de lámina GODs.....	54
Figura 11. Esquema representativo de la construcción del compuesto GODs-HRP.....	57
Figura 12. Configuraciones GODs-HRP para los cálculos computacionales.....	58

Figura 13. Esquema general para preparar los sistemas atómicos para dinámica molecular. 59

Figura 14. Espectros UV-Vis del OG a 25 h y 18 h de oxidación. En el interior se observa el producto obtenido de OG de 18 h y 25 h respectivamente 63

Figura 15. Espectros de excitación (a) y emisión (b) del OG..... 65

Figura 16. Espectros de emisión de GODs a diferentes valores de pH (6-12). Espectro de emisión del OG. λ_{exc} :320 nm..... 68

Figura 17. Espectros de fluorescencia de GODs preparados con OG de a) 10 x10³ mgL ; b) 25x10³ mgL; c) 50 x10³ mgL ;d) 150 x10³ mgL; 250 x10³ mgL a diferentes temperaturas, con longitud de onda de excitación: 330 nm. 71

Figura 18. Soluciones de OG de concentraciones: 10 x10³ mgL., 25x10³ mgL , 50 x10³ mgL , 150 x10³ mgL , 250 x10³ mgL..... 72

Figura 19. GODs obtenidas a diferentes concentraciones de OG..... 72

Figura 20. Espectros de fluorescencia de GODs preparados a diferentes concentraciones de OG: 10 x10³ mgL., 25x10³ mgL , 50 x10³ mgL , 150 x10³ mgL , 250 x10³ mgL, con longitud de onda de excitación: 320 nm, T: 190 °C. 74

Figura 21. Espectros UV-Vis de OG y GODs. 75

Figura 22. Espectro de excitación (PLE) y espectros de emisión (PL) de fluorescencia de GODs. En el interior se muestra la longitud de onda de excitación 77

Figura 23. Espectros UV-Vis de OG, GODs, HRP y GODs-HRP. 80

Figura 24. Histogramas de GODs y GODs-HRP..... 81

Figura 25. Espectros de fluorescencia en estado estacionario. a) Espectro de excitación (PLE) y espectros de emisión (PL) de fluorescencia de la enzima HRP. En el interior se muestra la longitud

de onda de excitación y emisión. b) Espectro de emisión (PL) del sistema funcionalizado GODs-HRP cond 4. En el interior se muestra las longitudes de onda de excitación 84

Figura 26. Espectros de emisión (PL) de fluorescencia de los sistemas funcionalizados GODs-HRP (condiciones 1- condición 4). En el interior se muestra la longitud de onda de excitación a 318 nm y 280 nm. 85

Figura 27. Gráficas de Lineweaver-Burk de la HRP libre y del sistema GODs-HRP..... 87

Figura 28. Difractogramas del OG, GODs y GODs-HRP..... 91

Figura 29. Espectros IR del OG, GODs y GODs-HRP 92

Figura 30. Espectros Raman del OG, GODs y GODs-HRP..... 95

Figura 31. Banda C1s de los espectros XPS de OG, GODs, HRP libre y de la funcionalización GODs-HRP. Las bandas con colores diferentes al azul representan las deconvoluciones. (a) OG; (b) GODs; (c) HRP libre; (d) GODs-HRP 98

Figura 32. Parámetros geométricos y estructurales para la validación de la topología FF del grupo Hemo. (a) Estructura tridimensional; (b) distancias de enlace N-Fe; (c) Ángulos diedros C-N-N-C; (d) RMSD; (e) radio de giro (R_G) 101

Figura 33. Parámetros geométricos y estructurales para la validación de la topología FF de la enzima HRP (incluido el grupo Hemo dentro de la enzima). (a) Superposición de la estructura tridimensional del grupo Hemo (rojo: estructura original; resultados de MD); (b) distancias de enlace N-Fe del grupo Hemo; (c) Ángulos diedros C-N-N-C del grupo Hemo; (d) RMSD de la unidad proteica y el grupo Hemo; (e) radio de giro (R_G) de la unidad proteica y el grupo Hemo; (f) Resultados del RMSF de la proteína..... 106

Figura 34. Validación de la topología FF para la lámina de GODs. (a) Superposición de la estructura tridimensional del grupo Hemo (rojo: estructura optimizada; resultados de MD); (b) RMSD; (c) Radio de giro (R_G)..... 107

Figura 35. Superposición de las estructuras del compuesto GODs-HRP obtenidas a partir de 100 ns de simulaciones MD. Las estructuras en color rojo para $t = 0$ ns. Las estructuras en color azul para $t = 100$ ns..... 111

Figura 36. Perfiles de distribución de frecuencia de puentes de hidrógeno en la interfaz GODs-HRP para las configuraciones S1 y S7 a partir de 100 ns de simulaciones MD..... 116

Figura 37. Mapa 2D de contacto entre la lámina de GODs y HRP en la interfaz GODS-HRP a partir de las simulaciones MD en $t = 100$ ns..... 117

Figura 38. Representación estructural del canal de entrada al sitio activo de la HRP. La superficie en color amarillo corresponde a los residuos aa del canal de entrada. (a) HRP nativa; (b) HRP luego de optimizada su estructura; (c) S7; (d) S11. 120

Figura 39. Mapa 2D de interacciones ligando-receptor. (a) HRP libre; (b) S7; (c) S11. 123

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Protocolo para las simulaciones de acoplamiento molecular del sistema GODs-HRP-fenol.	145
Apéndice B. Método comparativo para el cálculo del rendimiento cuántico de GODs.	148
Apéndice C. Constantes cinéticas y actividad específica de los sistemas funcionalizados GODs-HRP: condición 1, 2 y 3.	149
Apéndice D. Resultados de RMSD, R_G y RMSF a partir de 100 ns de simulaciones MD para la funcionalización GODs-HRP.	150
Apéndice E. Perfiles de distribución de frecuencias de puentes de hidrógeno entre el GODs y la enzima HRP.	155

Resumen

Título: Síntesis de nanoestructuras de carbono funcionalizadas con peroxidasa de rábano picante y evaluación de su estabilidad por dinámica molecular.*

Autor: Sandra Viviana Valcárcel Méndez**

Palabras Clave: Nanoestructuras de carbono, puntos de óxido de grafeno, peroxidasa de rábano picante, emisión de fluorescencia, biosensor.

Descripción: En este trabajo se reporta la síntesis de un biosensor, en fase homogénea, a partir de la funcionalización de nanoestructuras de carbono de tipo Puntos de Óxido de Grafeno (GODs) con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, por su nombre en inglés) a través de la formación de un enlace peptídico. La síntesis de GODs se llevó a cabo siguiendo una metodología hidrotérmica asistida por microondas. Las GODs obtenidas presentaron alta estabilidad, distribución monodispersas con tamaño de partícula promedio alrededor de 10 nm, rendimiento cuántico de 8.02% con anchos de bandas de emisión de aproximadamente 70 nm. La funcionalización con HRP se realizó estableciendo previamente las condiciones más favorables del proceso de interacción con GODs. La formación del enlace peptídico entre GODs y HRP fue evaluada mediante técnicas espectroscópicas (Espectroscopía Raman, Infrarroja, UV-Vis, XPS) y por difracción de rayos X. Adicionalmente, la espectroscopia FTIR, Raman, XPS permitieron verificar que la estructura secundaria de la enzima se conserva. Los resultados por espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y espectroscopia UV-Vis revelaron que el sistema GODs-HRP obtenido retienen las propiedades fotoluminiscentes propias de los GODs. Finalmente, se realizaron cálculos computacionales (usando el campo de fuerza Amber y el paquete de programas Gromacs) para estudiar la estabilidad estructural de la enzima HRP funcionalizada con las GODs.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rafael Cabanzo Hernández. Magíster en Física. Codirector: Enrique Mejía Ospino. Doctor en Química.

Abstract

Title: Synthesis of Carbon Nanostructures Functionalized with Horseradish Peroxidase and Stability Evaluation with Molecular Dynamics*

Autor: Sandra Viviana Valcárcel Méndez**

Key Words: Carbon nanostructures, graphene oxide dots, horseradish peroxidase, fluorescence emission, biosensor

Description: in this work we report the synthesis of carbon nanostructures (GODs) and its integration with horseradish peroxidase (HRP) enzyme as a potential detection tool, will provide a new and highly sensitive fluorometric method for phenol. Carbon nanostructures were obtained via a microwave-hydrothermal-assisted synthesis, which showed a high stability, monodisperse distribution with average particle size around 10 nm, quantum yield of 8%. The functionalization with HRP was carried out establishing the most favorable conditions of the interaction process with GODs through a peptide bond which was evaluated by spectroscopic techniques. Subsequently, we observed that the fluorescence of the GODs-HRP system is affected by the addition of traces of phenol indicating that the HRP still retains its enzymatic activity and that it allows the catalytic reaction between GODs-HRP and phenol. Additionally, FTIR, Raman spectroscopy and molecular simulations (molecular docking and molecular dynamics) allowed to verify that the secondary structure of the enzyme preserves.

* Degree Work

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Rafael Cabanzo Hernández. Magíster en Física. Codirector: Enrique Mejía Ospino. Doctor en Química.

Introducción

En las últimas décadas, la nanociencia y la nanotecnología han emergido como disciplinas de gran impacto, revolucionando sectores como la industria, la medicina, la biotecnología, la agricultura y el medio ambiente (Omietimi et al., 2023). Estas disciplinas han facilitado un entendimiento profundo de la materia a escala nanométrica, propiciando el desarrollo de nuevos materiales y tecnologías avanzadas. La nanociencia se enfoca en el estudio de las propiedades, composición y comportamiento de la materia a nivel nanométrico, mientras que la nanotecnología aplica este conocimiento para manipular y utilizar nanomateriales con propiedades únicas (Malik et al., 2023). Esta convergencia ha dado lugar al descubrimiento de una amplia gama de nanomateriales con propiedades excepcionales en comparación con aquellos materiales a granel (Cayuela et al., 2015).

Partiendo de lo anterior, los nanomateriales más prometedores se encuentran los basados en carbono; siendo los puntos de carbono una subclase de materiales carbonáceos los de mayor interés (Mansuriya & Altintas, 2021b). Este tipo de nanomateriales, con tamaños de ~10 nm descubiertos a mediados de la década de los 2000s, son en la actualidad los más estudiados debido a sus características únicas frente a aquellos materiales carbonáceos a granel; así como también frente a materiales nanométricos semiconductores inorgánicos (SQDs) (Mansuriya & Altintas, 2021a; Ozyurt et al., 2023). Algunos ejemplos que destacan las cualidades únicas de los puntos de carbono son: su elevada actividad electro-catalítica, biocompatibilidad, baja toxicidad, buena solubilidad en medios acuosos, bajos costos de producción, y propiedades fotoluminiscentes intrínsecas (que no son observadas en otros materiales carbonáceos como fullerenos, diamante, nanotubos de carbono, diamante, entre otros) que pueden ser moduladas gracias a su facilidad para ser modificados tanto en composición como en estructura; logrando obtener resultados de

eficiencia de emisión lumínica cercanos o iguales a los SQDs (Bao et al., 2023; Ding et al., 2020; Zhu et al., 2015). Esto último lo hacen materiales promisorios en diferentes aplicaciones como bioimagen para la detección precisa de diversas patologías incluidas cáncer, agentes terapéuticos en la fototerapia dirigida; además de ser usado como biosensores (Mansuriya & Altintas, 2021a; Ozyurt et al., 2023).

Una de las características de los materiales carbonáceos, como el óxido de grafeno, es su capacidad para ser modificados químicamente; dando lugar a la aparición de los puntos de óxidos de grafeno. Estos son una subclase especial de puntos de carbono que tienen como característica particular la presencia de grupos oxigenados (*e.g.* -C=O, -OH, -COOH y -O-) tanto en la superficie como en sus bordes; además de conservar las propiedades fotoluminiscentes intrínsecas de los puntos de carbono (Trikkaliotis et al., 2021). Estas dos cualidades, hacen que los puntos de óxidos de grafeno sean excelentes candidatos para ser usados en el campo ambiental, ya bien sea para la captura de metales pesados, o la detección de diversos contaminantes en aguas de diversas fuentes (Mushahary et al., 2024). Además, este tipo de materiales pueden ser funcionalizados con otras moléculas y han demostrado ser muy útiles en la fabricación de diversos sensores; debido a sus ventajas en términos de costo de fabricación, elevada selectividad, sensibilidad y estabilidad química frente a otros materiales para el mismo fin (Mushahary et al., 2024).

Algunos reportes que demuestran la aplicabilidad de los puntos de óxidos de grafeno como sensores se destaca el estudio reportado por Wong et al., quienes llevaron a cabo la construcción de un biosensor fluorométrico formado por un compuesto de óxido de grafeno funcionalizado con ácido fólico, nanopartículas de oro y la proteína seroalbúmina bovina (FA-GO-BSA/AuNCs) para la detección de glutatión (GSH, un importante agente molecular para la detección y cura del cáncer); demostrando su bajo costo de producción, simplicidad en su síntesis, y el potencial uso

de estos materiales carbonáceos (Wong et al., 2021). Por otra parte, Wei et al., reportaron el diseño y uso exitoso de un sensor fluorométrico usando óxido de grafeno funcionalizado con colágeno para la detección de dopamina (marcado biomolecular para la detección de Alzheimer) mostrando buena selectividad y de uso practica en muestras de suero sanguíneo (B. Wei et al., 2019). Por último, Muthurasu et al., reportaron por primera vez la funcionalización de láminas de óxido de grafeno con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) para la detección y cuantificación de peróxido de hidrógeno (Muthurasu & Ganesh, 2014), abriendo una ventaja en el desarrollo de nuevos sensores basados en óxido de grafeno funcionalizados con enzimas, incluida la HRP (Hashim et al., 2021). Es decir, la presencia de grupos funcionales epóxidos, carboxilos e hidroxilos hacen posible anclar estos materiales carbonáceos con diversas enzimas mediante enlaces peptídicos (Zhu et al., 2015); permitiendo el diseño de biosensores con propiedades fotoluminiscentes para la detección de determinados analitos (Mushahary et al., 2024). En este sentido, surge la necesidad de establecer herramientas analíticas que sean precisas, específicas, rápidas y sensibles para detectar diferentes contaminantes ambientales entre los cuales se destacan los compuestos aromáticos, como los fenoles, cuya naturaleza los hace muy estables, solubles en agua, altamente nocivos y de difícil degradación ambiental (Wu et al., 2016). Estos compuestos están presentes en residuos de aguas de industrias como planta de gases, fabricación de cosméticos, textil, minería, plantas de coque, plantas metalúrgicas entre otras (Anku et al., 2017); convirtiéndose en un foco importante de contaminación ambiental para los ecosistemas acuáticos (Z. Li et al., 2014).

Los métodos más comunes para la determinación de compuestos fenólicos y sus derivados incluyen cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis capilar, métodos electroquímicos, quimioluminiscencia electrogenerada (ECL), cromatografía de gases-

espectrometría de masas (GS-MS), entre otros (Paun et al., 2024). Algunos de estos métodos tienen buenos rendimientos; pero a su vez poseen altos costos, consumo de tiempo en el pretratamiento y análisis de muestras, procedimientos operacionales complicados y requieren de instrumentos sofisticados.

A partir de lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación inició con la síntesis y caracterización de puntos de carbono a partir del óxido de grafeno (OG), y posteriormente se realizó su funcionalización con la enzima HRP (OG-HRP). Diferentes técnicas analíticas (*e.g.* espectroscopia UV-Vis, espectroscopia IR, espectroscopia Raman, DLS y XPS) fueron usadas para la verificación de la obtención del compuesto OG-HRP. Posteriormente realizaron estudios de actividad enzimática tanto de la HRP libre como el sistema funcionalizado OG-HRP para determinar los efectos del óxido de grafeno sobre la estructura y la función enzimática de la HRP frente a compuestos fenólicos. Adicionalmente, se realizaron cálculos computacionales basados en dinámica molecular en conjunto con campos de fuerza para explorar la estabilidad de la estructura secundaria de la proteína HRP funcionalizada con el óxido de grafeno; así como también los posibles puntos de anclaje, energéticamente viables, para la formación del compuesto OG-HRP con miras a establecer su uso promisorio como un sensor fluorométrico para la detección y cuantificación de compuestos fenólicos y derivadas en aguas residuales industriales.

1. Marco conceptual

Durante las últimas décadas, la nanociencia y la nanotecnología son dos disciplinas que han ganado un protagonismo importante en la humanidad, posicionándose en diversos escenarios como la industria, la medicina, la biotecnología, la agricultura, el medio ambiente, entre otros (Omietimi et al., 2023). Además, estas disciplinas se destacan por su aplicación y contribución en campos del conocimiento como la química, la física, la biología y la ingeniería; dando lugar a numerosos descubrimientos y al desarrollo de productos y materiales novedosos con diversos propósitos de aplicación (Dhale & Sharma, 2023; Omietimi et al., 2023). Tanto la nanociencia como la nanotecnología difieren cuanto a sus enfoques y objetivos. Sin embargo, ambas disciplinas están íntimamente relacionadas y convergen en el hecho que se centran en estudiar las propiedades, composición, estructura, comportamiento, síntesis, manipulación y aplicación de la materia a escala nanométrica (alrededor de 1 a 100 nm); es decir, en los nanomateriales (Malik et al., 2023). En este sentido, la nanociencia y la nanotecnología han impulsado la aparición de una gran cantidad de nanomateriales que abarcan desde nanopartículas, hasta nanotubos y nanocristales; presentando propiedades únicas (físicas, químicas y biológicas), comparados con aquellos materiales a granel (Mekuye & Abera, 2023).

En la actualidad, y de acuerdo con la literatura reciente, los nanomateriales se clasifican con base en diversos criterios tales como su fuente de obtención (naturales, artificiales), nivel de toxicidad (carcinógenas, mutagénicas, citotóxicas), la dimensionalidad (nanomateriales 0D, 1D, 2D y 3D), su composición (nanomateriales orgánicos, inorgánicas, metálicos, mixtos, basados en carbón), su estructura (nanotubos, poliméricos, nanoláminas, puntos cuánticos, nanoconos, nanocebollas, entre otros); y finalmente basado en propiedades particulares (nanomateriales semiconductores, conductores, fluorescentes, entre otros) (Mekuye & Abera, 2023). Dentro del

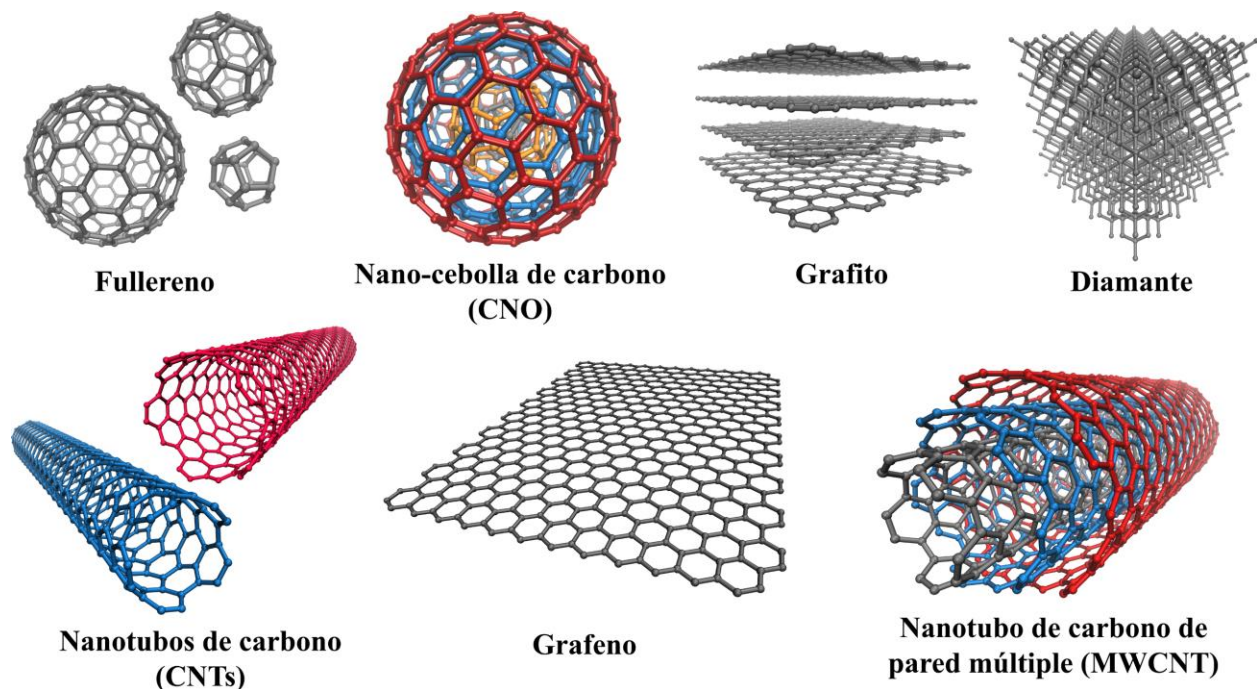
amplio grupo de nanomateriales se encuentran los basados en carbonos; los cuales, han ganado gran importancia en las últimas dos décadas debido a sus propiedades únicas comparados con otros nanomateriales.

1.1 Nanoestructuras de carbono

Los nanomateriales basados en carbono (nanomateriales carbonáceos o nanomateriales de carbono) son considerados una clase aparte de nanomateriales. Lo anterior como consecuencia de la capacidad única que tiene el carbono para formar diferentes tipos de enlaces químicos (-C-C; -C=C-); lo que permite encontrarlo en diversas formas alotrópicas. En la Figura 1, se presentan algunos alótropos comunes de carbono como el diamante, los fullerenos, los nanotubos de carbono (de pared sencilla y múltiple), nanocebollas de carbono, grafeno, grafito, diamante, entre otros (Rao et al., 2021).

Figura 1

Nanoestructuras de Carbono



Adicionalmente, los nanomateriales de carbono no sólo han ganado interés por sus características electrónicas y morfológicas; sino también porque exhiben una versatilidad en cuanto a sus usos promisorios en diversos escenarios (Dhale & Sharma, 2023; Nasrollahzadeh et al., 2019). Esto se evidencia por el aumento exponencial de los reportes en la literatura científica que han demostrado que los nanomateriales de carbono pueden ser usados como sensores, liberación controlada de fármacos, sistemas de almacenamiento de energía, dispositivos electrónicos, electrodos; además que pueden ser modificados químicamente permitiendo ser funcionalizados con otras moléculas como polímeros, proteínas, entre otros (Rao et al., 2021; Sharma et al., 2024; Shin et al., 2024). Todo lo mencionado anteriormente obedece al hecho de que estos nanomateriales presentan muchas ventajas, comparados con los nanomateriales no-carbonáceos, en términos de su elevada estabilidad química, térmica y mecánica, buena conductividad eléctrica, baja toxicidad, y ambientalmente amigable; además de su bajo costo de producción y fácil disponibilidad en la naturaleza (Díez-Pascual, 2021).

Además, los nanomateriales de carbono han sido recientemente usado como material de partida para obtener un subgrupo de nanomateriales carbonáceos conocidos como puntos de carbono con propiedades aún más específicas y versátiles. Estos últimos son, quizás, la subclase de nanomateriales que han ganado un enorme interés entre los investigadores en la última década. A continuación, se abordan algunos aspectos sobre este tipo de nanomateriales.

1.2 Puntos de carbono

Los puntos de carbono (CDs) son una subclase de materiales carbonáceos con variaciones de tamaño de ~10 nm de dimensión cero (0D), descubierto a mediados de los 2000s (Mansuriya & Altintas, 2021b). Este tipo de materiales han captado una enorme atención tanto en la

investigación como en la industria debido a sus características significativas y sobresalientes, como conductividad eléctrica, propiedades fotoluminiscentes, propiedades de fotoblanqueo y parpadeo fotoinducido, resistencia a la fotodegradación, elevada actividad electro-catalítica, buena solubilidad en medios acuosos, excelente biocompatibilidad, estabilidad química a largo plazo, baja toxicidad y una gran relación de área superficial efectiva/volumen (Mansuriya & Altintas, 2021a; Ozyurt et al., 2023). Además, poseen una combinación inigualable de características eléctricas, mecánicas y ópticas para introducir sensores miniaturizados con atributos sobresalientes (Mansuriya & Altintas, 2021b).

Debido a sus propiedades fotoluminiscentes intrínsecas, que pueden ser moduladas, los CDs han demostrado una versatilidad como agentes de imagen, jugando un papel crucial en la visualización en tiempo real de ciertas células, tejidos, órganos o en combinación, lo que ayuda en el diagnóstico preciso de diversas formas de cáncer y varias enfermedades (Mansuriya & Altintas, 2021a; Ozyurt et al., 2023). Además, tienen la capacidad de entregar genes/fármacos de manera eficiente al servir como nanotransportadores, así como ser agentes terapéuticos altamente capaces para diversas fototerapias, como la terapia fotodinámica y la terapia fototérmica. Por lo tanto, todos estos atributos significativos de los CDs los convierten en bases sólidas en diversas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas (Mansuriya & Altintas, 2021a; Ozyurt et al., 2023).

Además, los CDs facilitan su modificación química incorporando grupos funcionales (*e.g.* amina, carboxilo, hidroxilo, etc.) haciéndolos convenientes para ser funcionalizados con polímeros, proteínas, ADN y otros nanomateriales; exhibiendo una excelente solubilidad en medios acuosos; así como también características de detección notables, como detectabilidad específica, selectiva y multiplex (Ozyurt et al., 2023). Los CDs están formados por núcleos de carbono, compuestos por dominios amorfos o cristalinos con predominancia de hibridación sp^2 o

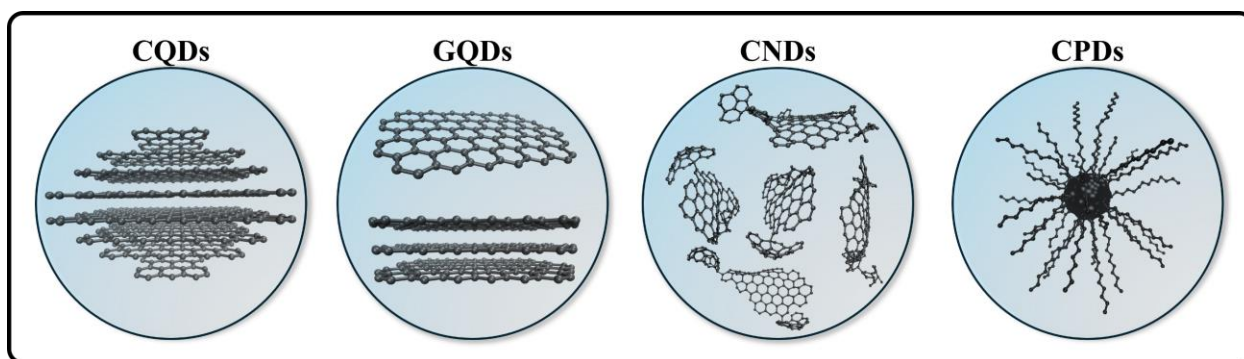
sp^3 , dependiendo de su grado de carbonización; permitiendo la aparición de CDs con diversas características estructurales que influyen sobre sus propiedades físicas, químicas, ópticas y electrónicas.

1.2.1 Clasificación de los CDs

De acuerdo con la literatura reciente, los CDs se clasifican con base en la estructura carbonácea central (core), la presencia de grupos funcionales y sus propiedades. En la Figura 2 se muestran los cuatro tipos de CDs con estructuras y morfologías propias; los cuales se agrupan en: *i*) puntos cuánticos de carbono (CQDs), *ii*) puntos cuánticos de grafeno (GQDs), *iii*) nanopuntos de carbono (CNDs), y *iv*) puntos de carbono poliméricos (CPDs) (Lagos et al., 2023; J. Liu et al., 2020; Y. Liu et al., 2021; Mansuriya & Altintas, 2021b; Ozyurt et al., 2023).

Figura 2

Clasificación de los puntos de carbono (CDs)



Los CQDs se caracterizan por ser nanoesferas cuasicristalinas con un alto grado de carbonización y tamaños de ~ 10 nm debido al apilamiento de varias capas de grafeno (cuatro o más) con un espacio interlaminar (002) de alrededor 0.34 nm y un núcleo carbonáceo rico en

carbonos con hibridación sp^2 . En contraste con los CQDs, los GQDs están formados por pocas láminas de grafeno (entre una a tres láminas) con un tamaño horizontal mucho mayor que su altura (~10 nm tamaño horizontal frente a ~2.5 nm de altura) exhibiendo un carácter anisotrópico como consecuencia de su estructura y dimensiones nanométricas bien definidas, ricas en carbono con hibridación sp^2 y algunos sp^3 debido a la incorporación de grupos funcionales sobre su superficie. El siguiente tipo de CDs son los CNDs que también presentan un grado de carbonización elevado; pero rica en carbonos con hibridación sp^3 y algunos fragmentos de láminas de grafeno unidos de forma desordenada, resultando en estructuras amorfas sin una estructura cristalina definida. Por último, se encuentran los CPDs que consisten en un núcleo rodeado por cadenas poliméricas de carbono, y un contenido significativo de oxígeno/nitrógeno, conectados con la superficie del núcleo. En relación con el núcleo carbonáceo de los CPDs, estos suelen ser quasiesférico con carbonos sp^2 y sp^3 que depende de su grado de carbonización dando lugar a núcleos de carbono similares a los CQDs o CNDs (Lagos et al., 2023; J. Liu et al., 2020; Y. Liu et al., 2021; Mansuriya & Altintas, 2021b; Ozyurt et al., 2023).

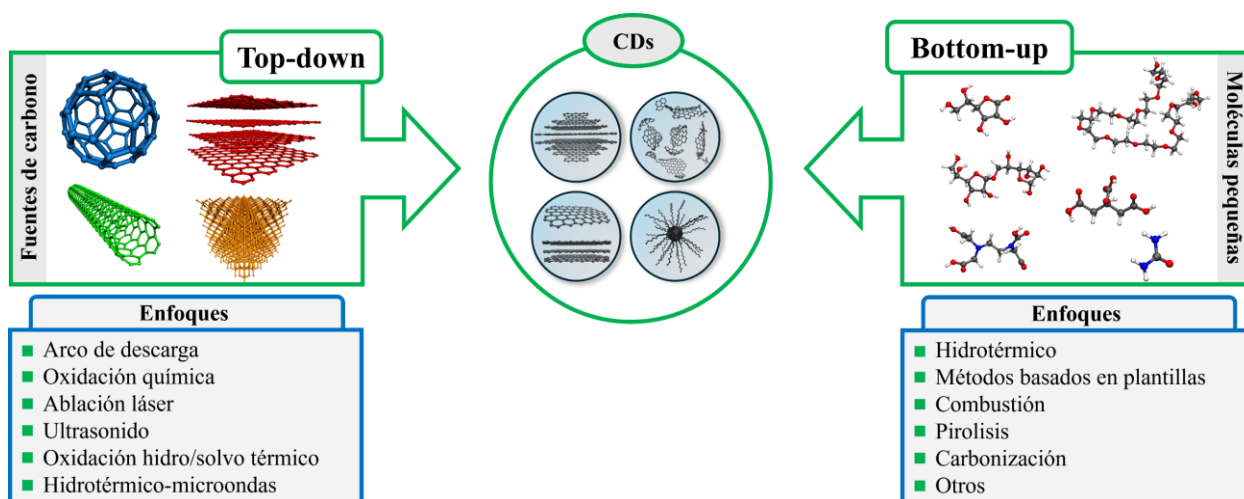
1.2.2 Métodos de síntesis de puntos de carbono

Como se mencionó anteriormente, los CDs han demostrado una enorme diversidad de aplicaciones prometedoras en diversos sectores, gracias a sus características estructurales, electrónicas, físicas y químicas y únicas. En este sentido, otro campo que se ha desarrollado extensamente, durante las últimas dos décadas, corresponde a los enfoques de síntesis de CDs que han permitido obtener CDs con características que pueden ser moduladas para aplicaciones específicas. Cada uno de los enfoques de síntesis de CDs se caracteriza por su naturaleza de síntesis, la cantidad y naturaleza química del precursor, los solventes usados, el tiempo de reacción,

los factores externos entre otros. Sin embargo, los enfoques de síntesis CDs se clasifican de forma global con base en las materias de partida; agrupados en dos tipos de metodologías. La primera conocida como síntesis de tipo top-down, en donde los CDs son formados por rompimiento de grandes estructuras de carbono como óxido de grafeno, grafito, nanotubos de carbono; y la segunda denominada síntesis tipo bottom-up en donde a partir de la reducción de precursores moleculares, por medios químicos o biológicos, se forman los CDs (ver Figura 3) (Etefa et al., 2024; Lagos et al., 2023).

Figura 3

Métodos de síntesis de CDs



1.2.2.1 Síntesis Top-Down. En general, los materiales de carbono a granel (*e.g.* grafito, fibras de carbono, nanotubos de carbono, hollín de vela, entre otros) son cortados en pequeñas piezas, y a la vez se modifica su superficie con grupos que contengan oxígeno. Este método requiere de un paso previo de preparación, en donde se oxida el grafito a óxido de grafito (OGF, por el método modificado de Hummers) para posteriormente realizar el corte del OGF en CDs por varios

enfoques de síntesis (ver Figura 3). Comúnmente el enfoque más usado es aquel en el que involucra la oxidación con ácidos concentrados (HNO_3 , o $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$), otras rutas de síntesis también destacadas son: métodos electroquímicos, arco de descarga, ablación láser, foto-Fenton y en particular los métodos de oxidación hidro/solvo-térmicos, en donde realizan el corte a través de los grupos funcionales presentes en el OGF usando altas temperaturas y presiones. Recientemente este tipo de síntesis ha sido acoplado con microondas, siendo su estudio de gran interés debido a que es una técnica simple, reduce los tiempos de reacción, aumenta las propiedades fluorescentes de los CDs como también permite la formación de CDs monodispersas y estructuras CDs bien definidas (Etefa et al., 2024; Lagos et al., 2023; Ozyurt et al., 2023).

1.2.2.2 Síntesis Bottom-up. El método más común se basa en la deshidratación de pequeñas moléculas (glucosa, carbohidratos y otros precursores de fuentes de carbono) y polímeros las cuales contienen grupos funcionales como $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{C}=\text{O}$ que pueden ser deshidratados a altas temperaturas para luego dar lugar al proceso de carbonización para la formación de CQDs, CNDs, GQDs o CPDs (Figura 3). Los enfoques que involucran este tipo de procesos son: hidrotérmicos, combustión, pirolisis en ácido concentrado, hidrotérmicos-microondas, entre otros. Sin embargo, este método no es adecuado para la producción en masa de CDs, bajos rendimientos durante la síntesis y dificultades durante las etapas de purificación (Etefa et al., 2024; Lagos et al., 2023; Ozyurt et al., 2023).

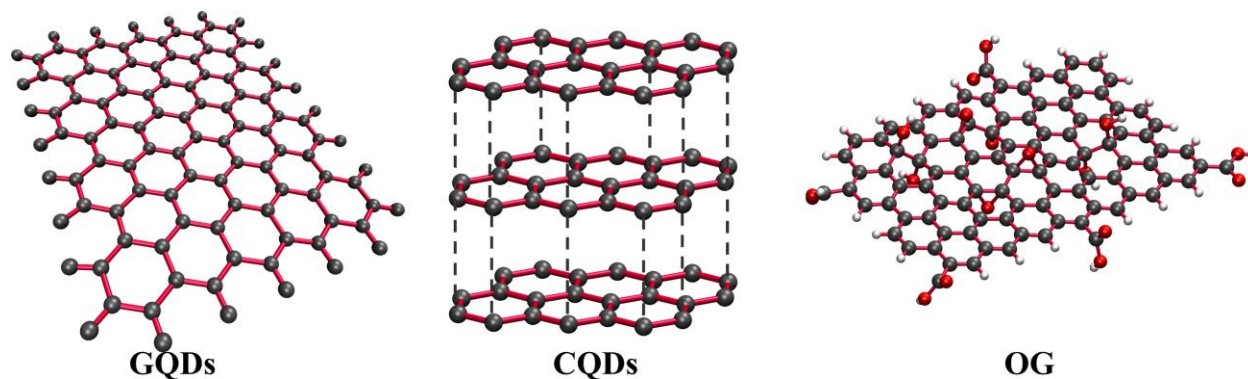
1.2.3 Óxido de grafeno

El óxido de grafeno (GO) es una clase especial de nanomateriales que ha demostrado su gran utilidad en aplicaciones como tratamiento de aguas contaminadas, medio ambiente, catálisis,

óptica, en tecnología de celdas fotovoltaicas y su uso promisorio como sensores en la detección de muchos contaminantes (Mushahary et al., 2024). Esta última es, quizás, la aplicación más estudiada para este tipo de nanomateriales. Desde el marco estructural y composición, los OG presentan algunas diferencias notorias frente a otros CDs. En la Figura 4 se muestran las estructuras simplificadas y representativas de GQDs, CQDs y OG. Mientras que GQDs y CQDs exhiben laminas predominantemente planas debido a la elevada presencia con carbonos con hibridación sp^2 , los OG presentan una distribución variada de carbonos sp^2 y sp^3 . Esto como consecuencia de la presencia de grupos oxigenados, principalmente $-C=O$, $-OH$; $-COOH$ y $-O-$ con una relación C:O variable (Trikkaliotis et al., 2021).

Figura 4

Estructuras simplificadas de CDs: QCDs (izquierda); CQDs (central); y GO (derecha)

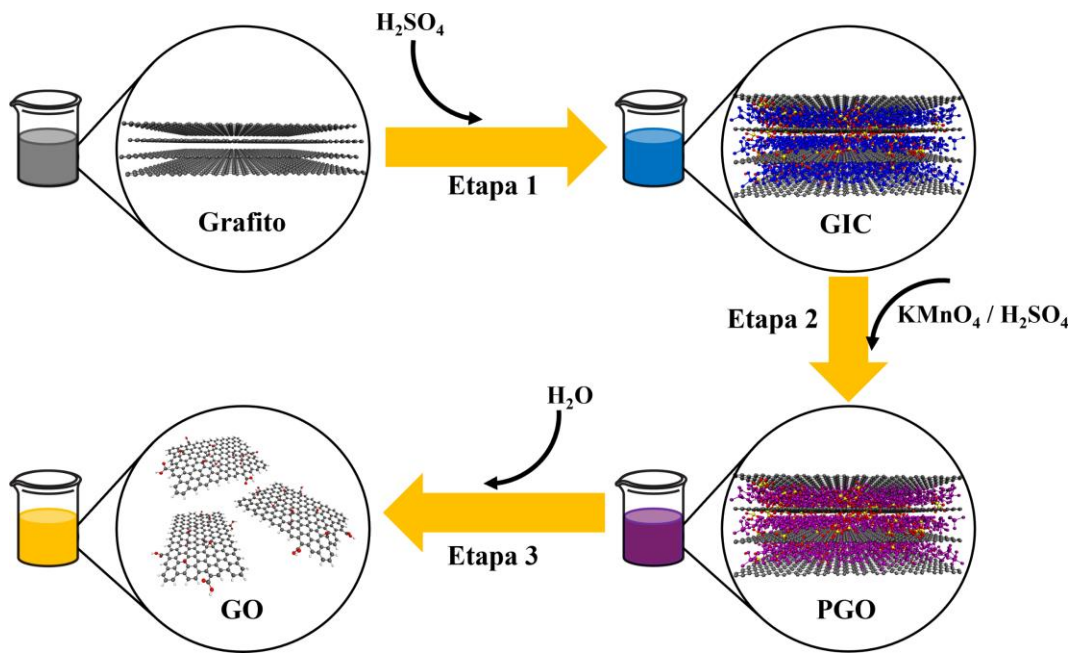


Otro aspecto que se diferencia los OG, frente a los GQDs y CQDs, es que su estructura no es plana y no es completamente especificada debido a los defectos superficiales causados por la inserción de los grupos oxigenados mencionados anteriormente (L. Sun, 2019). Aunque se han reportado numerosos modelos hipotéticos sobre su estructura, el más aceptado es el propuesto por Lorf-Klinowski en el cual, los OG presentan subunidades estructurales de anillos de carbono de

seis miembros con hibridación sp^2 conservando parcialmente su carácter planar; los grupos -OH y -O- se ubican sobre la superficie del OG promoviendo defectos de superficie (presencia de carbonos sp^3) e interacciones por puente de hidrógeno haciéndolos más soluble en agua; y los grupos -COOH, -C=OH se ubican sobre los bordes de la lámina carbonácea promoviendo interacciones iónicas laterales afectando su solubilidad en medio acuoso por efectos del pH del medio (L. Sun, 2019).

Figura 5

Esquema de la conversión de grafito en polvo en óxido de grafeno (OG) mediante el método de Hummer modificado



Desde el punto de vista de la síntesis, la metodología top-down es la predominante para la síntesis de OG, específicamente mediante métodos químicos de oxidación; entre los cuales, los más utilizados son los de Brodie, Staudenmaier o el método modificado de Hummer (Dimiev &

[Tour, 2014; Feicht et al., 2019](#)). Estos enfoques de síntesis usan grafito como material de partida, sometándolo a una reacción de oxidación con agentes oxidantes fuertes, para posteriormente obtener láminas de GO. De los métodos previamente mencionados, el método modificado de Hummer es el más utilizado, ya que requiere tiempos cortos de reacción y es eficiente y consiste en tres pasos (ver Figura 5). El primer paso es la conversión de grafito (en polvo) en un material intermedio denominado compuesto de intercalación de grafito (GIC) mediante la adición de ácido. En el segundo paso, el GIC se convierte en la forma oxidada de grafito (óxido de grafeno prístino: PGO) mediante la reacción con KMnO_4 como agente oxidante. Finalmente, el tercer paso es la exfoliación. En este punto, el PGO es lavado con agua tipo I y finalmente se obtienen el OG disperso en el medio ([Dimiev & Tour, 2014; Habte & Ayele, 2019](#)).

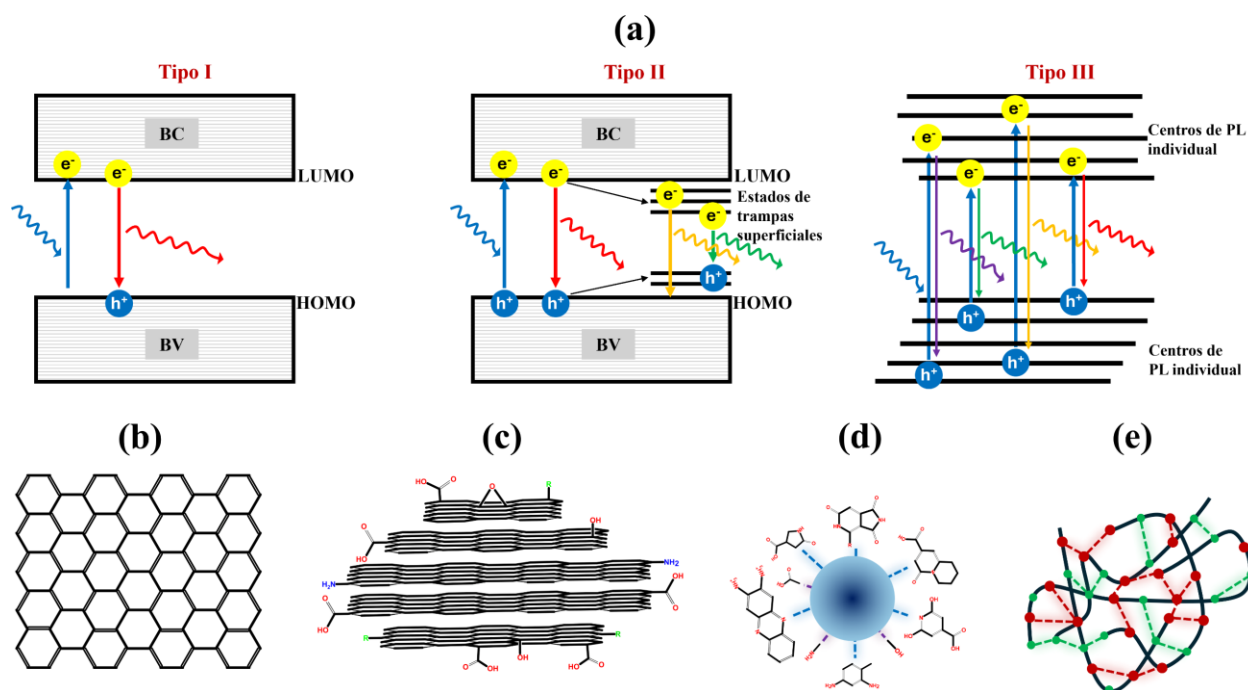
1.2.4 Propiedades fotoluminiscente de los CDs

En la actualidad, diversos sectores se han enfocado en el uso potencial de los CDs en aplicaciones como bioimagen, sensores, diodos, láseres, entre otros. Esto se debe a las propiedades fotoluminiscentes (PL) intrínsecas de los CDs, las cuales pueden ser ajustadas para abarcar desde la región visible hasta el infrarrojo cerca del espectro electromagnético ([Ozyurt et al., 2023](#)). En este sentido, un factor clave para el uso específico de los CDs ha sido comprender los mecanismos de emisión PL desde una perspectiva tanto cuántica como de su estructura y composición ([Cayuela et al., 2015; Ozyurt et al., 2023; Zhu et al., 2015](#)). Los mecanismos PL de los CDs pueden ser entendidos a partir de un diagrama de Jablonski; sin embargo, numerosos estudios han demostrado que esta propiedad puede ser mucho más compleja, siendo un debate vigente para explicar cómo los diversos factores (*e.g.* la naturaleza variable de su composición química, la estructura central carbonácea sp^2 , los defectos estructurales, los efectos superficiales y laterales por grupos

funcionales, la presencia de agentes de dopaje, y los métodos de síntesis) inciden sobre la emisión PL de los CDs (Ding et al., 2020). No obstante, numerosos estudios experimentales y teóricos han permitido ahondar sobre los orígenes de los diversos mecanismos PL y su manifestación en una gran variabilidad de materiales CDs. En este sentido, los mecanismos PL han sido descritos, a la fecha, ya bien sea desde una perspectiva de los niveles energéticos cuantizados o a través de la composición y estructura de los CDs. En la Figura 6 se presenta las dos perspectivas mencionadas anteriormente.

Figura 6

Esquemas de los diferentes mecanismos PL. (a) Diagramas de niveles energéticos tipo I, II y III; (b) esquema PL mediante confinamiento cuántico; (c) esquema PL mediante estados de superficies; (d) esquema PL mediante estado molecular; (e) esquema PL mediante emisión mejorada por entrecruzamiento



Desde la perspectiva energética, los mecanismos PL se clasifican en tres tipos de emisión, denominados Tipo I, II, o III. En el mecanismo tipo I (Figura 6a), los electrones confinados en la banda de valencia (BV) son promovidos a la banda de conducción (BC) mediante la absorción de fotones (transición HOMO – LUMO) con energía superior a la energía LUMO que posteriormente origina la recombinación radiativa o emisión denominada como fluorescencia (Cayuela et al., 2015). En el mecanismo Tipo II, una vez que los electrones son excitados y promovidos a la BC, pueden quedar atrapados y su posterior recombinación conduce a una emisión radiativa de menor energía debido a los efectos del núcleo carbonáceo rico en carbonos sp^2 y a la presencia de grupos funcionales, agentes dopantes o defectos sobre la superficie (estados de trampa superficiales) (Cayuela et al., 2015). Por último, el mecanismo Tipo III se caracteriza por la superposición de la respuesta de emisores individuales (*e.g.* fragmentos de moléculas fluoróforas) presentes dentro de la estructura de los CDs (Cayuela et al., 2015).

Desde la perspectiva estructural de los CDs, cuatro tipos de mecanismos PL han sido demostrados y reconocidos a medida que han aparecido los diferentes tipos de CDs. El primero conocido como confinamiento cuántico (QCE) que se manifiesta en CDs por dos factores: *i*) una estructura carbonácea formada únicamente por átomos de carbono sp^2 conjugados (conjugación π , ver Figura 6b) y un tamaño de partícula menor que el radio de Bohr del excitón (*e.g.* es el radio de una quasipartícula donde la separación entre el electrón y el hueco se vuelve discreta).

Además, el mecanismo QCE es descrito mediante un diagrama de energías Tipo I y su emisión también dependerá del tamaño de los CDs (Ding et al., 2020). El segundo tipo de mecanismo PL se conoce como estados de superficies (ver Figura 6c) y se manifiesta cuando hay defectos de superficie o presencia de grupos funcionales (*e.g.* grupos oxigenados, agentes dopantes) sobre la estructura carbonácea de los CDs creando estados de trampas superficiales que

es descrito a su vez mediante un diagrama de energías tipo II (Cayuela et al., 2015; Ding et al., 2020). El mecanismo de estado molecular aparece cuando dentro de la estructura de los CDs están presentes fragmentos de moléculas fluoróforas creando centros de PL individual (ver Figura 6d) y es descrito mediante un diagrama de energía Tipo III (Cayuela et al., 2015; Q. Zhang et al., 2021). Por último, está el mecanismo PL de emisión mejorada por entrecruzamiento (CEE) que se manifiesta en CDs que presentan interacciones covalentes y no-covalentes entre cadenas laterales de la estructura interna de los CDs (ver Figura 6e), aumentando la rigidez; disminuyendo del movimiento vibracional y rotacional, suprimiendo parcial o totalmente la conversión no-radiativa y mejorando la recombinación radiativa en estos materiales (Tao et al., 2020).

En resumen, la manifestación de los distintos mecanismos de fotoluminiscencia en los CDs está intrínsecamente ligada a su estructura y composición, lo que determina cómo estos mecanismos influyen en las propiedades fotoluminiscentes del material. Por lo tanto, la estructura de los CDs, ya sea a nivel de confinamiento cuántico, estados de superficie, estado molecular, o emisión mejorada por entrecruzamiento, juega un papel crucial en la modulación de las propiedades fotoluminiscentes inherentes, como el rendimiento cuántico, el ancho de banda de emisión y la estabilidad luminosa.

En la Tabla 1 se presenta un resumen donde se relacionan los mecanismos PL, su efecto sobre las propiedades fotoluminiscentes inherentes, y cómo estos mecanismos se manifiestan en los distintos tipos de CDs, proporcionando una visión integral de la incidencia estructural sobre el comportamiento lumínico de estos materiales.

Por lo tanto, comprender y controlar la estructura de los CDs es fundamental para optimizar sus características PL y mejorar su rendimiento en aplicaciones tecnológicas.

Tabla 1

Relación entre los mecanismos PL, propiedades PL con los diferentes tipos de CDs

Tipo de CDs	Mecanismo PL predominante	Ancho de banda de emisión PL	Tiempo de vida media de la emisión PL	Nivel de rendimiento cuántico (QY)
CQDs	Confinamiento cuántico.	Estrecho, típicamente entre 20-40 nm.	Corto, típicamente entre 1-10 ns.	Moderado a alto, dependiendo del tamaño, pureza y defectos de estructura.
GQDs	Confinamiento cuántico. Estados de superficie.	Moderado a amplio, típicamente entre 30-80 nm.	Moderado, típicamente entre 10-100 ns.	Bajo a moderado, variable según la presencia de grupos funcionales y defectos de superficie.
CNDs	Estados de superficie.	Amplio, típicamente entre 50-100 nm.	Moderado, típicamente entre 10-100 ns.	Bajo a moderado, depende principalmente de los defectos de superficie y grupos funcionales.
CPDs	Estado molecular. Emisión mejorada por entrecruzamiento.	Moderado, típicamente entre 30-60 nm.	Largo, típicamente entre 100 ns a varios microsegundos.	Alto, especialmente en polímeros bien diseñados, rigidez.

1.3 Peroxidasa de rábano picante (HRP)

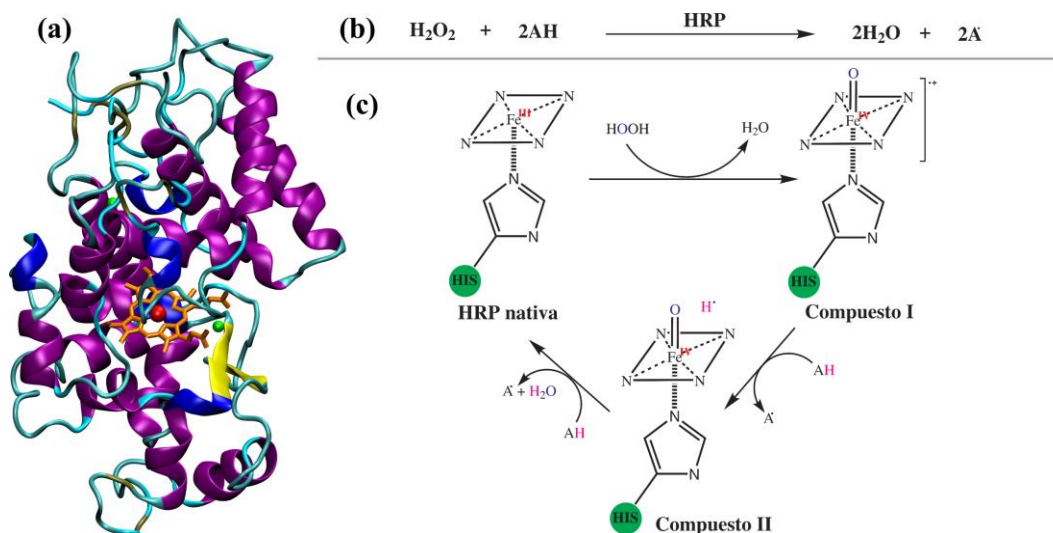
Las peroxidasas de rábano picante (HRP, EC 1.11.1.7) son oxidorreductasas que se encuentran presentes en el reino vegetal, en los tejidos de animales y en microorganismos. Entre estas, la enzima aislada de la raíz de la planta perenne Rábano Picante (*Armoracia rusticana*) es la más usada (Freitas et al., 2024). Esta enzima contiene grupos hemo y utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo fenoles aromáticos, ácidos fenólicos, indoles, aminas y sulfonatos. Esto le confiere aplicaciones importantes en la detección y tratamiento de residuos en aguas industriales (Bej et al., 2022; Mohammadi et al., 2022).

La isoenzima c HRP es la más abundante, está compuesta por un solo polipéptido de 308 aminoácidos residuales. Los *N*-residuos terminales están bloqueados por piroglutamato y el carbono terminal es heterogéneo, con algunas moléculas que carecen del residuo terminal Ser308. Posee 4 disulfuros entre los residuos de cisteína Cis11:Cis91, Cis44:Cis49, Cis97:Cis301 y

Cis177:Cis209, y un puente salino incrustado entre Asp99 y Arg12. En la secuencia primaria se reconocen 9 potenciales sitios de *N*-glicosilaciones y de estos 8 son ocupados. Contiene dos tipos de centros metálicos: un grupo hemo (compuesto de hierro (III) y protoporfirina IX), y dos átomos de calcio; los cuales son esenciales para la integridad estructural y funcional de la enzima (Veitch, 2004).

Figura 7

Estructura tridimensional de la enzima HRP (a); reacción general de la enzima HRP (b); esquema de formación de intermedios durante de la reactividad de la HRP (c)



En la Figura 7a se presenta la estructura tridimensional de la HRP C, en donde el grupo hemo (color naranja) está localizado entre los dominios distal y proximal, cada dominio contiene un átomo de calcio (esferas verdes); las hélices α y láminas β de la enzima se representan de color morado y amarillo, respectivamente. Muchas de las reacciones catalizadas por la enzima HRP pueden ser descritas de forma general como la reacción ilustrada en la Figura 7b. Si bien no conoce

completamente el mecanismo de reacción de la enzima HRP frente a sustratos donadores de electrones, hasta la fecha es aceptado que ocurre a través de un proceso cíclico de tres pasos que involucra la formación de dos intermedios denominados Compuesto I y Compuesto II como se muestra en la Figura 7c (Azevedo et al., 2003).

1.4 Funcionalización de CDs con HRP

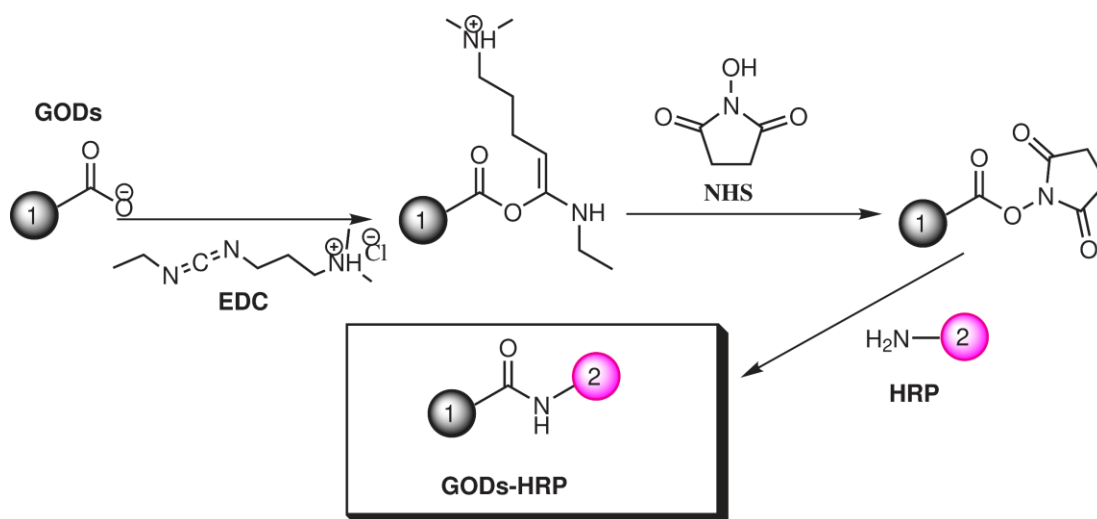
De acuerdo con el método de síntesis de CDs, en particular los métodos top-down, dan lugar a la formación de CDs cuya superficie están presentes grupos funcionales como ácidos carboxílicos, epóxidos, hidroxilos los cuales imparten solubilidad en sistemas acuosos y ofrecen la posibilidad de ser utilizados para la funcionalización con diversos compuestos de interés (como alcoholes, tioles, líquidos iónicos, biomoléculas) para diferentes aplicaciones (Ajala et al., 2022; Anegebe et al., 2024). Este tipo de procedimiento induce cambios en la fotoluminiscencia de los CDs, aumenta el rendimiento cuántico de fluorescencia (QY, por su nombre en inglés) y mejora la estabilidad química de estos sistemas nanoestructurados. En especial, la funcionalización se ha estudiado con moléculas que contengan en su estructura grupos amino los cuales permitan la formación de enlaces tipo amida con los CDs (Yu et al., 2020). Muthurasu y Ganesh, demostraron que la funcionalización con la enzima HRP puede aumentar la intensidad de fluorescencia de los GQDs, mediante la incorporación de grupos funcionales $-NH_2$ y $-OH$ sobre la superficie de estos nanomateriales; los cuales suprimen los defectos de estado emisión (trampas de energía de estado superficial) inducidos por los grupos epoxi y carboxilos presentes en los GQDs sin funcionalizar (Muthurasu & Ganesh, 2014).

Los CDs a menudo tiene grupos carboxilatos presentes en su estructura, por tanto, para la funcionalización con la HRP es necesario activar estos grupos funcionales ya que por sí solos son

poco reactivos en condiciones fisiológicas. Por lo anterior, se utiliza agentes de entrecruzamiento que faciliten la formación del enlace covalente específico entre los CDs y el grupo amino de un residuo aminoacídico, lisina, de la enzima. Los agentes de entrecruzamientos usados comúnmente y reportados en la literatura son el EDC (Hidrocioruro de N-(3-Dimetil aminopropil)-N'-etilcarboimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) (Biosciences, n.d.; Scientific, 2018; Thermoscientific, n.d.). La reacción que se presenta se observa en la Figura 8.

Figura 8

Esquema general de la ruta de síntesis de la funcionalización entre CDs y la HRP



1.5 Dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es un método de simulación que consiste en resolver las ecuaciones clásicas de movimiento de muchas partículas de sistemas atómicos/moleculares. Es decir, permite realizar una exploración configuracional de los estados microscópicos siguiendo la evolución temporal y natural de un sistema clásico de muchos cuerpos a lo largo del espacio fase a partir de las expresiones de Newton y cuyos valores son afectados por un conjunto de fuerzas a

las que son sometidas todas las partículas del sistema de estudio (Kapral & Ciccotti, 2005). Es decir, las simulaciones MD se basa en calcular dos propiedades centrales. La primera que corresponde a las posiciones de las partículas en un sistema de coordenadas en función del tiempo, siguiendo las leyes de Newton y se representa de forma general a través de la siguiente ecuación de propagación:

$$\mathbf{x}_i(t + \delta t) = \mathbf{x}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)\delta t + \frac{1}{2}\mathbf{a}_i(t)\delta t^2 \quad (1)$$

Donde la posición de cada partícula, \mathbf{x}_i , es calculada en función del tiempo de muestreo ($t + \delta t$, que suele ser del orden de los femtosegundos). El primer término de la derecha corresponde a la posición de cada partícula ya bien sea inicial o en el tiempo de simulación t . El segundo término de la derecha indica la velocidad de cada partícula y el tercer término de la ecuación es la aceleración que adquiere cada partícula en el tiempo t . La segunda propiedad central es la fuerza total que actúa sobre cada partícula. Este parámetro es necesario para poder calcular la aceleración que hace parte de la ecuación de posición descrita anteriormente y se calcula mediante la expresión general:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla_i V \quad (2)$$

Donde $\nabla_i V$ es la derivada de la energía potencial con respecto al cambio de la posición de las partículas. Es decir, la fuerza es función de las coordenadas de las partículas; mientras que la posición es función del tiempo. Una vez conocida la fuerza total que actúa sobre cada partícula, se calcula su aceleración, \mathbf{a}_i en cada tiempo de muestreo mediante la expresión:

$$\mathbf{a}_i(t) = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} \quad (3)$$

Donde m_i es la masa de cada partícula. Estos cálculos se realizan de forma iterativa alcanzando tiempos de simulaciones que pueden ser del orden de microsegundos con un paso de tiempo, δt , del orden del femtosegundo. Sin embargo, las simulaciones MD se enfrenta a una limitante superior y se debe al hecho de que al tener un sistema con $3N$ grados de libertad (siendo N el número de partículas) no se conoce analíticamente la función de energía potencial, V , y no se pueden obtener sus soluciones analíticas de las posiciones nucleares. Por lo tanto, se recurre a aproximaciones tanto para las ecuaciones de movimiento como para la función de potencial V . En este sentido, existen dos campos ampliamente desarrollados (Schneider et al., 2008). Adicionalmente, los métodos y programas de simulación MD se han integrado con otras herramientas convirtiéndose en una instrumento que cumple un rol crucial en diversos campos de investigación relacionados con sistemas atómico/molecular (Tang et al., 2024; Vidal-Limon et al., 2022).

1.6 Campos de fuerza

Los campos de fuerza (FF) son un conjunto de funciones de energía potencial que describen las posibles interacciones entre partículas en un sistema atómico/molecular y son agrupadas en la siguiente ecuación:

$$V_{Total} = V_b + V_{nb} \quad (4)$$

Donde V_{Total} es la energía potencial total que es sometida una partícula, y V_b , V_{nb} son las energías potenciales enlazantes y no-enlazantes y dependerá de la naturaleza química y la posición que se encuentre cada una de ellas. Una primera expresión general y ampliada de la energía potencial en los campos de fuerza es la siguiente:

$$V_{Total} = V_{enlace} + V_{\acute{a}ngulo} + V_{torsión} + V_{LJ} + V_{Coul.} \quad (5)$$

Donde los primeros tres términos de la derecha de la ecuación corresponden a potenciales enlazantes; siendo V_{enlace} el potencial de enlace entre dos partículas, $V_{\acute{a}ngulo}$ el potencial de ángulo de valencia entre tres partículas enlazadas y $V_{torsión}$ el potencial de torsión entre cuatro partículas enlazadas de forma consecutiva. Los dos últimos términos de la ecuación de potencial total corresponden a potenciales no-enlazantes; siendo V_{LJ} el potencial de Lennard-Jones entre un par de partículas no enlazadas y $V_{Coul.}$ es el potencial de Coulomb entre dos partículas debido al carácter eléctrico (cargas atómicas) que siguen la ley de Coulomb.

En la actualidad se conocen una gran variedad de campos de fuerza; siendo AMBER (Cornell et al., 1995), CHARMM (MacKerell et al., 1998), OPLS (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988) y los campos de fuerza generalizados (GAFF) (Vanommeslaeghe et al., 2010; J. Wang et al., 2004) los más populares. Cada uno de estos campos de fuerza presentan similitudes y diferencias que los caracterizan; ya bien sea en términos de las funciones matemáticas usadas para simular cada una de las interacciones o los métodos usados para ajustar sus correspondientes parámetros de campos de fuerza. Todos los campos de fuerza se reducen finalmente a calcular y tabular todos los parámetros de campos de fuerza posibles que cubran todos los ambientes químicos en los que se puedan encontrar un conjunto de átomos en sistemas atómicos/moleculares. Esto se conoce como base de datos de campos de fuerza. Por lo tanto, el principal desafío de los campos de fuerza es cubrir todo el espacio configuracional químico que permitan obtener resultados los más cercano a la realidad macroscópica y microscópica del sistema en estudio.

Una vez alcanzado este estado, lo sucesivo es extraer los parámetros de campos de fuerza que serán usado durante las simulaciones moleculares de interés. También conocido como etapa de construcción de la topología de campo de fuerza y se pueden usar en conjunto con simulaciones DM permitiendo obtener información a nivel microscopio tales como propiedades estructural, energética y de transporte ([J. Zhang et al., 2023](#)).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Sintetizar y evaluar, por dinámica molecular, nanoestructuras de carbono funcionalizadas con peroxidasa de rábano picante.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar nanoestructuras de carbono funcionalizadas con peroxidasa de rábano picante.
- ✓ Evaluar, mediante cálculos computacionales de dinámica molecular, la estabilidad de las nanoestructuras de carbono funcionalizadas con peroxidasa de rábano picante.

3. Materiales y métodos

3.1 Reactivos

Grafito en polvo (menor a 40 μm , grado II espectroscópico, de Merck), ácido fórmico (HCOOH , de Merck), permanganato de potasio (KMNO_4 , de Merck), ácido fosfórico (H_3PO_4 , de J.T Baker), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , de J.T Baker), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , de Sigma Aldrich), hidróxido de sodio (NaOH , Sigma Aldrich), peroxidasa de rábano picante (HRP, de Sigma Aldrich), EDC (Hidrocloruro de N-(3-Dimetil aminopropil)-N'-etilcarboimida, de Sigma Aldrich), NHS (N-hidroxisuccinimida, de Sigma Aldrich). Fosfato dipotásico (K_2HPO_4 , de Sigma Aldrich), Fosfato monopotásico (KH_2PO_4 , de Sigma Aldrich), Guayacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$, Sigma Aldrich). El agua ultrapura (resistividad de 18.2 $\text{M}\Omega$) utilizada para todos los experimentos fue producida en un sistema MilliQ, del grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología del parque tecnológico de Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander.

3.2 Síntesis y funcionalización de Puntos de Óxido de Grafeno

La metodología empleada en este trabajo de investigación contempló la obtención de CDs de tipo Puntos de Óxido de Grafeno (GODs, por sus siglas en inglés) mediante una metodología de síntesis Top Down, utilizando un proceso de síntesis hidrotérmica asistida por microondas. Posteriormente, se llevó a cabo la funcionalización de los GODs con la HRP, integrando técnicas de acoplamiento químico para garantizar la funcionalidad y estabilidad del sistema.

3.1.1 Síntesis de óxido de grafeno (OG)

Para la preparación del óxido de grafeno (OG) se utilizó la técnica implementada en el Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular (LEAM) de la Universidad Industrial de

Santander (Gomez, 2012). La cual se fundamenta en una adaptación del método de Hummers, el cual emplea la oxidación química de polvo de grafito como paso inicial para obtener OG. Inicialmente se realizó la exfoliación del grafito empleando HCOOH y H₃PO₄ en ultrasonido, luego se procedió a oxidar el grafito en una dispersión acuosa usando H₃PO₄, H₂SO₄ y KMNO₄ y finalmente se llevó a cabo la hidrólisis, dispersión y purificación del OG obtenido usando H₂O₂ y agua.

3.1.2 Síntesis de GODs

Se utilizó óxido de grafeno (OG) como precursor y la técnica reportada por Pan y colaboradores (Pan et al., 2010), utilizando diferentes tiempos de reacción y cantidades de precursor. Una cantidad específica de OG se redispersó en agua tipo 1, ajustando el pH a 8 con NaOH. La suspensión se transfirió a un reactor Vessel, revestido de poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) o teflón, de 50 mL, y se calentó mediante radiación de microondas, las especificaciones se encuentran en la tabla 2. Durante este proceso, ocurrieron reacciones de desoxidación y reducción tanto en el espaciamiento entre las capas de grafeno como en el tamaño de las mismas. Una vez que el reactor se enfrió a temperatura ambiente, se extrajo el sobrenadante utilizando una membrana con un tamaño de poro de 0.10 μm.

Por último, la purificación de los GODs se llevó a cabo a través de una serie de pasos: el primer paso consistió en filtrar la solución con filtros de membrana de 0.10 μm, el segundo paso consistió en adicionar los GODs en bolsas de diálisis de membrana de celulosa (MWCO:100-500 Da) durante 6 horas con agua tipo I, y un último paso que consistió en la ultracentrifugación a 17000 rpm para eliminar el exceso de sustancias que quedaron sin reaccionar. Se evaluó la fluorescencia de las nanoestructuras en las fases líquidas. Como criterio de selección se tuvo en

cuenta los espectros obtenidos por espectroscopia de fluorescencia, en los que se observara una mayor intensidad en los espectros de emisión y se evaluó el rendimiento cuántico usando el método de comparación relativa (Brouwer, 2011). Se usó Cumarina 120 como sustancia de referencia, bajo condiciones experimentales similares. La ecuación que se empleó para calcular el rendimiento cuántico relativo es la siguiente:

$$\Phi_{f,x} = \Phi_{f,s} \frac{F_x}{F_{st}} \cdot \frac{f_{st}}{f_x} \cdot \frac{n_x^2(\lambda_{exc})}{n_{st}^2(\lambda_{exc})} \quad (6)$$

En dónde $\Phi_{f,x}$: rendimiento cuántico de la muestra (GODs), $\Phi_{f,s}$: 0.73. Rendimiento cuántico conocido del estándar de referencia cumarina 120, F: es el área bajo la curva de los espectros de emisión corregidos para muestra (x) y estándar (st), f: es el factor de absorción, n_x : 1.3345 (índice de refracción de los GODs), n_{st} : 1.331 (índice de refracción de la cumarina 120). La caracterización de los GODs se llevó a cabo mediante diversas técnicas espectroscópicas, incluyendo FTIR-ATR, UV-Vis, Raman y espectroscopía de fluorescencia.

Tabla 2

Parámetros de adquisición para la síntesis hidrotérmica asistida por microondas de GODs

Característica	Descripción/valor
Digestor microondas	Multiwave GO, Anton Para
Rotor	12HVT50
Modo Vessel	Multi Vessel
Modo	Digestión
Modo control de temperatura	Máximo
Temperatura máxima	200 °C
Rampa	10 min
Temperatura	190 °C
Mantener	20 min
Potencia máxima	100%

3.1.3 Citotoxicidad de GODs

La citotoxicidad de los CNDs fue evaluada con la colaboración del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander, utilizando el método colorimétrico de azul de tiazolilo (MTT) en cultivos primarios de células normales, específicamente células Vero descrito por Mosmann ([Mosmann, 1983](#)).

Mediante este método las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (amarilla) formando cristales de formazan (violeta) solubles en DMSO que pueden ser cuantificados a 570 nm.

Las células Vero se cultivaron en placas de 96 pozos (1×10^4 células/pozo) y se incubaron a 37 °C con atmósfera de CO₂ (5%) durante 24 horas para total adherencia. Posteriormente las células se trataron con diferentes concentraciones (5, 25, 50 y 100 μM) de las GODs preparados en medio de cultivo y 0.1% de DMSO. Como control positivo se realizó tratamiento con la droga oxaliplatino (1, 5, 25, 50 y 100 μM) y como control negativo las células sin tratamiento alguno. Pasado el tiempo del tratamiento (12, 24 o 48 horas) se descartó el sobrenadante de los pozos, se adicionaron 200 μL de MTT (500 μg/mL en solución salina de Hanks, HBSS) y se incubaron las células durante 3 horas. A continuación, se retiró la solución de MTT y se agregaron 200 μL de DMSO a cada pozo para solubilizar los cristales formados. La absorbancia del formazan se midió a 570 nm en un lector de microplacas MultiSkan Go-Thermo para determinar la viabilidad celular.

3.1.3 Funcionalización de GODs

Para acoplar la HRP a los GODs, se empleó el protocolo de funcionalización propuesto por Muthurasu y colaboradores., y Li y colaboradores., con modificaciones en las condiciones experimentales, como la variación en la concentración de HRP y el volumen de los reactivos, para

ajustarse a los requerimientos específicos de esta investigación (Muthurasu & Ganesh, 2014)(N. Li et al., 2016) . En este caso, la funcionalización se realizó mezclando 1 mg/ml de las GODs en buffer PBS pH 7.0, EDC (10 mg/ml) y NHS (10 mg/ml). La solución resultante se agitó durante dos horas empleando un agitador orbital digital Thermo Scientific MaxQ 4450. Se disolvieron 5 mg de HRP en 0.5 mL de buffer de fosfato (PBS), para posteriormente añadirla a la mezcla inicial. La muestra se llevó a agitación constante a 300 rpm durante 18 h en el agitador orbital. Lo anterior con el fin de enlazar la HRP sobre los GODs mediante la formación de un enlace peptídico y alguno de los residuos aminoacídicos presentes en la HRP que contengan una cadena lateral con un grupo amino terminal libre. Una vez finalizada la síntesis se procedió a la purificación de la muestra por ultracentrifugación a 14000 rpm en filtro de Amicon de 30 kDa a 9°C con 4 lavados sucesivos usando PBS. El sobrenadante fue inmediatamente suspendido en 400 µL de PBS. El éxito de la conjugación de los GODs se evaluó mediante espectroscopia de fluorescencia, observando los cambios en las longitudes de onda de excitación-emisión y en la intensidad de fluorescencia antes y después de la aplicación del protocolo de conjugación con EDC y NHS.

Estudio de las condiciones de funcionalización de GODs (GODs -HRP)

Para el análisis de las condiciones de estabilización, se tendrá en cuenta las variables:

- ✓ Relación volumen: Se prepararon soluciones de la enzima en un rango determinado para la posterior adición de los GODs. Se estableció la mínima concentración necesaria para lograr la interacción, así como la proporción volumétrica adecuada HRP a GODs.
- ✓ Efecto del pH: Se prepararon soluciones de la HRP a una concentración adecuada, posteriormente se realizó el ajuste de pH a pH fisiológico para su subsiguiente conjugación a las GODs.

3.1.4 Ensayos de la Actividad Enzimática

La actividad peroxidasa de la HRP libre y GODs-HRP fue medida en un espectrómetro UV-Vis modelo UV-2401PC Shimadzu con lámpara de deuterio y Fotomultiplicador R-928. Se añadieron 10 μl de la enzima a una solución PBS (30 mM, pH 7.0) que contenía guayacol y H_2O_2 (3.60 mM) como sustratos. La velocidad de formación del producto de la reacción (tetraguayacol) fue monitoreado espectrofotométricamente a 470 nm con un coeficiente de extinción molar del producto de $5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Inicialmente se cuantificó la actividad de la enzima HRP y luego se determinó el efecto que tiene la funcionalización de la enzima sobre su actividad enzimática.

La actividad de la peroxidasa se determinó por métodos espectrofotométricos, en los que se emplean diferentes combinaciones de tampones y sustratos. El sustrato primario utilizado fue el peróxido de hidrógeno, mientras que el sustrato secundario fue el guayacol (2-metoxifenol). Este último fue oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol, que desarrolló una coloración parda (rojo ladrillo). La absorbancia de dicha coloración se midió a 470 nm ([Gutiérrez, 2011](#)).

La actividad catalítica de la peroxidasa se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades de reacción; se utilizó como sustrato guayacol y se determinó la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol, a 470 nm, con un coeficiente de extinción molar del producto de $5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El medio de reacción que se utilizó 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 μL de H_2O_2 al 30 % (p/v). Para el ensayo se adicionaron 10 μL de HPR a 2.5 mL de medio de reacción y 5 μL de guayacol. Posteriormente se siguió la formación del producto mediante el aumento de absorbancia en un espectrofotómetro UV/visible de doble haz UV-1800 Shimadzu44.

3.1.4 Caracterización de GODs y GODs-HRP

3.1.4.1 Espectroscopia Ultravioleta - visible: se llevó a cabo en una celda de cuarzo Starna en un espectrómetro UV-Vis marca SHIMADZU modelo UV-2401PC, con lámpara de deuterio y un fotomultiplicador R-928. Se operó en un rango entre 200-800 nm. Los espectros de los GODs, HRP y GODs-HRP permitieron conocer la longitud de onda de máxima absorción que fue utilizada como la longitud de onda de excitación y de esta manera se determinó el espectro de emisión, para cada sistema, en espectroscopia de fluorescencia.

3.1.4.2 Dispersión de la luz en modo dinámico (DLS): El tamaño hidrodinámico de las nanoestructuras y del sistema funcionalizado se midió utilizando una cubeta cuadrada de poliestireno (Ref: DTS0012, de Malvern Instruments) en un equipo Zetasizer Nano Series ZS90, también de Malvern Instruments, equipado con un láser Nd_YAG de 635 nm con un ángulo de 90°. Se depositaron 100 μL de las muestras preparadas sobre la cubeta de polipropileno con capacidad de 1.0 mL, se recolectó la dispersión a 90°.

3.1.4.3 Espectroscopia de Fluorescencia: Para la determinación del espectro de emisión de los GODs y del sistema funcionalizado GODs-HRP. Se empleó un espectrofluorímetro marca Photon Technology International (PTI) modelo QM-40, con lámpara de xenón y detector fotomultiplicador 814, disponible en el laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular de la Universidad Industrial de Santander. La muestra se adicionó a una celda de cuarzo Starna con paso óptico de 10 mm y volumen nominal de 400 μL . Los espectros fueron obtenidos con un tiempo de integración de 1.0 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ y ganancia de 4.73. Se recolectaron espectros de emisión usando

diferentes longitudes de onda de excitación en un rango de 300-600 nm, a partir de los cuales se logró determinar la longitud de onda de máxima emisión. Mediante esta técnica, además de evaluar la fluorescencia de las GODs, se determinó si la HRP en el sistema funcionalizado conservaba las propiedades fluorescentes de los GODs. Esta evaluación resultó fundamental para analizar la interacción entre ambos componentes.

3.1.4.4 Espectroscopia Raman: Para la obtención de los espectros Raman de GODs y GODs-HRP se empleó un espectrómetro LabRam HR Evolution de la marca Horiba Scientific. El detector es de tipo CCD (de sus siglas Charge Couple Device, dispositivo de carga acoplada) con detección de longitudes de onda del UV-Vis y el infrarrojo cercano. Esto se realizó con el objetivo de obtener la banda G, asociada a las vibraciones en el plano del Carbono sp^2 ; y la banda D relacionada con la presencia de defectos sp^3 . Las intensidades (I_D/I_G) de estas bandas características se utilizaron para correlacionar las propiedades estructurales los GODs (Baker & Baker, 2010). Los parámetros de adquisición se resumen a continuación:

Tabla 3

Parámetros de adquisición para la toma de los espectros Raman

Característica	Descripción/valor
Espectrofotómetro	LabRAM HR Evolution, Horiba
Fuente	Láser de 532 nm
Potencia sobre la muestra	8 mW
Objetivo	100-X
Rango de adquisición	50-2000 cm^{-1}
Tiempo de integración	10 s
Rejilla	600 planos/mm
Programa	Labspec Horiba

3.1.4.5 Espectroscopia Infrarroja-ATR: permitió la identificación de las frecuencias de vibración de los grupos funcionales presentes sobre la superficie de los GODs y GODs-HRP. Los espectros infrarrojos se recolectaron en el rango de 400-4000 cm^{-1} y se obtuvieron utilizando un equipo FTIR-ATR Thermo Scientific iS50 en el Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular. Los parámetros de adquisición se resumen en la tabla 4.

Tabla 4

Parámetros de adquisición para el registro de los espectros de FTIR

Característica	Descripción/valor
Espectrofotómetro	iS50 FT-IR Nicolet™, Thermo Scientific
Rango de adquisición	400-4000 cm^{-1}
Número de barridos	128
Resolución	4 cm^{-1}
Velocidad óptica	0.47 cm/s
Modo	Reflectancia total atenuada (ATR)
Software	OMNIC

3.1.4.6 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS): Utilizando XPS se identificaron las especies de C, N, O y enlace amida presentes en GODs y GOD-HRP. Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa CasaXPS utilizando la biblioteca SPECS Prodigy-Acenteno provista con valores R.S.F (Response Sensitivity Factor). Determinados por el fabricante. Se empleó una línea base tipo Shirley para el modelamiento matemático de los componentes de los espectros y la calibración del espectro se realizó con energía de enlace al carbono adventicio (284.8 e.V). Las muestras fueron depositadas sobre un portamuestras metálico de acero inoxidable provistos por el fabricante SPECS. Estos portamuestras fueron conectados eléctricamente al espectrómetro.

Tabla 5*Parámetros de adquisición para la toma de los espectros de XPS*

Característica	Descripción/valor
Equipo	XPS/ISS/UPSA, SPECS
Fuente	Rayos X Al K α , FOCUS 500
Potencia de la fuente	100 W
Analizador	Phoibos 150 2D-DLD
Presión en la cámara de análisis	$\approx 1 * 10^{-9} Pa$
Energía del paso del analizador	100 eV para espectros generales 60 eV para espectros de alta resolución
Compensación de carga	Flood Gun, FG 15/40-PS FG 500, 70 μA , 4.0 eV. 80 μA (para GODs)

3.1.4.6 Difracción de rayos X (DRX): mediante esta técnica se determinó la distancia interlaminar entre las capas de grafeno, que es clave para determinar el grado de oxidación y exfoliación. Adicionalmente, para los GODs y GODs-HRP permitió evaluar cómo se organizan los átomos de carbono en estas nanoestructuras y si hay algún grado de desorden estructural. Las muestras fueron montadas en un portamuestras de polimetilmetacrilato (PMMA) con centro de silicio “Low Background” mediante la técnica “ZeroBackground”.

Tabla 6*Parámetros de adquisición para la toma de los difractogramas*

Característica	Descripción/valor
Difractómetro	D8 Advance, bruker
Radiación	CuK α I
Corriente	40 mA
Voltaje	40 kV
Rango de medición	3.5°-70.0° (2 θ) GODs: 4°-70.0° (2 θ) GODs-HRP: 4°-70.0° (2 θ)
Rendijas de Soller primaria y secundaria	2.5°

Rendija de divergencia	0.6 mm
Filtro	Níquel
Detector	Lineal LynxEye
Tiempo de muestreo	GODs: 1.8 s
	OG: 0.6 s
	GODs-HRP: 3 s

3.2 Simulaciones computacionales

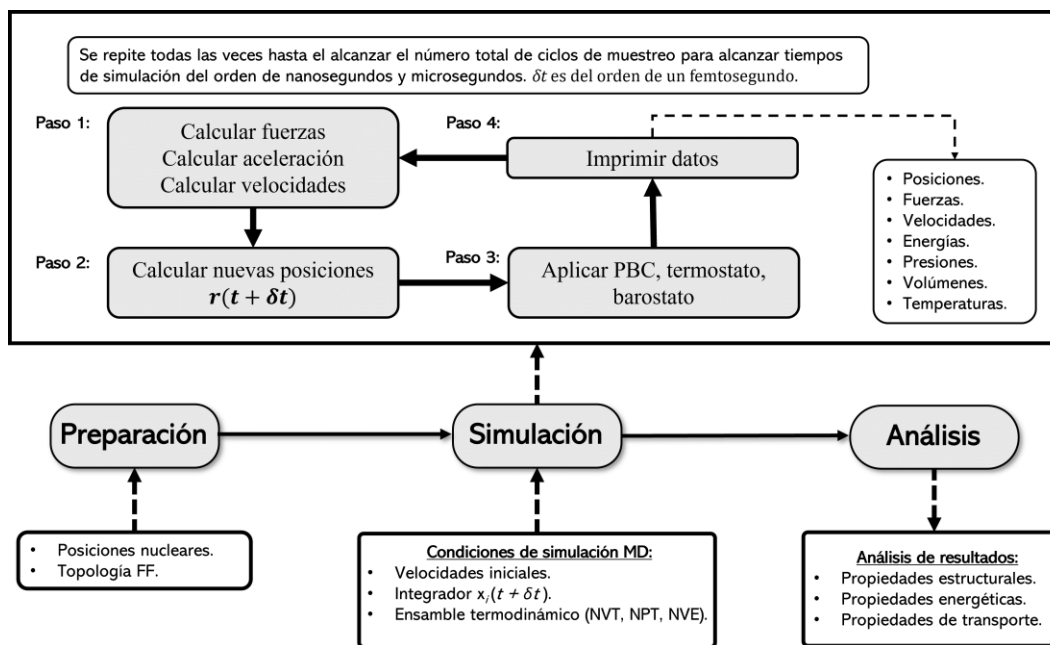
En este apartado se describen los procedimientos correspondientes a los cálculos computacionales que se llevaron a cabo para entender, desde una visión microscópica, los posibles efectos sobre la estructura molecular de la proteína HRP antes y después de su funcionalización con una lámina de GODs. En este sentido, el procedimiento general que se llevó a cabo se presenta en la Figura 9, y consistió en realizar de consecutiva cuatro etapas: *i*) la obtención de las estructuras de partida (posiciones atómicas) de cada una las unidades moleculares implicadas en la formación del sistema funcionalizado (GODs-HRP); así como también la presencia de moléculas de agua e iones para imitar tanto las condiciones de solvente como el pH; *ii*) la obtención de la topología FF para simular las interacciones enlazantes (intramoleculares tales como enlaces, ángulos de valencia, ángulos de torsión) y no-enlazantes (intra- e intermoleculares tales como interacciones electrostáticas y de Lennard-Jones) de todo el sistema; *iii*) las condiciones de simulación DM para explorar todo el espacio configuracional del sistema molecular de interés en función del tiempo del orden de los nanosegundos (ns); y finalmente *iv*) el análisis de los resultados provenientes de los las simulaciones DM; además de cálculos computacionales adicionales basados en energía libre de Gibbs para entender la orientación del GODs con la HRP termodinámicamente más favorable; y acoplamiento molecular para explorar la conservación del sitio activo de la enzima HRP con moléculas de tipo fenol una vez funcionalizada con el GODs.

A continuación, se presenta en detalle el desarrollo de cada una de las etapas mencionadas anteriormente, incluida las herramientas de visualización, edición, parametrización, preparación de archivos, los programas de simulación y las herramientas de análisis de resultados que permitieron desarrollar satisfactoriamente esta etapa del presente trabajo de investigación.

Figura 9

Esquema general de las simulaciones computacionales para el estudio del sistema funcionalizado

GODs-HRP



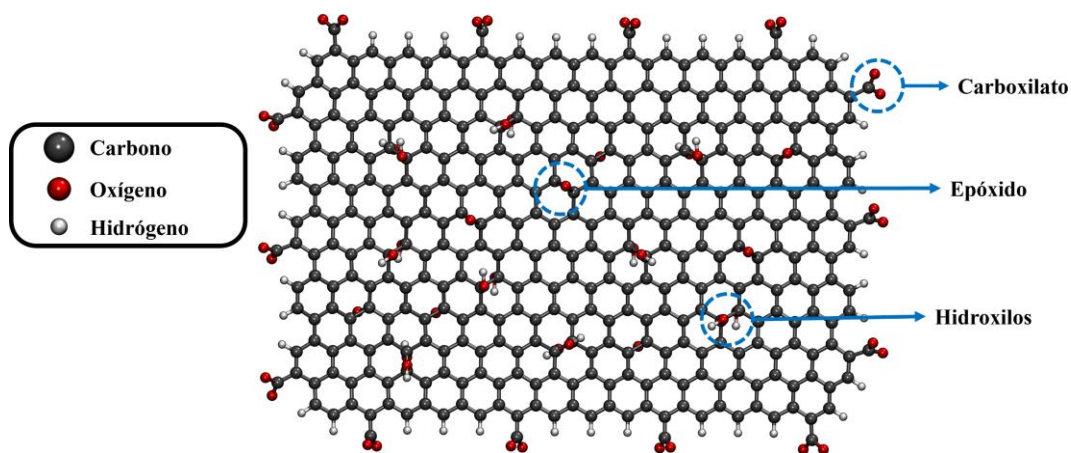
3.2.1 Modelos moleculares y campos de fuerza

Para obtener las coordenadas atómicas de partida del sistema funcionalizado GODs-HRP, se inició con la construcción de la estructura hipotética del GODs basada en el modelo de Lerf-Klinowski como se muestra en la Figura 10. Una lámina de grafeno de un tamaño de aproximadamente $3.7 \times 2.3 \text{ nm}^2$ fue dibujada y posteriormente se insertaron grupos oxigenados

tanto en la superficie (*e.g.* 8 grupos epóxidos y 18 hidroxilos) como en los bordes (*e.g.* 14 grupos carboxilatos); usando el programa ChemSketch (<https://www.acdlabs.com/>). Esto último teniendo en cuenta que, en la etapa experimental, el pH final del sistema GODs-HRP fue ajustado a un valor cercano al neutro en medio acuoso. La composición final de la lámina de GODs fue $C_{382}H_{56}O_{54}$ con carbonos sp^2 conjugados y carbonos sp^3 generando defectos sobre la superficie.

Figura 10

Modelo estructural de lámina GODs



Una vez obtenida la estructura final del GODs, se exportó a un archivo formato mol2 para la obtención de la topología de campo de fuerza. Para esta etapa, los parámetros de campos de fuerza (enlazantes y no-enlazantes) del GODs fueron obtenidos bajo el método de campo de fuerza generalizado versión (GAFF), una extensión del campo de fuerza Amber originalmente desarrollado para biomoléculas (Maier et al., 2015), usado para moléculas orgánicas (Sprenger et al., 2015; J. Wang et al., 2004). En este sentido, la ecuación general de FF para GAFF y Amber es descrita mediante la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
V_{Total} = & \sum_{\text{enlace}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ángulo}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} \frac{K_\phi}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
& + \sum_{\text{no-enlace}} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}} \right]
\end{aligned} \tag{7}$$

Donde b , θ , ϕ , φ , y R_{ij} son parámetros geométricos internos denominados: distancia de enlace, ángulo de valencia, ángulo diedro, ángulo impropio, y distancia entre dos átomos; b_0 y θ_0 , son parámetros geométricos de equilibrio; n y δ son la multiplicidad y ángulo de fase para los parámetros de ángulos diedros; K_b , K_θ , y K_ϕ son las constantes de fuerza para las interacciones de enlace, ángulo de valencia y ángulo diedro respectivamente; A_{ij} y B_{ij} son parámetros de Lennard-Jones; q_i y q_j son las cargas atómicas de un par de átomos no enlazados; ϵ_0 es la permitividad eléctrica en el vacío. Con base en lo anterior, la topología FF para el GODs se obtuvo usando el conjunto de subprogramas de AmberTools (e.g. *antechamber*, *parmchk2* y *tleap*) (Case et al., 2023). Debido al tamaño de la lámina GODs, las cargas atómicas fueron calculadas con el modelo AM1-BCC que permitió imitar las cargas atómicas del esquema original de asignación de cargas atómicas en el método GAFF (e.g. nivel de teoría HF/6-31G* y el método de potencial electrostático restringido, RESP, bajo el esquema Merz-Kollman) (Jakalian et al., 2002; Singh & Kollman, 1984). Posteriormente, los archivos obtenidos mediante las herramientas de AmberTools fueron convertidos mediante la interfaz ACPYPE para posteriormente ser usados en las simulaciones de dinámica molecular (Sousa da Silva & Vranken, 2012).

Desarrollada la estructura y topología FF del GODs, el siguiente paso fue la obtención de las coordenadas nucleares del enzima HRP y su posterior parametrización FF. La estructura cristalina de la HRP fue descargada del banco de datos de proteínas (<https://www.rcsb.org/>) con el código PDB ID: 1HCH) (Berglund et al., 2002). Cabe resaltar que esta estructura ha sido usada por otros autores en estudios computacionales (Campomanes et al., 2015). Teniendo en cuenta que

la enzima HRP se compone de unidad proteica y un fragmento Hemo (ver Figura 7a); éstos fueron tratados de forma independiente. La unidad proteica de la HRP fue editada de tal forma que únicamente se usara las coordenadas atómicas de los residuos de aminoácidos y los iones de calcio. El campo de fuerza amber99ff fue seleccionado para obtener la topología de campo de FF y se llevó a cabo usando el subprograma *pdb2gmx* (un subprograma que hace parte del kit de herramientas de GROMACS); además, la asignación de cargas atómicas y estados de protonación se realizó teniendo en cuenta las condiciones de pH cercanos al neutro.

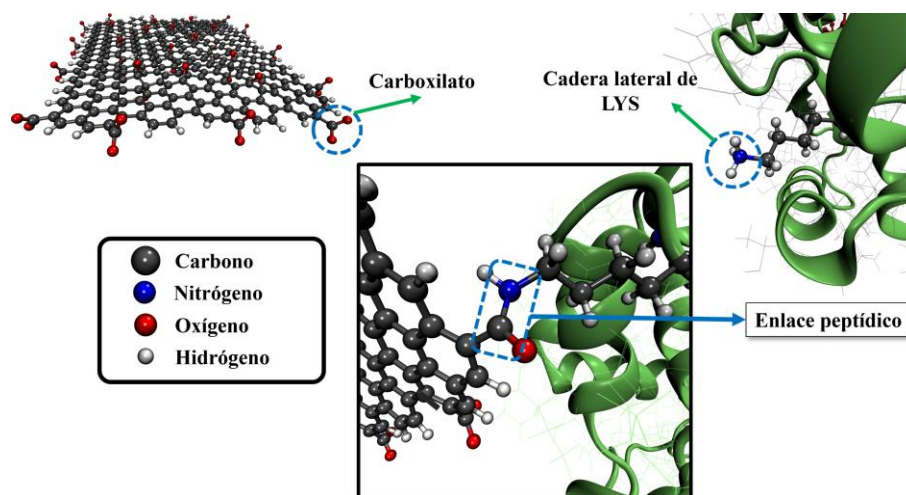
Para el fragmento Hemo, que hace parte de la enzima HRP, la parametrización se llevó a cabo usando el esquema original de parametrización propuesto para GAFF. Es decir, se tomó la estructura original del banco PDB, se agregaron hidrógenos considerando las hibridaciones de los átomos de carbono y el pH en medio acuoso. Sin embargo, debido a la presencia de un átomo de hierro en su estructura central se usó el método Hartree-Fock (HF) en combinación con el conjunto base LANL2DZ con potenciales ECP auxiliares sobre el átomo de hierro; obtenidas de la base de datos de funciones base (<https://www.basissetexchange.org/>). En este sentido, inicialmente se optimizó su estructura en fase gaseosa y se verificó que correspondiera a un punto crítico de mínima energía. Posteriormente, se obtuvieron las cargas con el método RESP bajo el esquema Merz-Kollman, usando el programa GAMESS-US (Barca et al., 2020). Para los parámetros enlazantes y no-enlazantes (únicamente Lennard-Jones) se usó el kit de subprogramas de AmberTools mencionados anteriormente. Los parámetros de Lennard-Jones para el átomo de Fe^{III} se tomaron de Roberts et al. (P. Li et al., 2013).

Una vez obtenida las estructuras y topologías FF de cada unidad molecular (GODs, HRP y grupo Hemo) se procedió a construir el sistema GODs-HRP. Lo anterior se realizó mediante la formación de un enlace peptídico entre un grupo carboxilato ubicado en el borde de la lámina

GODs y el grupo amino de la cadena lateral de residuos de aminoácido de lisina (LYS) ubicados en la parte superficial de la estructura de la HRP como se muestra en la Figura 11. Posteriormente, se migraron los parámetros FF originales de cada unidad molecular y se adicionaron los parámetros FF (enlace, ángulo de valencia y ángulo diedro) de la interfaz GODs-HRP. Adicionalmente, se ajustaron las cargas en dicha interfaz para garantizar la conservación de los parámetros FF obtenidos inicialmente.

Figura 11

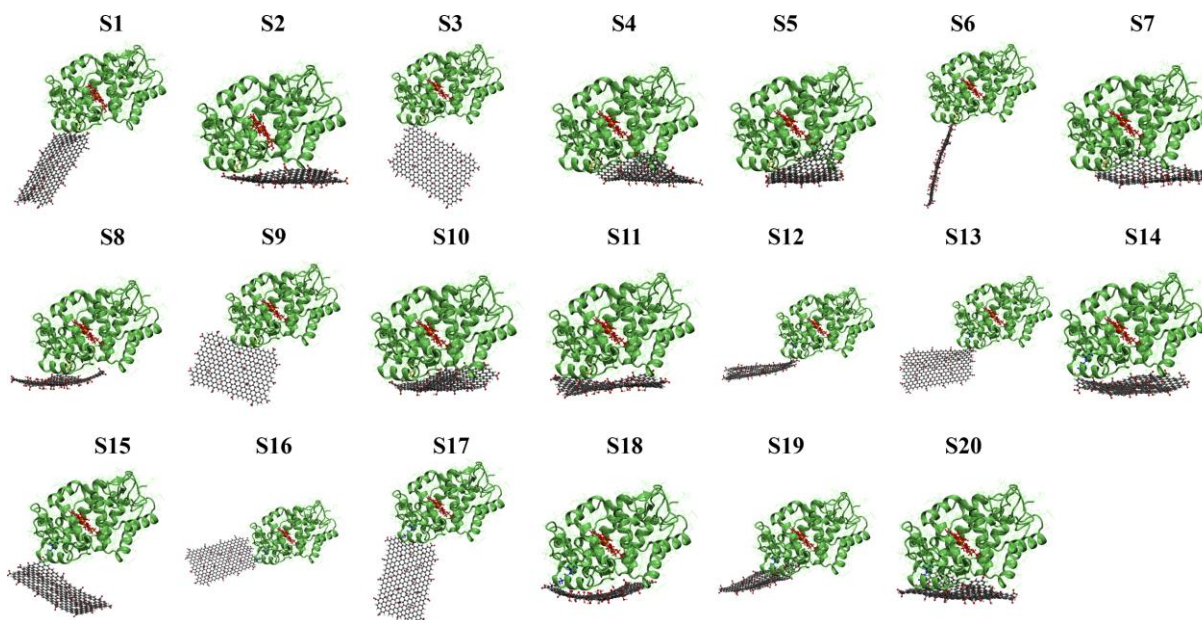
Esquema representativo de la construcción del compuesto GODs-HRP



Teniendo en cuenta que la lámina de GODs presenta varios grupos carboxilatos en diferentes sitios de sus bordes (ver Figura 9) y la HRP contiene dos residuos aa de lisina en la superficie (e.g. LYS232 y LYS241) se construyeron diferentes configuraciones sistema GODs-HRP; con miras a realizar una exploración detallada de todos los posibles sitios de anclaje ver Figura 12.

Figura 12

Configuraciones GODs-HRP para los cálculos computacionales



De acuerdo con lo anterior, 20 configuraciones fueron construidas teniendo en cuenta que no fueran similares en términos de la orientación de la lámina de GODs relativa a la superficie de la enzima HRP en las vecindades de las cadenas laterales de los residuos aa LYS232 y LYS241. Cada una fue nombrada como S1, S2 hasta S20. Dentro del set de configuraciones, 11 (S1 hasta S11) corresponden a aquellas cuyo enlace peptídico involucró la LYS232; mientras que las restantes (S12 hasta S20) corresponden a aquellas que involucran la LYS241.

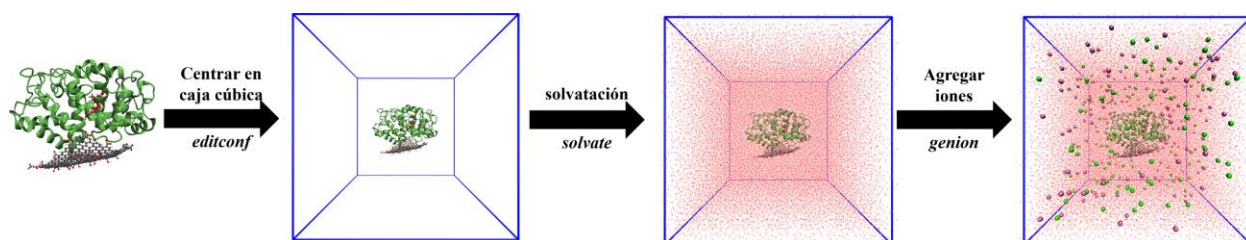
3.2.2 Simulaciones de dinámica molecular

Todas las simulaciones MD fueron llevadas a cabo usando el programa GROMACS (GRoningen MACHine for Chemical Simulations) versión 2022.3 (Bauer et al., 2022), alojado en el centro de supercomputación NMRbox (<https://nmrbox.nmrhub.org/>). En sentido, cada sistema

fue preparado siguiendo el esquema presentado en la Figura 13. Inicialmente fueron confinados y centrados en una caja cúbica de alrededor $12 \times 12 \times 12 \text{ nm}^3$. Posteriormente, se agregaron aleatoriamente moléculas de agua con la herramienta *solvate* (subprograma de GROMACS) simulados con el campo de fuerza TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Adicionalmente, se agregaron iones de Na^+ y Cl^- para neutralizar cargas e imitar condiciones de pH cercanos al neutro (e.g. pH~7 y 0.15 mol/L de NaCl) (Hammad et al., 2020). Todos los sistemas fueron optimizados, para garantizar que las coordenadas atómicas se localizaran proximos a un mínimo, usando el algoritmo del *paso más descendiente* (o en inglés: algoritmo steepest descent) hasta alcanzar un criterio de convergencia menor a $0.01 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ o máximo 1×10^5 pasos de optimización. Posteriormente, las simulaciones MD se realizaron siguiendo el orden: 200 ps NVT \rightarrow 200 ps NpT \rightarrow 100 ns NpT; y sus detalles de describen a continuación.

Figura 13

Esquema general para preparar los sistemas atómicos para dinámica molecular



- (1) 200 ps NVT: esta parte correspondió a simulaciones MD manteniendo constante la cantidad de sustancia (N) el volumen (V) y la temperatura (T). Se realizaron 2×10^5 ciclos de simulación con un paso de tiempo de 1 fs. Para garantizar la conservación N se aplicó el esquema de condiciones periódicas de contorno (PBC). La temperatura se mantuvo constante ($T = 2981.5$) usando algoritmo de acoplamiento de temperatura

mediante reescalado (V-rescale) con una constante de acoplamiento de 0.1 ps (Bussi et al., 2007). A cada átomo se generó una velocidad inicial aleatoria siguiendo la distribución de velocidad de Boltzmann a la misma temperatura.

- (2) 200 ps NpT : correspondió a simulaciones MD manteniendo constante la cantidad de sustancia, la presión (p) y la temperatura. 2×10^5 ciclo de simulación con un paso de tiempo de 1 fs fueron realizados; utilizando las coordenadas y velocidades nucleares del último ciclo de simulación NVT . Se aplicó el mismo termostato, usado en la etapa anterior. La presión se mantuvo constante ($p = 1$ atm) usando el algoritmo de acoplamiento de presión de Parrinello-Rahman (Parrinello, 1981) isotrópico y una constante de acoplamiento de 2 ps.
- (3) 100 ns NpT : correspondiente a la etapa de producción. 1×10^8 ciclos de simulación MD con un paso de tiempo de 1 fs fueron llevados a cabo; usando las coordenadas y velocidades nuclear de la etapa anterior. Además, las coordenadas atómicas fueron almacenadas en un archivo de trayectorias cada 10 ps.

Adicionalmente, en todas las simulaciones MD se tuvieron en cuenta las interacciones no-enlazantes con un radio de corte de 1.2 nm; siendo las cargas atómicas tratadas con el método de mallas de partículas de Ewald (PME) (Essmann et al., 1995); mientras que las interacciones de Lennard-Jones fueron tratadas con el esquema *cut-off*. Además, únicamente se restringieron las interacciones de puente de hidrógeno utilizando el algoritmo LINCS y la lista de contactos se actualizó cada 100 fs.

Posterior a las simulaciones DM, los archivos de trayectorias de la etapa de producción fueron usados para extraer diversas propiedades que permitiera explorar el espacio configuracional

de todos los sistemas de interés a lo largo del tiempo de muestreo. En este sentido, se calcularon las siguientes propiedades: raíz cuadrada del desplazamiento cuadrático medio (RMSD), radio de giro (R_G), fluctuación de los residuos (RMSF) de aa de la HRP antes y después de la funcionalización con la lámina de GODs, cantidad de puentes de hidrógeno; y otras propiedades estructurales que serán comentadas posteriormente.

3.2.3 Cálculos MM-GBSA y acoplamiento molecular

Posterior a las simulaciones MD, se llevaron a cabo una serie de simulaciones para explorar cuál configuración del compuesto GODs-HRP es la termodinámicamente más probable. En este sentido, las coordenadas atómicas del sistema en mención fueron extraídas de las simulaciones MD de la etapa de producción cada 200 ps; para un total de 500 capturas de trayectorias. A partir de lo anterior, se prepararon los archivos y condiciones de cálculo para obtener la energía libre de Gibbs en la fase condensada. Todos los cálculos fueron llevados a cabo usando la interfaz *gmx_MMPBSA*, desarrollada por Miller y colaboradores, que es una herramienta en Python basada en MMPBSA.py que permite utilizar los archivos propios de GROMACS para calcular la energía libre de Gibbs a través del kit de herramientas de AmberTools (Case et al., 2023; Miller et al., 2012; Valdés-Tresanco et al., 2021). La energía libre de Gibbs en fase condensada fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$G_{Cond.} = V_{MM} + E_{Pol} + E_{NP} \quad (8)$$

Donde V_{MM} es la energía total en mecánica molecular (MM) debido a las interacciones enlazantes (enlace, ángulo de valencia, ángulo de torsión) y no-enlazantes (interacciones de

Coulomb y Lennard) proveniente de la topología FF. E_{Pol} es la contribución energética polares y fue calculada mediante el modelo generalizado de Born (GB). E_{NP} es la contribución energética no-polar y fue calculada mediante el método SASA (área superficial accesible al solvente) (Case et al., 2023). La energía libre de Gibbs en fase condensada para cada sistema de estudio fue calculada y reportada como sus respectivos valores promedios; y la configuración del compuesto GODs-HRP escogida fue la que presentó la menor energía libre de Gibbs. Finalmente, identificado la configuracional GODs-HRP termodinámicamente más favorable se realizaron cálculos computacionales basados en acoplamiento molecular para determinar la conservación del sitio activo de la enzima HRP, antes y después de la funcionalización con GODs, frente al fenol. Esta última se escogió como molécula representativa de los compuestos derivados del fenol. Los detalles de esta etapa se describen en el Apéndice A.

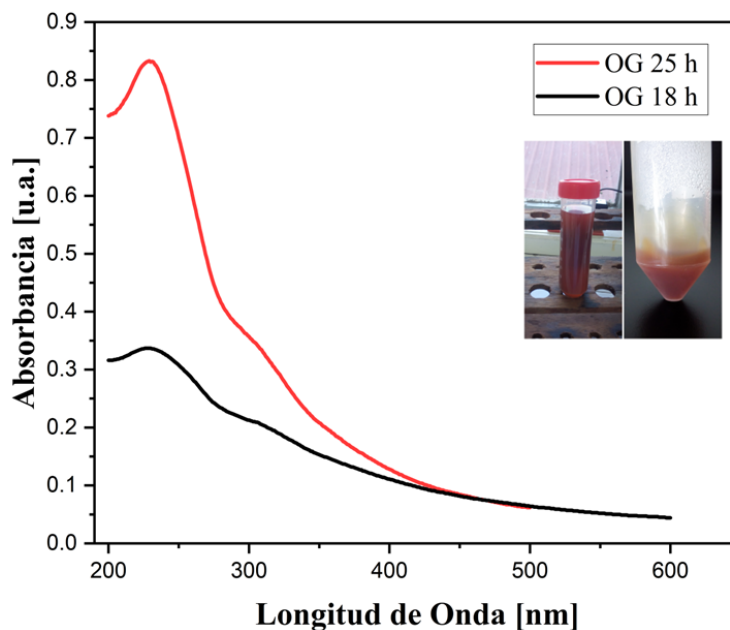
4. Resultados y discusión

4.1 Síntesis y caracterización de OG

Se realizó la síntesis de OG mediante el método modificado de Hummers, con un tiempo de oxidación de 18 horas y 25 horas, implementado en el LEAM. Se obtuvo una dispersión acuosa de OG finalmente haciendo lavados sucesivos con agua tipo I, se obtiene una suspensión de coloración café claro (ver Figura 14). El OG obtenido a estos tiempos de oxidación, se considera que posee abundantes grupos funcionales oxigenados, incrementando la posibilidad de obtener nanoestructuras con dichos grupos. Su color café claro, también se asocia a un GO altamente oxidado.

Figura 14

Espectros UV-Vis del OG a 25 h y 18 h de oxidación. En el interior se observa el producto obtenido de OG de 18 h y 25 h respectivamente



4.1.1 Espectroscopia UV-Vis

En la Figura 14 se presenta los espectros obtenidos al aplicar la técnica de espectroscopia UV-Vis, para el óxido de grafeno cuyo tiempo de oxidación fue de 18 horas y óxido de grafeno con tiempo de oxidación de 25 horas.

Los espectros UV-Vis de las dispersiones acuosas del OG presentan una banda con un máximo de absorción a 229 nm, lo cual concuerda con los resultados de análisis previos reportados en la literatura (Gomez, 2012; Pan et al., 2010).

Este máximo de absorción se atribuye a la superposición de dos tipos de transiciones electrónicas:

- ✓ transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de C-C y C=C en los dominios sp^2 aromáticos.
- ✓ transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los grupos carbonilo de cetonas y ácidos carboxílicos con α, β -insaturaciones.

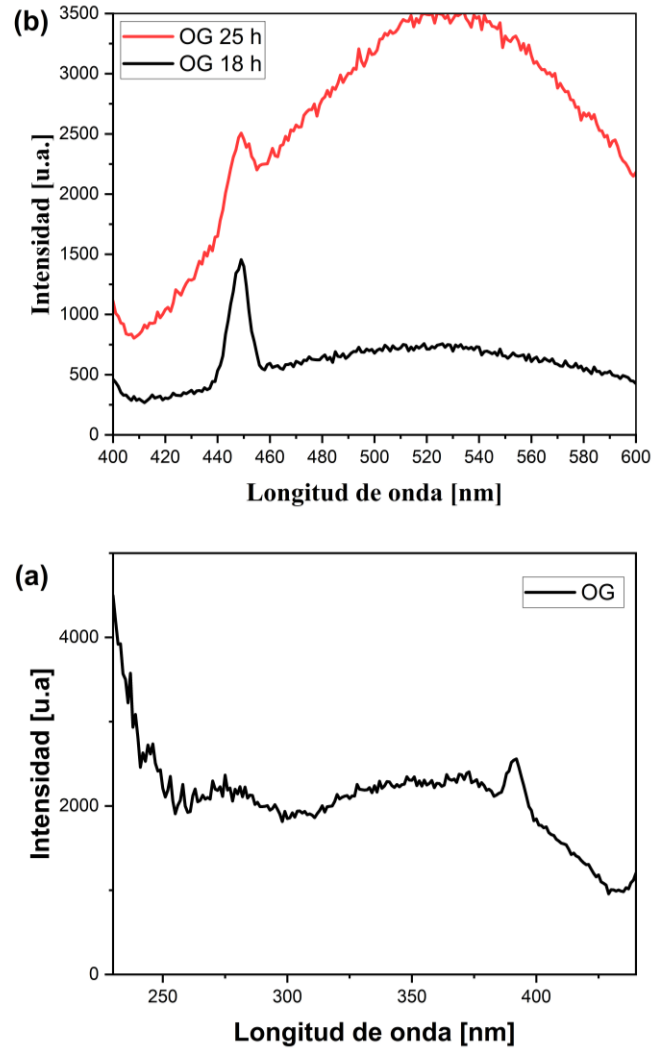
La banda de absorción hacia ~ 300 nm se relaciona a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ dadas por la presencia de grupos funcionales (C-O-C, COOH, C=O) en el material (Saxena et al., 2011).

4.1.2 Espectroscopía de Fluorescencia

Se llevó a cabo un barrido de longitudes de onda de excitación para las dispersiones acuosas de OG, abarcando un rango de longitud de onda de excitación desde 210-440 nm (ver figura 15,a). Como resultado, se identificó una región amplia, destacándose una banda de máxima intensidad a 390 nm. Esta longitud de onda fue seleccionada como la longitud de onda de excitación óptima, lo que permitió obtener el espectro de emisión de las dispersiones de OG (ver Figura 15, b).

Figura 15

Espectros de excitación (a) y emisión (b) del OG



Las longitudes de onda de emisión, de acuerdo con la literatura, depende de la presencia de grupos funcionales, pH y su combinación con otros materiales. Teniendo en cuenta los espectros, se pueden hacer las siguientes observaciones:

- ✓ Intensidad de fluorescencia: el grafeno no posee fotoluminiscencia, pero cuando este es oxidado a óxido de grafeno, el cual contiene múltiples grupos funcionales que

contienen oxígeno (-C-O-C, -C=O, -COOH) genera un efecto de confinamiento. Dichos grupos oxigenados interrumpen las regiones sp^2 , lo que crea centros emisores responsables de la fluorescencia. La muestra oxidada durante 25 horas muestra una mayor intensidad de fluorescencia en todo el rango de longitudes de onda en comparación con la muestra oxidada durante 18 horas. Esto indica que un mayor tiempo de oxidación produce más centros emisores o incrementa la eficiencia de la fluorescencia debido a una mayor incorporación de grupos oxigenados que influyen en las propiedades ópticas del material (Xiao et al., 2022).

- ✓ Si bien un mayor número de grupos oxigenados tiende a incrementar la intensidad de la fluorescencia, se ha reportado que un exceso de oxidación puede también conducir a una dispersión de los centros emisores, lo cual genera una dispersión más ancha y menos focalizada, como se observó en la muestra oxidada durante 25 horas (Vempati & Uyar, 2014; Xiao et al., 2022).
- ✓ Desplazamiento del máximo de emisión. La muestra de 18 horas de oxidación evidencia una banda de emisión más definida a 450 nm, en comparación con la muestra de 25 horas, cuya intensidad sigue aumentando a lo largo del espectro, esto podría estar relacionado a que los sitios de emisión están más dispersos o bien debido al desorden estructural, generando una mezcla de diferentes longitudes de onda de emisión (M. Li et al., 2012).
- ✓ Emisión dependiente del tamaño. De acuerdo con la literatura, la emisión de la fluorescencia en el OG es dependiente del tamaño. Cuanto más pequeña sea la proporción de los dominios sp^2 , debido a la presencia de grupos oxigenados, más se desplazará la banda de emisión hacia longitudes de onda más cortas (desplazamiento

hipsocrómico) (Vempati & Uyar, 2014), como se puede observar en el espectro del OG de 18 horas de oxidación, en donde el pico está más definido a una longitud de onda de 450 nm. En comparación con el espectro de 25 h, este fenómeno sugiere que el material ha alcanzado un nivel de oxidación en el que los centros emisores están más distribuidos y menos controlados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la literatura existente, se decidió trabajar con un grado de oxidación de 25 h y reducir el tamaño del OG. Considerando que la reducción del tamaño mejora significativamente las propiedades ópticas como se ha demostrado en varios estudios (H. Sun et al., 2013; Vempati & Uyar, 2014; Xiao et al., 2022; Xu et al., 2015). Por lo tanto, se optó por sintetizar derivados del óxido de grafeno (GODs) a partir de este material, los siguientes espectros corresponden a OG de 25 h de oxidación como precursor.

4.2 Síntesis y caracterización de GODs

4.2.1 Efecto del pH

Teniendo en cuenta que la literatura reporta un aumento en la intensidad de fluorescencia al trabajar en un pH alcalino cercano a 8, se utilizó 1.5 g de OG a una temperatura constante de 190 °C. Los resultados confirman el efecto del pH, destacando la importancia de mantenerlo dentro del rango biológico de 7 a 8.

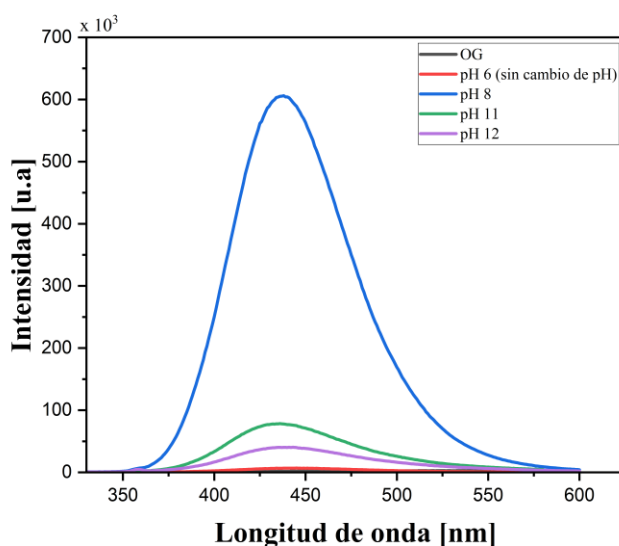
De acuerdo con la Figura 16, la curva correspondiente al OG presenta una baja intensidad en comparación con las otras muestras. Dado que el OG sin modificar no es altamente fluorescente, debido a que, durante su síntesis, en el proceso de oxidación, se introducen grupos funcionales

oxigenados (epóxidos, hidroxilos y carboxilos) que interrumpen la conjugación de los dominios de sp^2 responsables de la fluorescencia. Estos defectos inducidos por dichos grupos funcionales generan estados de defectos que tienden a extinguir la fluorescencia. Sin embargo, cuando el OG es reducido hasta obtener GODs (Figura 16, curva pH 8), a través de métodos como la síntesis hidrotérmica asistida por microondas, ciertos grupos oxigenados son eliminados, aumentando de esta manera los dominios sp^2 conjugados (dominando las transiciones $\pi-\pi^*$), lo que incrementa los sitios de recombinación radiativa y estados confinados de mayor energía, y, por tanto, la intensidad de la emisión de la fluorescencia(Abid et al., 2018; Chien et al., 2012; Khan et al., 2021).

Figura 16

Espectros de emisión de GODs a diferentes valores de pH (6-12). Espectro de emisión del OG.

$\lambda_{exc}: 320 \text{ nm}$



El efecto de pH sobre la intensidad de la fluorescencia desempeñó un rol clave en la síntesis de los GODs, como se mencionó anteriormente. Varios mecanismos, sobre el efecto del pH en la

PL, han sido propuestos, dentro de estos modelos se incluyen la protonación y deprotonación, cambios del nivel de energía, agregación de las nanoestructuras, transferencia de protón y coraza protectora. Sin embargo, aún no se ha establecido un mecanismo único y aceptado para este comportamiento esto se debe a la diversidad de métodos y precursores empleados para la síntesis de nanoestructuras, los cuales generan nanomateriales con propiedades fisicoquímicas variadas. Estas diferencias pueden conducir a resultados inconsistentes entre estudios, lo que complica la identificación de un mecanismo universal que explique de manera coherente el comportamiento observado ([Ehtesabi et al., 2020](#)).

En la Figura 16, se observa que, a valores altos de pH, ocurre una disminución marcada de la intensidad de la fluorescencia debido a la deprotonación de grupos funcionales como hidroxilos y grupos carboxilos que están presentes en la superficie de los GODs. Lo cual genera cambios en las propiedades ópticas de este nanomaterial. Contrario a lo que sucede, a valores bajos de pH (hacia condiciones más ácidas), la protonación de estos grupos puede incrementar la fluorescencia debido a la estabilización de los estados electrónicos y el incremento de solubilidad ([Ehtesabi et al., 2020](#); [Groeneveld et al., 2022](#)).

Como se observa en la Figura 16 para el blanco sin cambios de pH, la fluorescencia es poco perceptible. Inicialmente el OG se encuentra en condiciones ácidas (~pH 6.0), de acuerdo con Pan y colaboradores, ocurre la protonación de los sitios zigzag libres de las CNDs que conlleva a la formación de un complejo reversible entre los sitios zigzag y los protones. A consecuencia de ello se rompe el estado de carbeno triplete y por consiguiente la fotoluminiscencia se inactiva ([Pan et al., 2010](#)).

Sin embargo, a un pH ligeramente básico como pH 8, los grupos funcionales en los GODs como carboxilos (-COOH) pueden estar en un estado intermedio de protonación y deprotonación.

Este equilibrio entre los grupos protonados y desprotonados puede generar un entorno que favorece la recombinación radiativa de electrones, lo que favorece el incremento de la intensidad de la fluorescencia comparado al resto de muestras. Así mismo, es posible que los GODs tengan una mayor estabilidad coloidal debido a la presencia de una carga negativa moderada en su superficie (como resultado de la deprotonación parcial de los grupos carboxilos). Esto puede aumentar su solubilidad en agua y evitar la agregación, mejorando de esta manera las propiedades optoelectrónicas.

4.2.1 Efecto de la temperatura en la síntesis de GODs

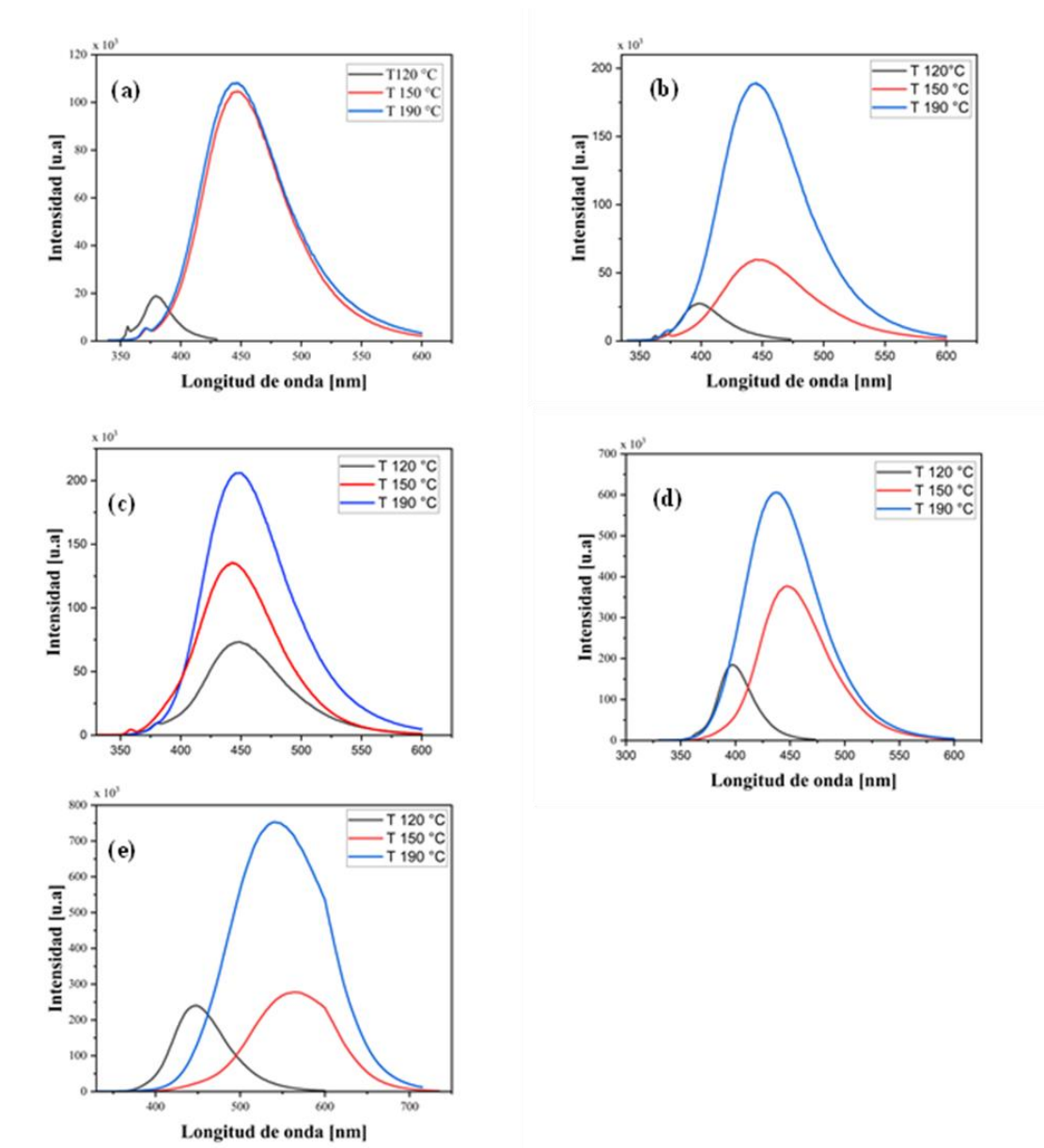
Tras el tratamiento hidrotérmico del OG, a temperaturas de 120 °C, 150 °C y 190 °C; se observaron cambios significativos (Figura 17), en las propiedades ópticas y en la formación de las GODs, estos cambios fueron más notables a temperaturas elevadas y en condiciones alcalinas (pH 8), en el que se registró una intensa emisión, atribuida a fenómenos de fotoluminiscencia y a la formación de estados emisivos de carbeno triplete, reportados por Pan y colaboradores ([Pan et al., 2010](#)).

En la Figura 17, se observa los espectros de fluorescencia de las muestras de diferentes concentraciones, a las diferentes temperaturas, siendo sus perfiles acordes a los reportados por Rajender y colaboradores, los autores sugieren que a temperaturas alrededor de los 200 °C ocurre la descomposición del OG a través de la ruptura de los enlaces C-C subyacentes a la línea que forma los grupos epoxi sobre el enrejado de carbono. Siendo energéticamente favorable ser oxidados a pares epoxi que luego se convierten en pares carbonilos más estables a temperatura ambiente. Independientemente de la cantidad de óxido de grafeno, existe una tendencia clara a aumentar la intensidad de la fluorescencia a medida que aumenta la temperatura, La temperatura

y el pH alcalino es la clave para obtener los GODs con fotoluminiscencia significativas (Pan et al., 2010; Rajender & Giri, 2016).

Figura 17

Espectros de fluorescencia de GODs preparados con OG de a) $10 \times 10^3 \frac{mg}{L}$; b) $25 \times 10^3 \frac{mg}{L}$; c) $50 \times 10^3 \frac{mg}{L}$; d) $150 \times 10^3 \frac{mg}{L}$; $250 \times 10^3 \frac{mg}{L}$ a diferentes temperaturas, con longitud de onda de excitación: 330 nm



4.2.2 Efecto de la concentración

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se realizó el tratamiento hidrotérmico asistido por microondas, con soluciones de OG a la temperatura óptima de 190 °C y pH:8.0. (Figura 18).

Figura 18

Soluciones de OG de concentraciones: $10 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $25 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $50 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $150 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $250 \times 10^3 \frac{mg}{L}$

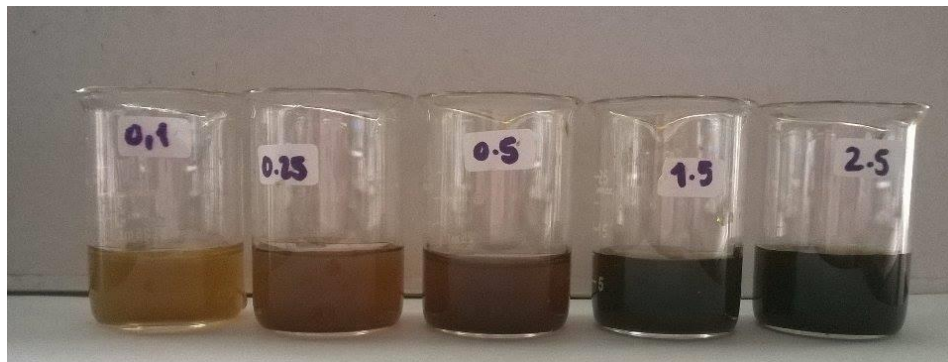
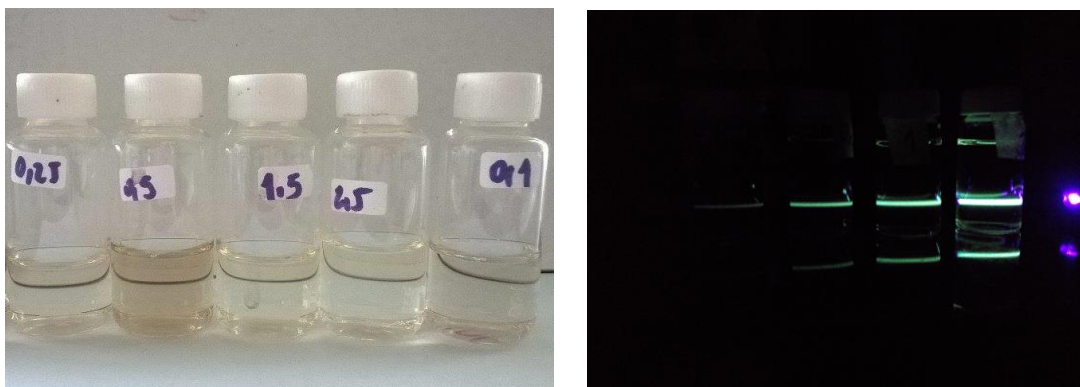


Figura 19

GODs obtenidas a diferentes concentraciones de OG



Luego del tratamiento hidrotérmico, se observan cambios visuales en el producto obtenido, reflejados en la formación de una solución de color amarillo pálido (Figura 19). Una prueba preliminar de emisión de fluorescencia realizada con un apuntador láser de 400 nm de longitud de onda confirmó que las muestras emitían fluorescencia (Figura 19). Además, se observaron modificaciones en las propiedades ópticas al variar el pH y la temperatura, lo que indica la sensibilidad de las nanoestructuras a estas condiciones y su potencial para aplicaciones dependientes de parámetros ambientales o como biosensores.

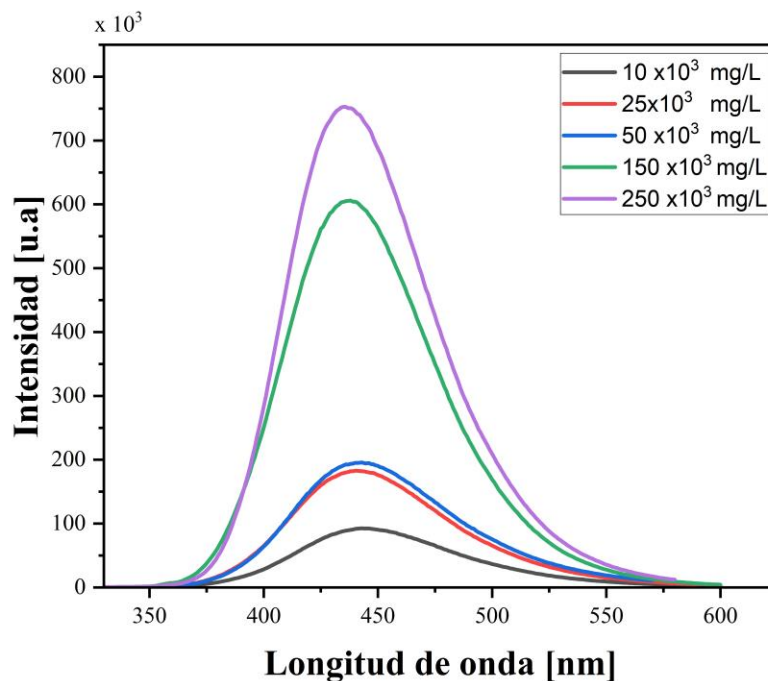
Posteriormente, se analizaron las muestras mediante espectroscopía de fluorescencia para determinar la concentración óptima.

De acuerdo con la Figura 20, el aumento en la concentración del precursor, OG, incrementa significativamente la intensidad de la fluorescencia, presentando una mayor intensidad a 250×10^3 mg/L de OG. Lo cual incrementa la cantidad de GODs formados. Esto es consistente con estudios experimentales, en los cuales se ha demostrado que una mayor concentración de GODs aumenta el número de centros emisores activos asociados con el incremento en la cantidad de grupos oxigenados (Ventrella et al., 2020).

A pesar de que se observa un cambio en la intensidad de los GODs, no se observa un desplazamiento en la banda. Sugiriendo que el tamaño y la estructura de los GODs no cambian significativamente con la concentración del precursor para concentraciones bajas. Para concentraciones más altas se observa una disminución en el ancho de la banda indicando una distribución homogénea de los puntos, y adicionalmente una disminución en su tamaño promedio de partícula (Zhi et al., 2019; Zhu et al., 2015).

Figura 20

Espectros de fluorescencia de GODs preparados a diferentes concentraciones de OG: $10 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $25 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $50 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $150 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, $250 \times 10^3 \frac{mg}{L}$, con longitud de onda de excitación: 320 nm, T: 190 °C.



Una vez escogidos los parámetros para la síntesis de los GODs, se procedió a su purificación y evaluación por las diferentes técnicas espectroscópicas.

4.2.3 Caracterización de GODs

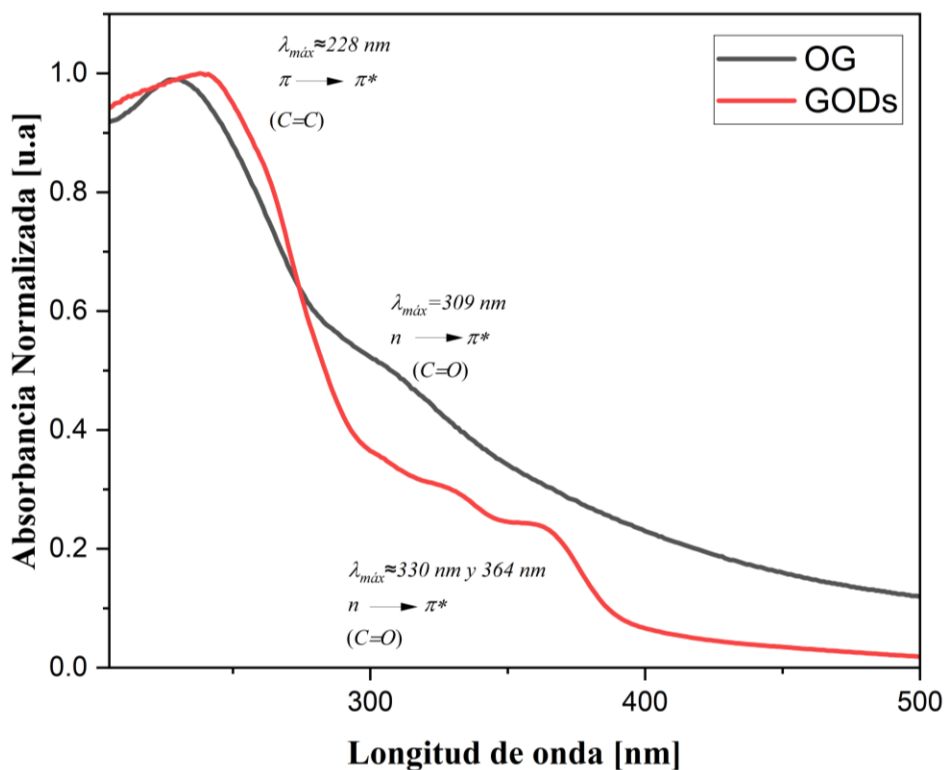
4.2.3.1 Espectroscopía UV-Vis. Además de los cambios observados en la fluorescencia luego del tratamiento hidrotérmico, se detectaron alteraciones significativas en las bandas de absorción del espectro UV-Vis de los GODs comparado con el espectro UV-Vis del OG (Figura 21). Estos

cambios sugieren modificaciones en la estructura electrónica y la presencia de nuevos estados excitados lo que influye en las propiedades ópticas del material.

En el caso del OG, la señal a 228 nm es asignada a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los dominios sp^2 aromáticos, mientras que la banda de absorción alrededor de 309 nm se relaciona a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ generadas por la presencia de grupos funcionales (COOH, C=O) en el material (Zhu et al., 2015). En contraste, para los GODs, además de una fuerte banda de absorción $\pi \rightarrow \pi^*$ (con un leve desplazamiento al rojo), se observan dos nuevas bandas más definidas a 330 nm y 364 nm, atribuibles a presencia de enlaces C=O u otros grupos conectados (Pan et al., 2010; Rajender & Giri, 2016).

Figura 21

Espectros UV-Vis de OG y GODs



4.2.3.2 Espectroscopía de fluorescencia. Cómo se observó en la Figura 15, la fluorescencia del OG es apenas perceptible. Sin embargo, el hallazgo más interesante es la observación de un nuevo comportamiento en la PL luego del tratamiento hidrotérmico asistido por microondas. Los GODs emiten fuerte luminiscencia azul incluso en un medio neutro (Figura 16). Excitando a la longitud de onda de la banda de absorción de 318 nm (Figura 22), el espectro de emisión muestra una señal hacia 433 nm con un desplazamiento de Stokes de 115 nm. El rendimiento cuántico (QY) fue calculado empleando como patrón de referencia cumarina 120 (QY: 0.73; $\lambda_{\text{emisión}}$ 431 nm) (Jones & Jackson, 1985) y siguiendo el método comparativo para el cálculo (ver apéndice B), se obtuvo un rendimiento del 8.02%. comparable con lo obtenido en diferentes estudios (Michael W Allen, 2010; Pan et al., 2010; Q. Wang et al., 2011). Las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro Marca Photon Technology International (PTI) Modelo QM40 con lámpara de Xenón y detector fotomultiplicador 814. Las muestras se depositaron en un microcelda de cuarzo de capacidad de 250 μL con un paso óptico de 1.0 mm. Los espectros fueron adquiridos en un tiempo de integración de 1.0 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$

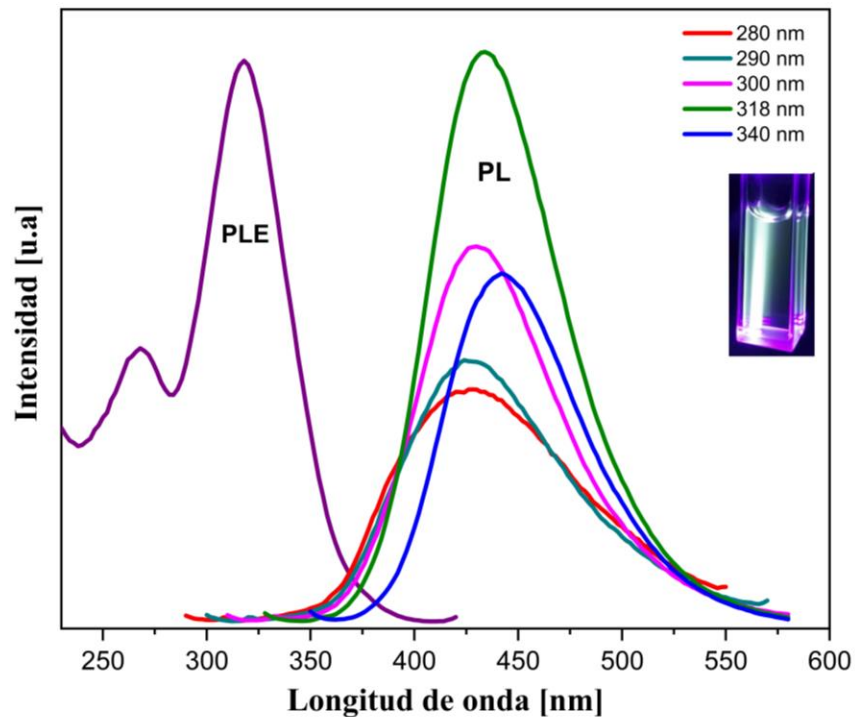
Cabe destacar que una característica de este tipo de nanoestructuras carbonáceas es la dependencia de la fluorescencia con la longitud de onda de excitación (Cayuela et al., 2015; Pan et al., 2010). Al excitar a longitudes de onda entre 280 nm y 340 nm, se observaron desplazamientos hacia longitudes de onda mayores junto con la disminución en la intensidad del máximo de emisión, lo cual es consistente con sus propiedades ópticas (Pan et al., 2010; Zhu et al., 2015).

La excitación a 318 nm evidenció el máximo de intensidad de emisión en comparación con las otras longitudes de onda de excitación. Esto sugiere que esta longitud de onda es óptima para excitar estos GODs y obtener una emisión intensa a 434 nm. En el espectro de excitación (PLE) se observa la presencia de dos bandas, una hacia 280 nm y otra a 318 nm. La banda a 280 nm

corresponde a una absorción de mayor energía la cual está relacionada con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ dentro de las regiones aromáticas conjugadas de los GODs. Siendo estas transiciones comunes en los materiales basados en carbono y se deben a la estructura π -conjugada de los anillos de grafeno (M. Li et al., 2012).

Figura 22

Espectro de excitación (PLE) y espectros de emisión (PL) de fluorescencia de GODs. En el interior se muestra la longitud de onda de excitación



La segunda banda a 318 nm indica a una transición de menor energía y podría estar asociado a defectos o estados superficiales, como los grupos $-C-O$, $-C=O$ y $-COOH$, que se generan durante la síntesis de GODs y pueden actuar como sitios emisores adicionales, contribuyendo a

una mayor variabilidad en las propiedades ópticas del material. Se ha observado que el grupo -COOH presenta acoplamiento electrónico con átomos cercanos a las hojas de grafeno, y que la PL puede atribuirse a transiciones ópticas de $(G-COO^-)^*$ a $G-COO^-$ (Xiao et al., 2022).

Además, algunos autores sugieren que esta intensa emisión podría deberse a la alta concentración de sitios zigzag libres, relacionados con el pequeño diámetro de estas nanoestructuras (aprox. 9.6 nm) (Cruz et al., 2016; M. Li et al., 2012; Pan et al., 2010; Zhi et al., 2019). Los espectros confirman la dependencia de la fotoluminiscencia con la longitud de onda de excitación, una característica de los puntos cuánticos de óxido de grafeno. A medida que los GODs son excitados con diferentes longitudes de onda en el rango UV-Vis, la emisión resultante muestra un máximo de desplazamiento en la emisión resultante hacia longitudes de onda más largas (Zhu et al., 2015).

Por tanto, los anteriores resultados indican que el tratamiento hidrotérmico ejerce una fuerte influencia en la formación, microestructura y propiedades ópticas de los GODs. Lo que hace que estas nanoestructuras sean versátiles y eficientes para aplicaciones en donde se desee modular la emisión óptica.

Finalmente, se evaluó la citotoxicidad de GODs por el método colorimétrico MTT (sobre cultivos primarios de células normales, células Vero) siendo el porcentaje de viabilidad celular del 98.52% (SD: 5.19%, Error: 5.27%). La citotoxicidad de los GODs fue menor al 1.48% para una concentración de 0.175 mg/ml, lo que indica que, a este nivel de concentración los GODs no presentan efecto tóxico. Esto sugiere que podrían ser candidatos prometedores para aplicaciones biomédicas.

4.3 Funcionalización y caracterización de GODs

Para llevar a cabo la funcionalización, se seleccionaron inicialmente los parámetros de síntesis óptimos, considerando las concentraciones de HRP, GODs, EDC y NHS. La elección de estos parámetros se fundamentó en reportes de la literatura, los cuales identifican estos factores como los más relevantes en la formación de sistemas de GODs. En particular, se decidió mantener constante la concentración de GODs (1 mg/ml en buffer PBS pH 7.0), EDC (10 mg/ml) y NHS (10 mg/ml), mientras se iban adicionando diferentes volúmenes de una solución de HRP. Las relaciones volumétricas (GODs:HRP) empleadas fueron 2.5:1; 5:1; 10:1; 20:1 en cuatro ensayos separados. Se adquirieron los espectros de absorción empleando la técnica de UV-Vis y los espectros de emisión para cada uno de los ensayos realizados.

Condición 1 (5:1): 500 μ l GODs+125 μ l de PBS 0,0012g EDC+0,0015 g de NHS+ 125 μ l HRP

Condición 2 (10:1): 500 μ l GODs+125 μ l de PBS, 0,0012g EDC+0,0015 g de NHS+ 62,5 μ l HRP

Condición 3 (20:1): 500 μ l GODs+125 μ l de PBS 0,0012g EDC+0,0015 g de NHS+ 31,25 μ l HRP

Condición 4 (2.5:1): 500 μ l GODs+125 μ l de PBS 0,0012g EDC+0,0015 g de NHS+ 250 μ l HRP

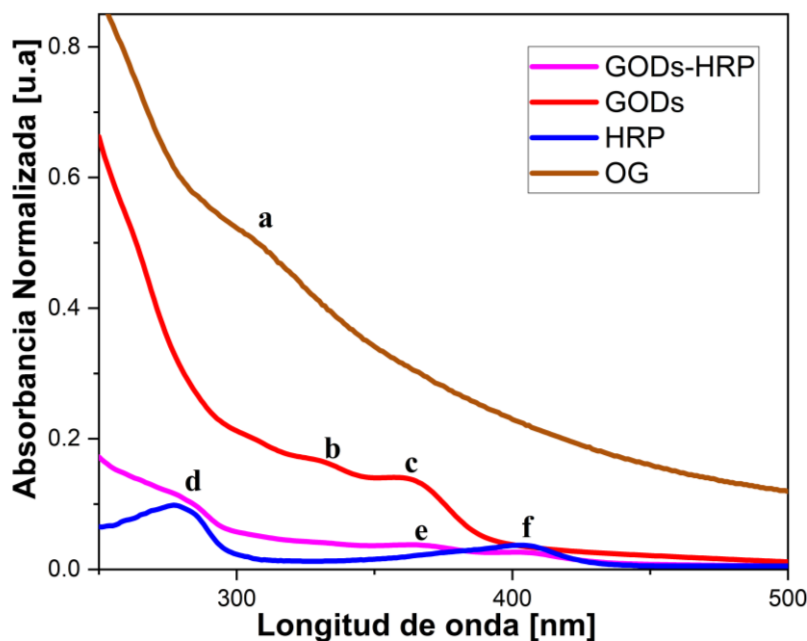
4.3.1 Análisis por Espectroscopia UV-Vis y DLS

La espectroscopia UV-Vis es una herramienta útil para monitorear los posibles cambios estructurales que ocurren sobre la estructura secundaria de la proteína HRP, lo cual puede brindar información sobre una posible desnaturalización de la enzima. Con el objetivo de investigar la interacción entre los GODs y la HRP, se tomó los espectros de los sistemas funcionalizados, acá se presentará el espectro de la condición 4 (dado que fue la condición con la mayor actividad enzimática, ver resultados en la sección de actividad enzimática).

En la Figura 23, se puede evidenciar la superposición de los espectros de absorción de la enzima HRP, GODs, OG y GODs-HRP.

Figura 23

Espectros UV-Vis de OG, GODs, HRP y GODs-HRP



La tabla 7, resume las transiciones electrónicas que se presentan para cada una de las muestras. Es importante destacar que las bandas hacia 280 nm corresponden a transiciones de los residuos aminoacídicos de las proteínas y la banda hacia 405 nm se asocia a la banda Soret, característica del grupo hemo de la HRP. Estas bandas son claramente visibles en el sistema funcionalizado GODs-HRP, en el cual no se observa un desplazamiento significativo. Esto indica que la estructura secundaria de la HRP se mantiene en presencia de las nanoestructuras, lo cual es fundamental para preservar la actividad enzimática (Lan et al., 2008; Morales-Urrea et al., 2023).

Para obtener más información de los GODs-HRP sintetizados, se realizó el análisis del tamaño hidrodinámico y se obtuvo el histograma para los GODs libres y GODs-HRP (Figura 24).

La distribución de tamaño por volumen presenta los siguientes rangos:

GODs: 3.441- 6.398(d. nm)

GODs-HRP: 11.73- 165.7 (d. nm)

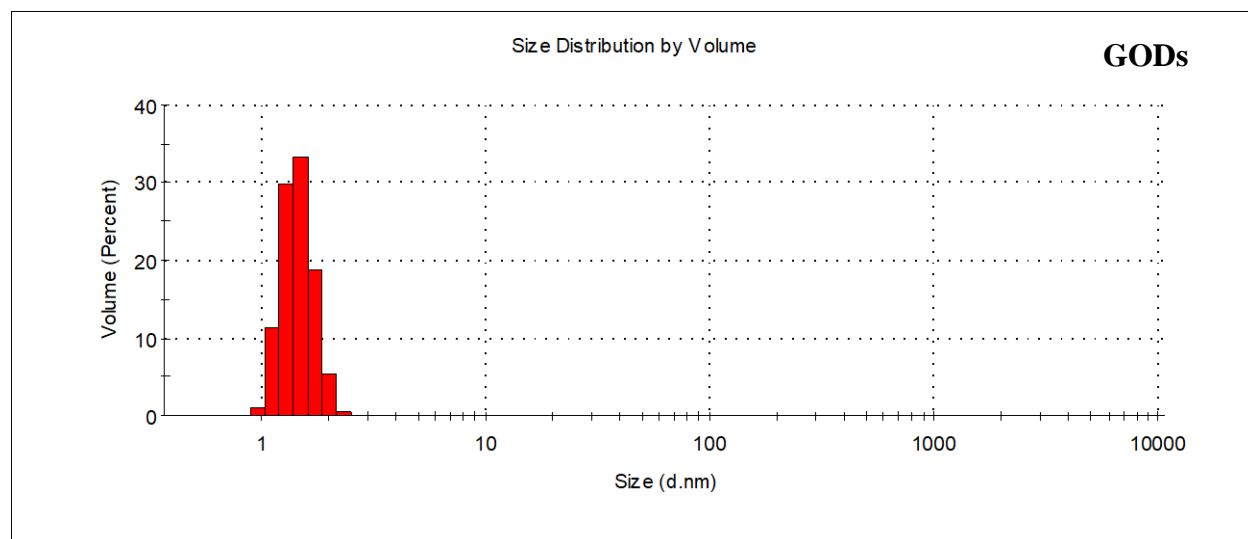
Tabla 7

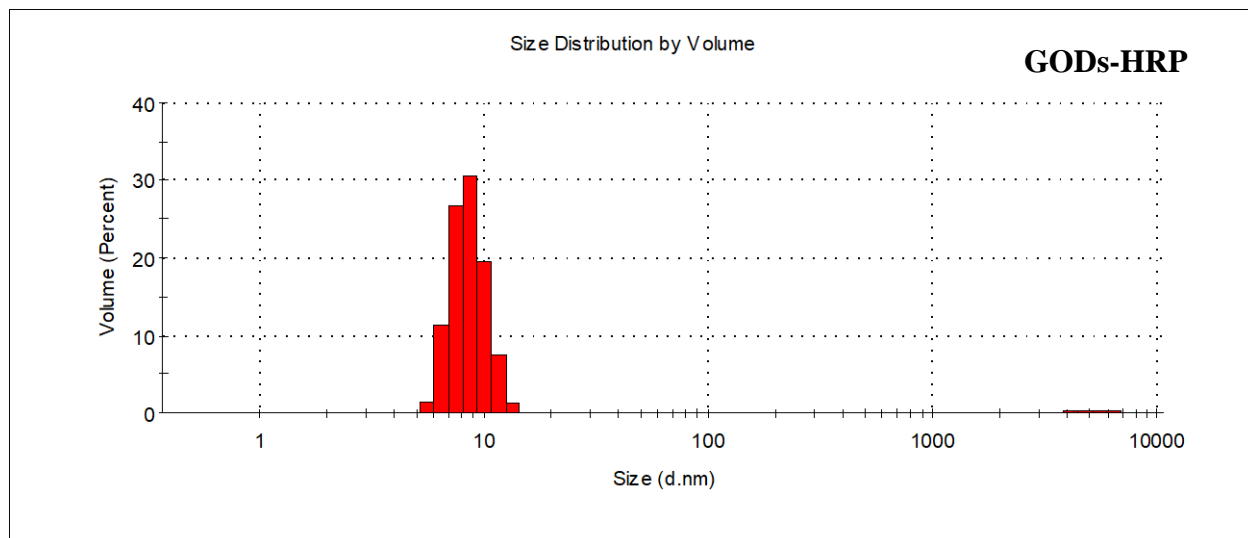
Transiciones electrónicas observadas en los espectros de absorción UV-Vis

Material	Banda	Posición (nm)	Asignación
OG	a	306	n- π^* (C=O)
GODs	b, c	332,364	n- π^* (C=O)
GODs-HRP	d	282	Tyr, Trp
	e	365	n- π^* (C=O)
	f	405	grupo hemo
	HRP	d	280
	f	405	grupo hemo

Figura 24

Histogramas de GODs y GODs-HRP.





La distribución por volumen de los GODs, es congruente con las propiedades fotoluminiscentes de estas nanoestructuras. Dado que el tamaño de estas está estrechamente relacionado con efecto de confinamiento cuántico, que ocurre cuando las dimensiones de las nanoestructuras son comparables o menores al radio de excitón de Bohr del material. Siendo este efecto el que altera las distribuciones de niveles electrónicos, resultando en transiciones ópticas dependientes del tamaño.

Para nanoestructuras de carbono como los puntos cuánticos de grafeno, tamaños inferiores a 10 nm son típicos para observar este efecto. Puede ser relevante, dado el tamaño de estos. Sin embargo, también existe la contribución en la PL relacionada con la presencia de defectos superficiales y grupos funcionales (-COOH, -C=O, -OH), que actúan como centros emisores. En comparación con la gráfica y datos de GOD-HRP, el histograma de volumen presenta múltiples tamaños en el análisis de intensidad y un pico alrededor de 10 nm. Esto podría reflejar que, aunque se detectan múltiples tamaños en el análisis por intensidad, la mayoría del material está compuesto por partículas de menor tamaño. Así mismo, demuestra la interacción entre la HRP y los GODs,

los cuales pueden formar agregados o una estructura funcionalizadas, destacando una posible funcionalización exitosa del sistema.

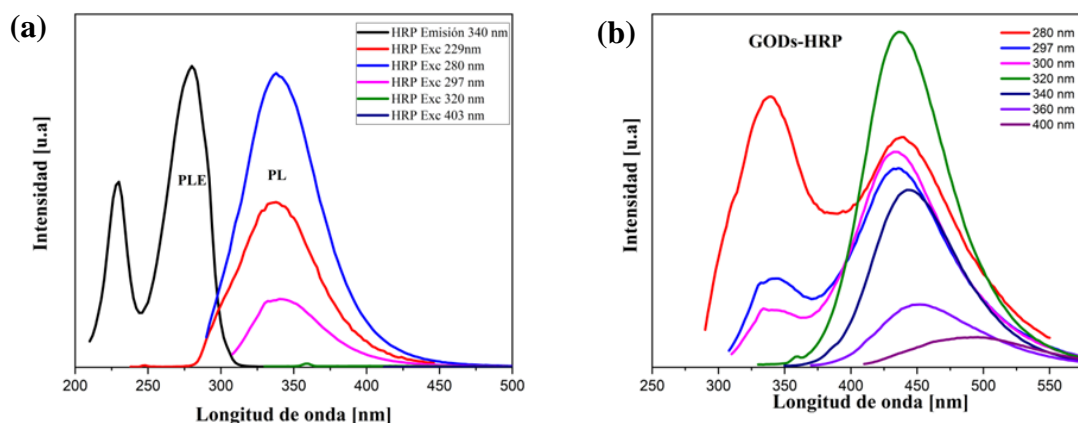
4.3.2 Espectroscopia de fluorescencia

Para el análisis preliminar, de las condiciones más adecuadas de síntesis, inicialmente se obtiene el espectro de fluorescencia de la enzima HRP (Figura 25,a) . En la cual se puede evidenciar los barridos espectrales desde 229 nm hasta 403 nm. La HRP es una enzima que contiene un grupo hemo (protoporfirina IX con un átomo de hierro central) y, además, aminoácidos aromáticos como fenilalanina, Tirosina y triptófano. Entre estos, el triptófano es el principal responsable de la fluorescencia observada alrededor de los 338 nm. De acuerdo con la literatura, su emisión suele enmascarar los efectos de la tirosina debido a procesos de transferencia de fotones (Transferencia de energía por resonancia de Förster) (Geddes & Lakowicz, 2015). La excitación a 229 nm genera una respuesta más amplia y de menor intensidad, la cual podría ser causada por la excitación conjunta de los múltiples fluoróforos presentes. Cabe destacar que, a longitudes de onda de excitación cercanas a 320 nm, la fluorescencia de la HRP es casi imperceptible, lo que evita interferencias o solapamientos con la emisión de los GODs.

Cuando los GODs son funcionalizados con la HRP, las propiedades fluorescentes de ambos materiales cambian debido a la incorporación de nuevas especies, interacciones moleculares adicionales y alteraciones en el entorno químico, en este caso se espera la formación de un enlace peptídico entre el grupo amino del residuo aminoácido lisina y el grupo carboxilo presentes en los GODs. Como se observa en la Figura 25 (b), el espectro del sistema funcionalizado revela varios cambios significativos con respecto al espectro de la HRP libre y los GODs (Figura 22).

Figura 25

Espectros de fluorescencia en estado estacionario. a) Espectro de excitación (PLE) y espectros de emisión (PL) de fluorescencia de la enzima HRP. En el interior se muestra la longitud de onda de excitación y emisión. b) Espectro de emisión (PL) del sistema funcionalizado GODs-HRP cond 4. En el interior se muestra las longitudes de onda de excitación



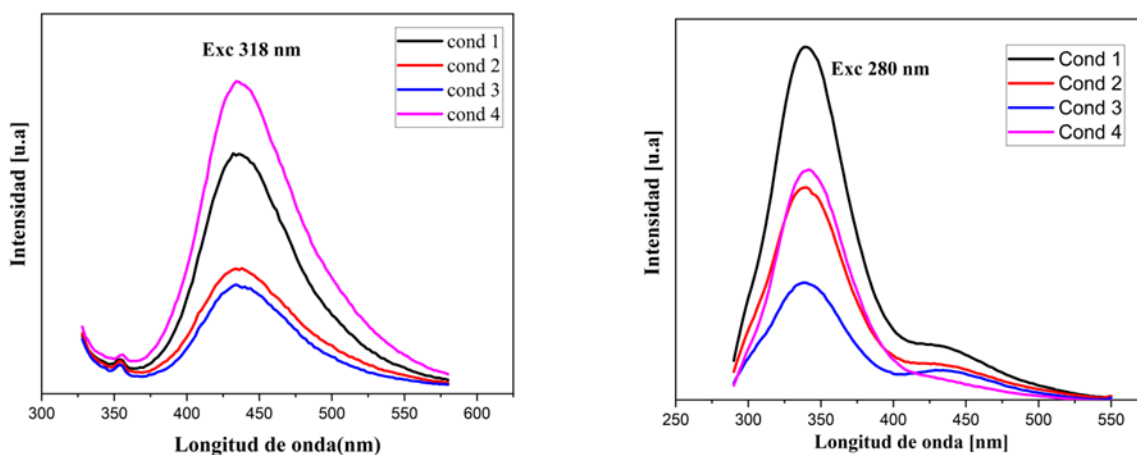
A diferencia de la HRP, en donde la emisión se concentra principalmente alrededor de 338 nm, el sistema GODs-HRP presenta dos bandas de emisión, dependiendo de la longitud de onda de excitación. La banda de mayor intensidad (λ_{exc} 320 nm) muestra un desplazamiento hacia el rojo, con una emisión prominente alrededor de los 438 nm. Este cambio sugiere que la interacción con los GODs ha alterado el ambiente espectroscópico de la HRP, introduciendo nuevas especies fluoróforas generadas por la presencia de grupos funcionales en los GODs los cuales actúan como centros de emisión e inducen procesos de transferencia de energía, confirmando así la funcionalización. Además, las propiedades ópticas de los GODs se mantienen, ya que se observa que la fotoluminiscencia sigue dependiendo de la longitud de onda de excitación. Este comportamiento, como ya se mencionó previamente, es bastante común en nanomateriales carbonáceos fluorescentes y se atribuye principalmente a defectos superficiales, la presencia de

grupos funcionales en los bordes y a los estados de emisión intrínsecos (efecto de confinamiento cuántico)(Muthurasu & Ganesh, 2014; Tetsuka et al., 2012).

Los espectros de PL para las condiciones 1 a 4, Figura 26, evidencia la banda de emisión máxima hacia 438 nm, siendo la de máxima intensidad la de la condición 4. Esta condición implica que exista más moléculas de HRP disponibles para interactuar con los GODs. Adicionalmente, podría generar más centros emisores fluorescentes debido a que hay más moléculas de la enzima disponibles para procesos FRET. Hacia relaciones volumétricas más altas, en la que existe mayor proporción de GODs en comparación con la enzima, estas nanoestructuras podrían estar “sobrecargando” el sistema e interfiriendo con la actividad de la HRP, lo cual se confirma en la siguiente sección (análisis de la actividad enzimática), reduciendo también de esta manera la emisión observada.

Figura 26

Espectros de emisión (PL) de fluorescencia de los sistemas funcionalizados GODs-HRP (condiciones 1- condición 4). En el interior se muestra la longitud de onda de excitación a 318 nm y 280 nm



4.3.3 Actividad enzimática

Para evaluar la actividad catalítica del sistema funcionalizado, se midió la actividad de la enzima libre y la actividad de los sistemas funcionalizados (GODs-HRP condición 1- condición 4). La HRP tiene una actividad específica $\sim 150 \text{ U/mg}$ con un peso molecular aproximado de 40kDa de acuerdo con las especificaciones técnicas del proveedor. De la tabla 8, correspondiente a la condición 4, se puede deducir que la HRP, en el sistema GODs-HRP, conserva más del 90% de su actividad enzimática en comparación con la condición 1 (57%), condición 2 (36%), condición 3 (35%) (Apéndice C). Lo anterior sugiere que posterior a la funcionalización el sitio activo de la enzima no es afectado de manera significativa. Esto implica que los procesos de acoplamiento químico mediante el uso de EDC y NHS no interfirieron con los residuos claves de la enzima responsables de su actividad catalítica. Por tanto, los grupos funcionales de los GODs tienen una orientación adecuada y no bloquean el acceso del sustrato al centro catalítico de la enzima HRP.

Se determinaron las constantes cinéticas de la HRP libre y del sistema funcionalizado GODs-HRP, utilizando como herramientas principales la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1) y la representación gráfica de Lineweaver-Burk (Figura 27). Estos métodos permitieron determinar y comparar las constantes cinéticas: como la afinidad de la enzima por el sustrato (K_m) y la velocidad máxima de reacción cuando todos los centros activos están ocupados por el sustrato ($V_{m\acute{a}x}$) (Tabla 8). La ecuación de Michaelis-Menten es transferida a la siguiente forma:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{m\acute{a}x}} \quad (9)$$

Dónde v , es la velocidad de la reacción, $[S]$ es la concentración de sustrato. K_m se determinó mediante el análisis de la pendiente y el intercepto de las Figuras 27.

Figura 27

Gráficas de Lineweaver-Burk de la HRP libre y del sistema GODs-HRP

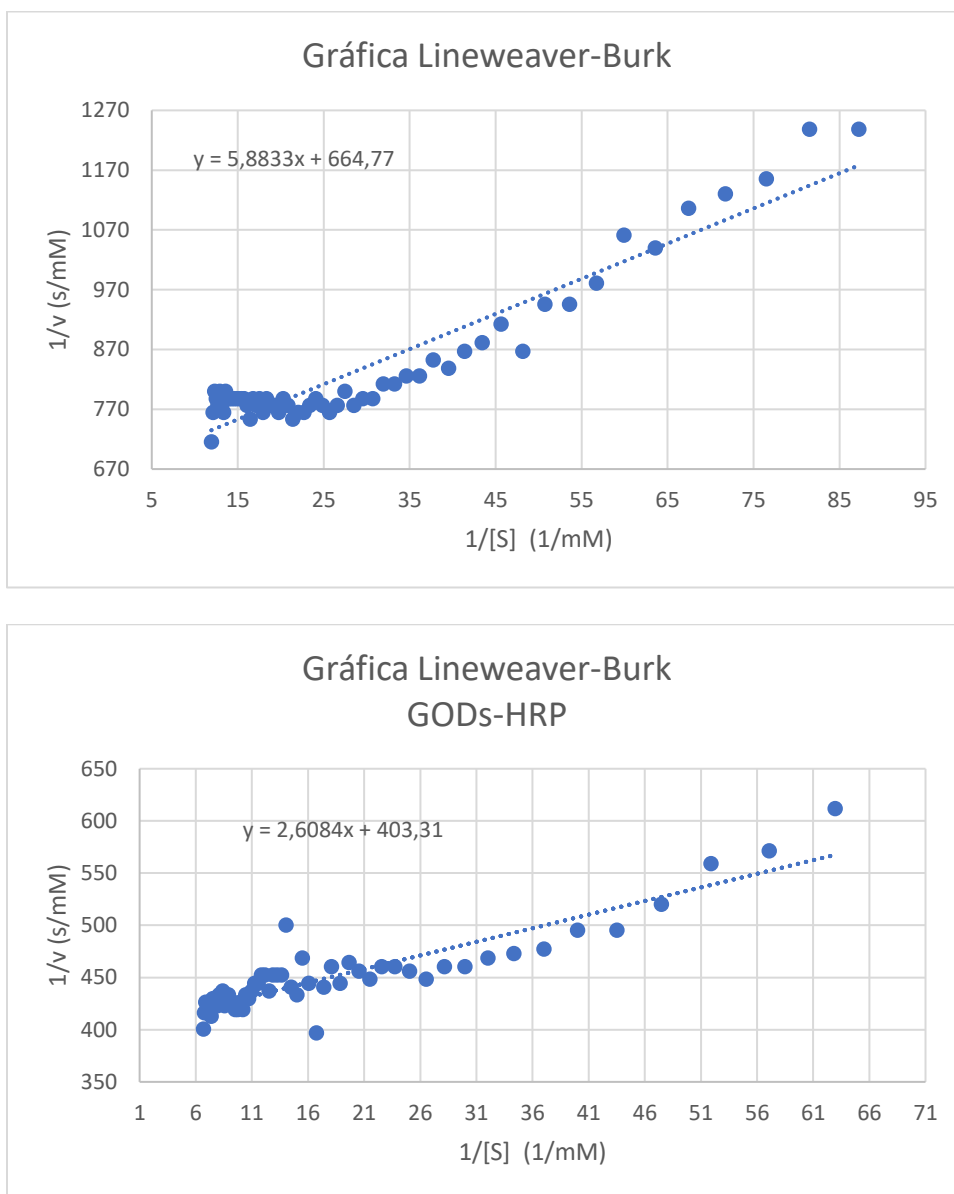


Tabla 8*Constantes cinéticas y actividad específica de la HRP Y GODs-HRP*

Catalizador	V_{máx.} (mM/s)	K_m(mM)	U/mg
HRP	0.00150428	0.008850129	189.2
			181.0
			192,1
			Prom: 187.4
			SD: 5.8
GODs-HRP	0.002479482	0.006467482	168.8
			169.5
			181.6
			Prom: 173.3
			SD: 7.2

En la tabla 8, se observa que al funcionalizar los GODs con la HRP, el valor de k_m disminuye en comparación con la HRP libre. Esto sugiere que el sistema funcionalizado presenta una mayor afinidad por el sustrato en relación con la enzima libre. Este comportamiento podría deberse a que el acoplamiento peptídico entre la HRP y los GODs mejora la interacción enzima-sustrato, aumentando la eficiencia catalítica a bajas concentraciones de sustrato. Por lo tanto, este sistema funcionalizado podría tener aplicaciones prometedoras como biosensor para la detección de compuestos de interés.

4.3.4 Difracción de Rayos X (DRX)

La dimensión de los cristales del OG y sus derivados en la dirección del eje c (L_c o L_{002}) y el espaciado interlaminar (d_{002}), son parámetros que pueden determinarse experimentalmente mediante DRX. Estos valores son fundamentales para caracterizar adecuadamente algunas propiedades estructurales del material, ya que proporcionan información sobre la organización cristalina y la disposición de las capas en la estructura del OG, GODs y GODs-HRP.

Empleando las ecuaciones de Bragg (ecuación 10) y Scherrer (ecuación 11) se determinó la distancia interlaminar (d_{002}) y el espesor promedio de los cristales (L_c), respectivamente. Esta información estructural se encuentra condensada en la tabla 9.

Ley de Bragg

$$n\lambda = 2d_{(hkl)}\text{sen}\theta \quad (10)$$

En donde, $d_{(hkl)}$ representa la distancia interplanar en Å entre los planos cristalográficos (hkl), n es un número entero que indica el orden difracción, θ es el ángulo entre el haz incidente de rayos X y el plano atómico de la red cristalina, hkl son los índices de Miller que describen la orientación espacial de un plano en el cristal, y λ es la longitud de onda de la radiación utilizada en el experimento (Martínez et al., 2003).

Ecuación de Scherrer

$$L_{(hkl)} = \frac{k\lambda}{\beta_{(hkl)}} \cos\theta \quad (11)$$

En donde $L_{(hkl)}$ representa el tamaño promedio de los cristalitas medido perpendicularmente a la familia de planos (hkl), β (ó FWHM) corresponde a la anchura del pico a la mitad de su altura, θ el ángulo de máxima intensidad del pico expresado en radianes, y k es la constante de Scherrer la cual depende de la forma del cristallito y de cómo se definen β y $L_{(hkl)}$. Para los materiales con una estructura gráfica, $k \cong 0.9$ (Martínez et al., 2003).

De acuerdo con la tabla 9, para el OG, el valor de d_{002} del OG es mayor que el de GODs esto se debe a la presencia de grupos funcionales oxigenados, que se intercalan entre las capas gráficas. Para los GODs hay una reducción en el valor de d_{002} , sugiriendo que el proceso

hidrotérmico elimina parcialmente los grupos oxigenados y disminuye la distancia interlaminar (Gascho et al., 2019). En cuanto al sistema funcionalizado GODs-HRP, la distancia interlaminar es ligeramente mayor que los GODs. Esta leve ampliación podría atribuirse a la presencia de la enzima sobre la superficie o entre las láminas de los GODs.

Tabla 9

Información estructural de los difractogramas de OG, GODs, GODs-HRP and HRP

Material	Reflexión 002 (2 θ) [°]	FWHM (β_{002}) [rad]	d_{002} [Å]	Lc [Å]	No de láminas
OG	10,246	$2,0958 \times 10^{-2}$	8,63301	66,158	8
GODs	12,879	$5,0442 \times 10^{-2}$	6,86805	27,49	4
GODs-HRP	12,719	$2,3099 \times 10^{-2}$	6,95419	60,026	9

En el difractograma, Figura 28, el pico de difracción 002 desplazado hacia valores menores ($2\theta=10$) corresponde a la estructura característica reportada en la literatura para el OG (Gascho et al., 2019; Storm et al., 2016). Cabe destacar que la intensidad de este pico disminuye para sus derivados GODs y GODS-HRP, lo que sugiere cambios en su estructura cristalina.

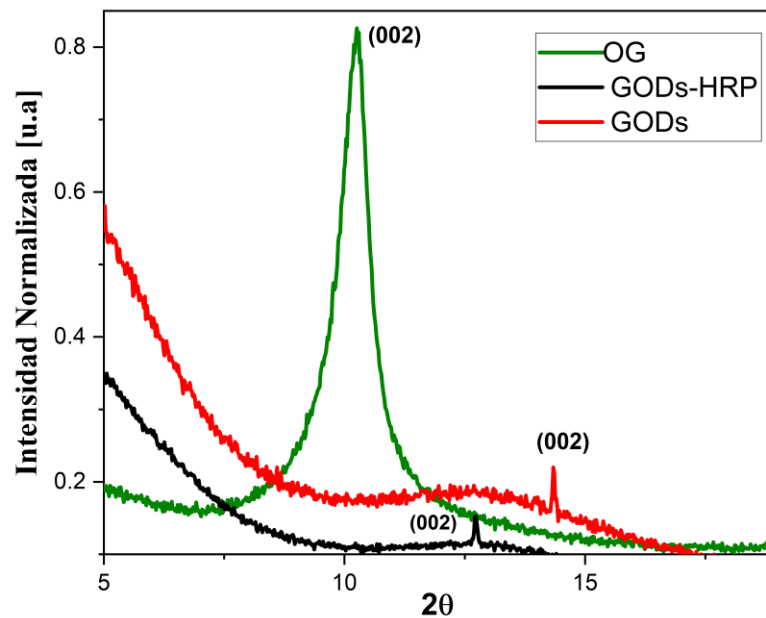
Por otro lado, el valor de FWHM está relacionado con el grado de desorden estructural y el tamaño de los dominios cristalinos. Para el OG se observa un valor menor lo que indica una estructura más ordenada en comparación con los GODs, lo cual podría reflejar la pérdida de cristalinidad del OG (producto de someterlo al tratamiento hidrotérmico). En el sistema GODs-HRP, el valor de FWHM, disminuye nuevamente, lo que podría sugerir que la funcionalización estabiliza parcialmente las estructuras, posiblemente reduciendo los efectos generados por el tratamiento hidrotérmico.

Al comparar los valores de Lc o el número de láminas del OG con el resto de los materiales, se puede concluir que el tratamiento hidrotérmico produjo la fragmentación de los cristales,

reduciendo su espesor ($\sim 58\%$) e incrementando su área superficial efectiva. La reducción del tamaño de partícula es consistente con los resultados obtenidos mediante DLS para las nanoestructuras. En cuanto al aumento en el número de láminas observado en el sistema GODs-HRP, este efecto podría atribuirse a una reorganización estructural inducida por la HRP, posiblemente debido a interacciones electrostáticas o enlace peptídico entre los GODs y la HRP. Estas interacciones podrían favorecer un mayor apilamiento de las láminas, modificando la morfología del material.

Figura 28

Difractogramas del OG, GODs y GODs-HRP



4.3.5 Espectroscopía Infrarroja-ATR

Durante el proceso de oxidación del grafito se introducen grupos funcionales que contienen oxígeno (ácidos carboxílicos, epóxidos, hidroxilos) en los bordes y sobre el plano basal, cómo se observa en la Figura 29 del espectro Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para los materiales.

Figura 29

Espectros IR del OG, GODs y GODs-HRP

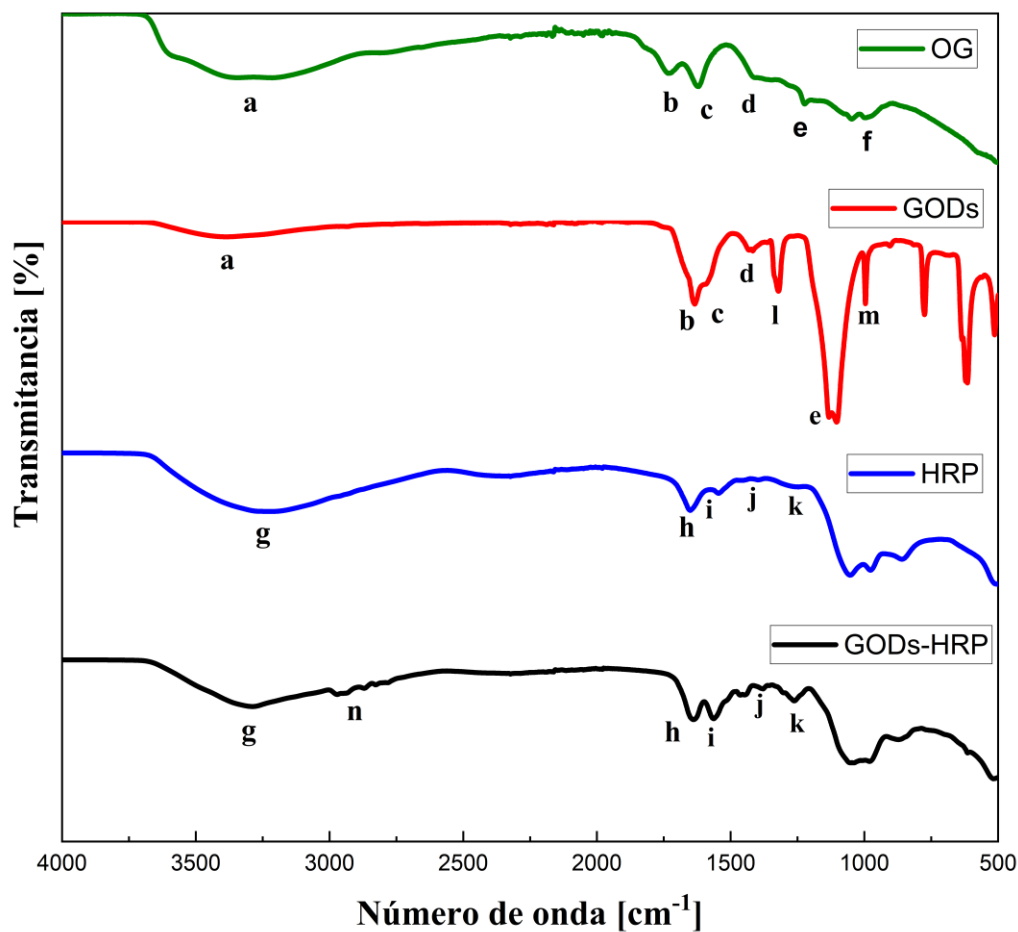


Tabla 10

Identificación de las bandas de absorción del OG, GODs, GODs-HRP en el Infrarrojo

Banda	Posición (cm ⁻¹) OG	Posición (cm ⁻¹) GODs	Posición (cm ⁻¹) HRP	Posición (cm ⁻¹) GODs-HRP	Modo vibracional
a	3283	3417	-	-	-OH tensión
b	1731	1630	-	-	C=O tensión
c	1623	1587	-	-	C=C tensión anillo
d	1414	1421	-	-	-OH flexión (ácidos)
e	1224	1131	-	-	C-O-C tensión asimétrica (epóxidos) y tensión C-O de ácidos
f	1070	-	-	-	C-O-C tensión simétrica
g	-	-	3232	3281	-N-H tensión
h	-	-	1652	1638	C=O amida I tensión y C=C tensión anillo
i	-	-	1544	1563	-N-H amida II flexión
j	-	-	1395	1382	C-N tensión
k	-	-	1260	1255	N-H flexión y C-N tensión
l	-	1321	-	-	C-C-O tensión(alcohol)
m	-	995	-	-	-C-H flexión fuera del plano
n	-	-	-	2867 2932	-C-H tensión

En la tabla 10, se resume la identificación de las bandas de absorción en el espectro infrarrojo del OG, GODs y GODs-HRP. El análisis para el OG, de la Figura 29, reveló que el producto obtenido presenta los grupos funcionales característicos que se han propuesto en la literatura (Krishnamoorthy et al., 2013). Cabe destacar que el modo vibracional a 3283 cm⁻¹ el cual corresponde a la vibración de tensión del grupo hidroxilo (-OH) de ácidos carboxílicos, tras el tratamiento hidrotérmico y obtención de GODs disminuye su intensidad (3417 cm⁻¹) lo que indica una reducción parcial de los grupos oxigenados (Ajala et al., 2022; Kapral & Ciccotti, 2005; J. Li et al., 2018). La vibración C=C (1623 cm⁻¹), en el espectro de OG, corresponde a los dominios conjugados, remanentes de la estructura original del grafito. Dicha vibración se conserva y

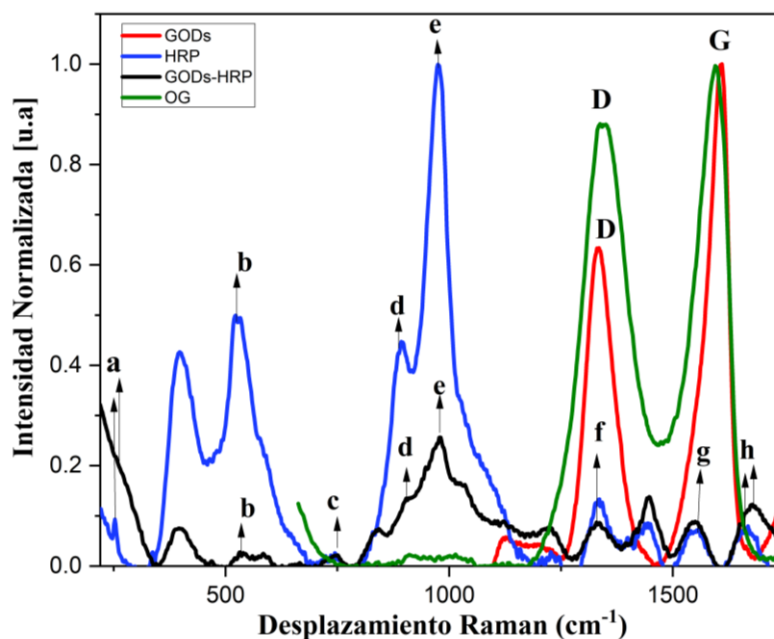
desplaza en el espectro de los GODs (1587 cm^{-1}). La desaparición de la banda hacia 1070 cm^{-1} , en el espectro de GODs, confirma la eliminación parcial de grupos oxigenados (Facure et al., 2022; Kondyurin et al., 2012; Ventrella et al., 2020; J. Wang et al., 2004).

La banda vibracional de amida I (1638 cm^{-1}) y amida II (1563 cm^{-1}) en GODs-HRP son clara evidencia de la conjugación con HRP, confirmando la formación de enlace peptídico. Las nuevas bandas -CH alifáticas ($2867\text{-}2932\text{ cm}^{-1}$) también reflejan la incorporación de la proteína. La vibración hacia 1638 cm^{-1} asociadas también a C=C aromático y C-O-C (1131 cm^{-1}) la cual puede estar solapada por las bandas de la enzima, persisten en los GODs-HRP lo que sugiere que los GODs retienen su estructura y funcionalidad tras la funcionalización (J. Li et al., 2018; Moyo, 2014; Muthurasu & Ganesh, 2014; Tetsuka et al., 2012).

4.3.6 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman ha sido una herramienta útil y confiable en la caracterización de materiales carbonáceos a partir de la observación en el desplazamiento de las bandas vibracionales de los grupos funcionales presentes. A continuación, se presentan los espectros y la identificación de los modos vibracionales observados en el análisis Raman de OG, GODs y GODs-HRP.

El espectro Raman de OG (Figura 30) muestra la banda G a 1595 cm^{-1} , asociadas a las vibraciones en el plano de los átomos de carbono sp^2 , y la banda D a 1343 cm^{-1} , que se relaciona con la presencia de átomos de carbono con hibridación sp^3 y a la presencia de defectos estructurales. Para el OG la banda D es más ancha en comparación con la observada en los GODs, lo cual refleja el carácter amorfo del OG. Este carácter amorfo, se debe a la presencia de ciertas fracciones de carbono sp^3 tanto sobre el plano basal como en los bordes de las láminas de OG, donde suelen ubicarse grupos funcionales que contienen oxígeno (Kudin et al., 2008).

Figura 30*Espectros Raman del OG, GODs y GODs-HRP*

Las intensidades (I_D/I_G) de estas bandas características se usan para correlacionar las propiedades estructurales los GODs. Este índice es comúnmente utilizado para cuantificar la cantidad de defectos presentes en la estructura. En general, la intensidad relativa de la banda D disminuye cuando los grupos funcionales oxigenados son removidos y la estructura gráfica es restaurada, lo que se observó para los GODs.

El desplazamiento de la banda G en los GODs, puede atribuirse a la transferencia de carga o a la tensión en la lámina. En el caso del OG, la presencia de grupos funcionales oxigenados interrumpe la conjugación electrónica de la estructura, confinando los electrones que normalmente estarían deslocalizados por toda la hoja del grafeno. Este confinamiento, altera las propiedades electrónicas del material. Cuando se realiza el tratamiento hidrotérmico se obtiene GODs y además de la eliminación parcial de los grupos funcionales oxigenados también se ha reportado una

disminución en el tamaño de las láminas (Khan et al., 2021), causando que la banda G se desplace a números de onda mayores, debido a la mayor deslocalización de los electrones en los dobles enlaces conjugados, indicando que la conjugación ha sido restaurada parcialmente (Khan et al., 2021). Este resultado es consistente con los hallazgos obtenidos por espectroscopia IR.

Para el sistema funcionalizado GODs-HRP, la espectroscopia Raman nos da información sobre la estructura general de estos compuestos, a través del análisis de las vibraciones características de los enlaces químicos dentro de la estructura principal de las proteínas, específicamente del enlace peptídico que conecta los aminoácidos. La mayoría de las bandas características están asociadas con el grupo CONH, el cual es denominado como Amida A (tensión NH, cercano a 3500 cm^{-1}), amida B (tensión NH, cercanas a 3100 cm^{-1}) y amida I a VII (I: $1600-1690\text{ cm}^{-1}$, II: $1480-1580\text{ cm}^{-1}$, III: $1230-1300\text{ cm}^{-1}$, IV: $625-770\text{ cm}^{-1}$, V: $640-800\text{ cm}^{-1}$, VI: $540-600\text{ cm}^{-1}$, VII: $\sim 200\text{ cm}^{-1}$).

Para GODs-HRP cabe destacar que se observan en la tabla 11, las bandas amida I, IV-VII. La banda I es debida a la tensión del enlace C=O y su posición (entre $1662-1655\text{ cm}^{-1}$) confirma que se conserva, luego de su funcionalización, la estructura secundaria, α -hélice, de la enzima HRP. Amida IV: flexión OCN, amida V: flexión fuera del plano de NH, amida VI: flexión fuera del plano de C=O, amida VII: modo de la estructura esquelética del polipéptido (Rygula et al., 2013). Las bandas D y G, presentes en las nanoestructuras se mantienen, aunque con menor intensidad. Estas podrían estar superpuestas a las señales características del grupo hemo (porfirina de hierro, capaz de adoptar diferentes estados de oxidación) localizado en el sitio activo de la enzima. Además, los desplazamientos en las bandas sugieren la posible formación de nuevas interacciones químicas derivadas de la funcionalización (Kitagawa & Hirota, 2006).

Tabla 11

Identificación de los modos vibracionales observados en el análisis Raman de OG, GODs, GODs-HRP

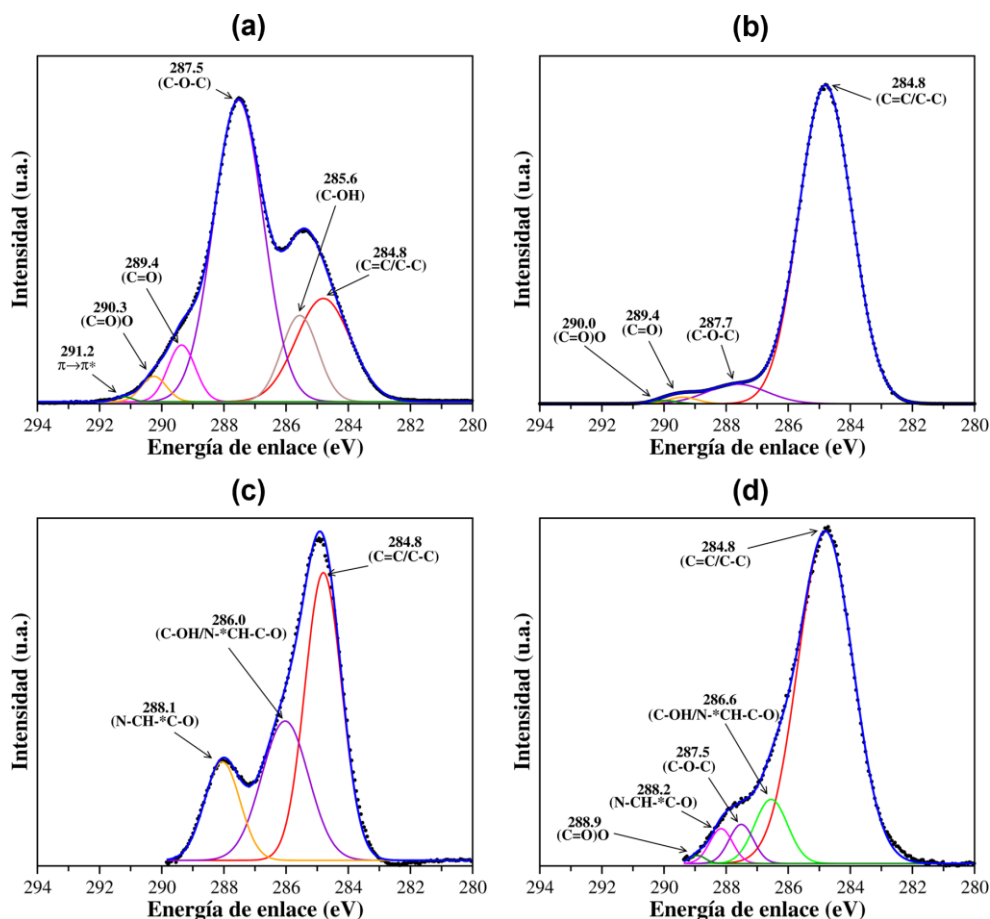
Banda	Posición (cm⁻¹) OG	Posición (cm⁻¹) GODs	Posición (cm⁻¹) HRP	Posición (cm⁻¹) GODs-HRP	Asignación más probable
D	1343	1333	-	-	Defectos estructurales
G	1595	1608	-	-	Modo E _{2g}
I_D/I_G	1,305	0,754	-	-	-
A	-	-	253	270	Amida VII
B	-	-	525	538	Amida VI
c	-	-	742	742	Amida IV
d	-	-	895	898	Amida V
e	-	-	975	979	γ ₄₅
f	-	-	1335	1333	Banda D, γ ₄ (Fe ²⁺)
g	-	-	1550	1545	Banda G, γ ₁₉
H	-	-	1662	1666	Amida I, γ ₁₀ (Fe ²⁺)

4.3.7 Espectroscopía XPS

En la Figura 31 se muestran los espectros XPS de la banda C1s para cada una de las especies moleculares que se usaron con la finalidad de obtener el sistema funcionalizado GOD-HRP. Una primera inspección permitió observar diferencias significativas de las bandas C1s sugiriendo las modificaciones estructurales al cual fue sometido el material carbonáceo. En la Figura 31(a), la deconvolución C1s se identificaron 6 bandas; las cuales según valores fueron atribuidos a los grupos funcionales C=C/C-C (284.8 eV), C-OH (285.6 eV), C-O-C (287.5 eV), C=O (289.4 eV), C(=O)O (290.3 eV) y π-π (291.2 eV) (Anwar et al., 2022; Ossnon & Bélanger, 2017; G. Wei et al., 2016).

Figura 31

Banda C1s de los espectros XPS de OG, GODs, HRP libre y de la funcionalización GODs-HRP. Las bandas con colores diferentes al azul representan las deconvoluciones. (a) OG; (b) GODs; (c) HRP libre; (d) GODs-HRP



Otro aspecto importante radica en el hecho que la banda C-O-C es significativamente más intensa que C=C/C-C con una relación de áreas de aproximadamente 2.7; mientras que las relaciones de las áreas de las bandas C=C/C-OH, C=C/C=O y C=C/C(=O)O son 1.8, 3.61 y 63.84. Es decir, que el OG obtenido en el paso intermedio exhibe un alto grado de oxidación rico en grupos C-O-C, con una presencia significativa de grupos C-OH y C=O (posiblemente ubicados en

la superficie del material carbonáceo) y la presencia de grupos carboxilos posiblemente ubicados en el borde de la lámina.

Una vez se realizó la reducción del OG, mediante síntesis hidrotérmica asistida por microondas, se obtuvo el espectro XPS del producto resultante. En este sentido, el resultado de la C1s se presenta en la Figura 31 (b) donde se observó una diferencia significativa con respecto a la banda C1s del OG. Luego de la deconvolución se identificaron 4 bandas que corresponden a los grupos C=C/C-C (284.8 eV), C-O-C (287.7 eV), C=O (289.4 eV) y C(=O)O (290.eV). Estos resultados comparados con OG evidenciaron claramente la desaparición de la banda C-OH; aunque posiblemente se encuentre solapada con la banda de los grupos C=C/C-C. Además, la primera diferencia significativa de estos resultados radica en que la banda en 284.8 eV es la más intensa. Al calcular las relaciones de área entre la banda de los grupos funcionales C=C/C-H con los grupos oxigenados se obtienen los valores de 14 (C=C;C-H/C-O-C), 88 (C=C;C-H/C=O) y 208 (C=C;C-H/C(=O)O). Por tanto, a partir de la banda C1s luego de la etapa de reducción química del OG, gran parte de los grupos oxigenados fueron removidos y se obtuvieron láminas de óxido de grafeno con un alto grado de reducción. Estos resultados coinciden con los resultados de fluorescencia y IR y Raman descritos anteriormente.

Luego de la reducción del OG y su posterior funcionalización con la HRP (GODs-HRP) se procedió a obtener el espectro XPS para este producto y se analizó la banda C1s, cuyo resultado se muestra en la Figura 31 (d). A su vez, se presenta el resultado de la banda C1s de la HRP libre para identificar posibles cambios. En este sentido, la deconvolución de la banda C1s para la HRP libre exhibe 3 bandas cuyos valores de energía fueron atribuidos a los grupos funcionales C=C/C-C (284.8 eV) que es la más intensa, C-OH/N-*CH-C-O (286.0 eV) y N-CH-*C-O (288.1 eV). Estos resultados se encuentran en acuerdo con aquellos reportado en la literatura ([Curulli et](#)

al., 2006). Para el caso de la funcionalización de GODs, la deconvolución de la banda C1s exhibe 5 bandas cuyos valores fueron asignados a los grupos funcionales C=C/C-C (284.8 eV), C-OH/N-*CH-C-O (286.6 eV), C-O-C (287.5 eV), N-CH-*C-O (288.2 eV) y C(=O)O (288.9 eV). Tanto los resultados de la HRP libre como del sistema GODs-HRP permitieron establecer que la HRP y el GODs se funcionalizaron exitosamente. Esto también se evidenció con los resultados obtenidos de DRX, IR y Raman.

4.4 Resultados computacionales

En este apartado se presentan los resultados obtenidos de las simulaciones MD para cada uno de los sistemas descritos en la sección "3.2 Simulaciones computacionales". Inicialmente se presentan los resultados de la validación de los parámetros FF para el grupo Hemo (que hace parte del complejo proteico de la HRP), seguido del complejo HRP y por último la validación de los parámetros FF de la lámina de GODs.

Posteriormente se presentan y discuten los resultados MD para la funcionalización GODs-HRP a partir de cálculos de propiedades como RMSD, R_G y RMSF para cada unidad molecular (aminoácidos de la HRP, grupo Hemo y el GODs) que forman dicho compuesto. Finalmente se presentan y analizan los resultados de los cálculos de energía libre de Gibbs (MM-GBSA) de todas las configuraciones del compuesto para identificar cual es el termodinámicamente más favorable, seguido de los resultados de los cálculos de acoplamiento molecular para explorar la conservación del sitio activo de la enzima HRP luego de la formación del complejo GODs-HRP-fenol.

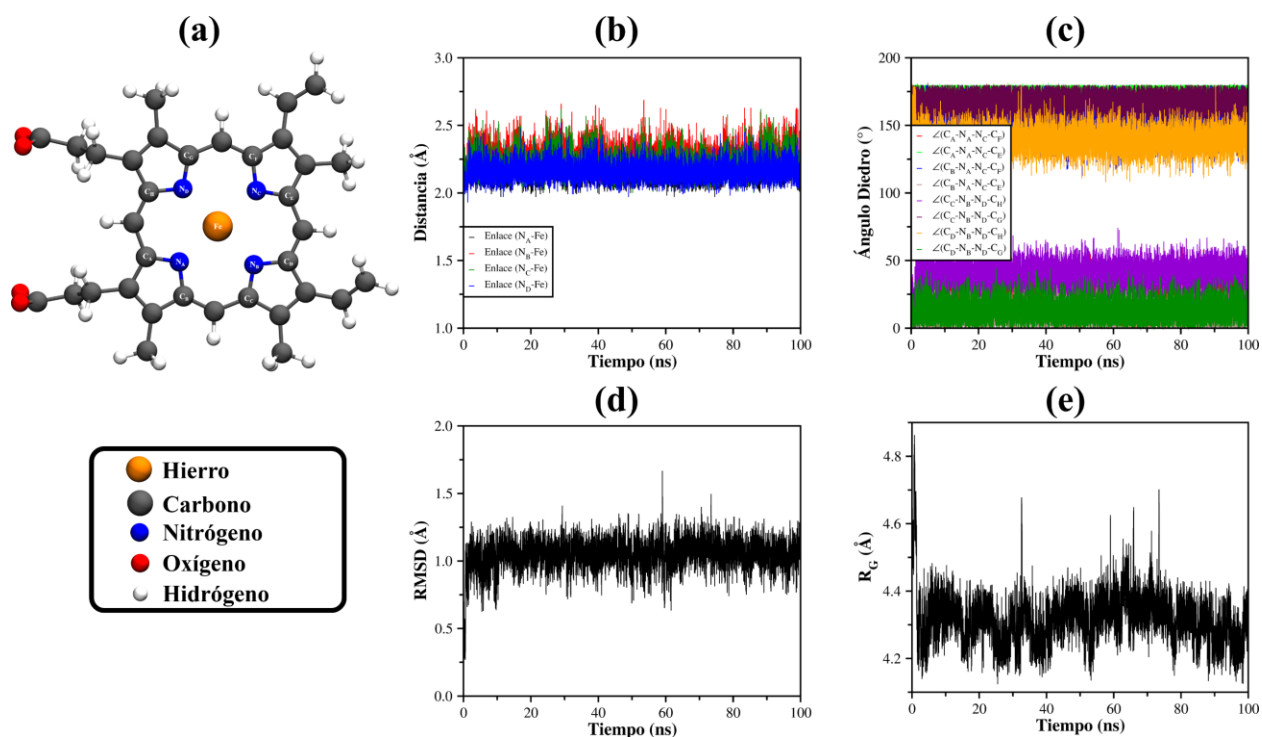
4.4.1 Validación de los parámetros FF

Los resultados de la validación de los parámetros de campo de fuerza para la subunidad Hemo en fase condensada se muestran en la Figura 32.

Figura 32

Parámetros geométricos y estructurales para la validación de la topología FF del grupo Hemo.

(a) Estructura tridimensional; (b) distancias de enlace N-Fe; (c) Ángulos diedros C-N-N-C; (d) RMSD; (e) radio de giro (R_G)



Para ello, únicamente se tuvieron en cuenta cuatro parámetros geométricos internos y fueron calculados a partir de los resultados de dinámica molecular. En la Figura 32(b) se muestran las distancias entre los átomos de nitrógeno (denominados N_A , N_B , N_C y N_D) que conforman los anillos pirroles con el átomo central de hierro (Fe), ver Figura 32(a), cuyos resultados exhiben un comportamiento estable a lo largo del tiempo de muestreo. La distancia promedio para los pares

N_A -Fe, N_B -Fe, N_C -Fe y N_D -Fe son de 2.163 Å, 2.260 Å, 2.216 Å y 2.161 Å respectivamente; con desviaciones estándar de ± 0.07 Å, ± 0.09 Å, ± 0.08 Å y ± 0.06 Å; demostrando que los parámetros de campos de fuerza usados para este sistema garantizan que el átomo central de Fe se mantiene en el centro del anillo del fragmento Hemo.

Por otra parte, se calculó el segundo parámetro geométrico interno que consistió en los ángulos diedros formados por los átomos de carbono y nitrógeno de la periferia interna de los anillos pirroles; donde los resultados se muestran en la Figura 32(c). Este parámetro permitió analizar la conservación de la planaridad del grupo Hemo a lo largo de las simulaciones MD. Un total de ocho ángulos diedros fueron calculados. Los resultados del ángulo diedro para el grupo de los átomos $\angle(C_A-N_A-N_C-C_F)$ exhibe un valor promedio de $22.7^\circ \pm 10.5^\circ$; para el ángulo diedro $\angle(C_A-N_A-N_C-C_E)$ un valor promedio de $172.8^\circ \pm 5.4^\circ$; el ángulo diedro $\angle(C_B-N_A-N_C-C_F)$ un valor promedio de $151.6^\circ \pm 11^\circ$; el ángulo diedro $\angle(C_B-N_A-N_C-C_E)$ un valor promedio de $10.3^\circ \pm 7.6^\circ$; el ángulo diedro $\angle(C_C-N_B-N_D-C_H)$ un valor promedio de $40.8^\circ \pm 8.9^\circ$; el ángulo diedro $\angle(C_C-N_B-N_D-C_G)$ un valor promedio de $167.5^\circ \pm 6.9^\circ$; el ángulo diedro $\angle(C_D-N_B-N_D-C_H)$ un valor promedio de $139.8^\circ \pm 9.4^\circ$; y el ángulo diedro $\angle(C_D-N_B-N_D-C_G)$ un valor promedio de $13.3^\circ \pm 8.3^\circ$.

Estos resultados igualmente muestran que se conservan la planaridad del anillo del grupo Hemo a lo largo de las simulaciones MD. Aunque sus fluctuaciones en algunos casos son significativas debido a efectos intramoleculares distales, no se observó deformación total de la estructura del grupo Hemo.

Lo anterior se evidenció con el cálculo del RMSD y el R_G . El parámetro RMSD mide que tanto se desvía una estructura molecular a partir de una estructura de referencia a lo largo del tiempo de muestreo y se calcula mediante la ecuación:

$$RMSD(t) = \left[\frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \|\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)\|^2 \right]^{1/2} \quad (12)$$

donde N es la cantidad de átomos, $\mathbf{r}_i(t)$ es la posición de i -ésimo átomo en el tiempo de muestro t , $\mathbf{r}_i(0)$ es la posición del mismo i -ésimo átomo de referencia. Si bien las simulaciones MD presentan movimientos rotacionales y traslacionales; estas contribuciones fueron removidas y únicamente se calculó el RMSD superponiendo las coordenadas de los átomos pesados del grupo Hemo con las coordenadas atómicas de referencia ($t = 0$ ns) de la etapa de producción MD, mediante ajuste por mínimos cuadrados.

Como se observa en la Figura 13(d), El RMSD del grupo Hemo a lo largo del tiempo de muestreo presenta un aumento rápido en los primeros 600 ps de simulación MD alcanzando un valor de aproximadamente 1 Å con ligeras variaciones que se mantiene durante los 100 ns de simulación MD. En este sentido, el valor promedio de RMSD es de 1.045 Å con una desviación estándar de 0.11 Å. Algunas fluctuaciones por encima de 1.5 Å se observaron a los tiempos $t = 59$ ns y $t = 73.6$ ns. Sin embargo, el RMSD muestra que la estructura molecular de toda la molécula Hemo es estable.

El último parámetro geométrico usado para determinar la factibilidad de la topología FF para el grupo Hemo fue el R_G que permite medir el grado de compactación de un sistema molecular. Es decir, el R_G permitió explorar posibles cambios conformacionales en un sistema molecular y se calcula a partir de la ecuación:

$$R_G(t) = \left(\frac{\sum_{i=1}^N \|\mathbf{r}_i(t)\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (13)$$

donde $\mathbf{r}_i(t)$ es la distancia el i -ésimo átomo con respecto al centro de masa en el tiempo de simulación t de la molécula y m_i es su respectiva masa. Los resultados de R_G se presentan en la

Figura 32(e) y su valor promedio es de 4.31 Å con una desviación estándar de ± 0.07 Å. Adicionalmente, se observa algunas fluctuaciones en su valor y corresponden al inicio de las simulaciones MD (alrededor de 1.5 ns); así como también a los tiempos $t = 32.7$ ns, $t = 59$ ns, $t = 66$ ns y $t = 74$ ns. Tanto el RMSD como el R_G demuestran que la topología FF usada para simular el fragmento Hemo fue satisfactoria; aun cuando se observaron algunas fluctuaciones de estos.

Lo anterior debido los enlaces rotables de los fragmentos vinilo (-CH=CH₂) y propionatos que hacen parte de la subestructura del grupo Hemo. Sin embargo, cabe destacar que en estas simulaciones se usó la molécula Hemo libre sumergida en una caja con moléculas del solvente y no se consideró los posibles efectos al encontrarse internado en la proteína HRP.

Una vez evaluada la calidad de la topología FF para el grupo Hemo libre, se procedió a realizar un análisis similar para la molécula HRP. En este sentido, para el grupo Hemo dentro de la proteína HRP se calcularon los mismos parámetros geométricos, descritos anteriormente; así como también la distancia entre el átomo de nitrógeno del residuo de histidina 170 (HIS170) y el átomo de hierro del grupo Hemo. Adicionalmente se calculó el RMSD y R_G para la unidad proteica de la HRP usando átomos pesados y por último se calculó el RMSF tanto de los átomos backbone como de los átomos pesados de la unidad proteica de la HRP, a partir de las coordenadas atómicas obtenidas de las simulaciones de MD. Cabe resaltar que para los parámetros RMSD y RMSF se usaron las coordenadas atómicas nativas (PDB ID: 1HCH) como valores de referencia.

Brevemente, para el grupo Hemo en el complejo proteico, las distancia promedio para los pares N_A-Fe, N_B-Fe, N_C-Fe, N_D-Fe y N_{HIS170}-Fe son 2.147 Å, 2.152 Å, 2.086 Å, 2.114 Å y 2.191 Å respectivamente con desviaciones estándar de ± 0.05 Å, ± 0.05 Å, ± 0.04 Å, ± 0.05 Å y ± 0.09 Å respectivamente (ver Figura 33(b)). Estos resultados están en buen acuerdo si se comparan con sus valores extraídos de la estructura nativa y cuyos valores son 2.086 Å, 2.102 Å, 2.103 Å, 2.05

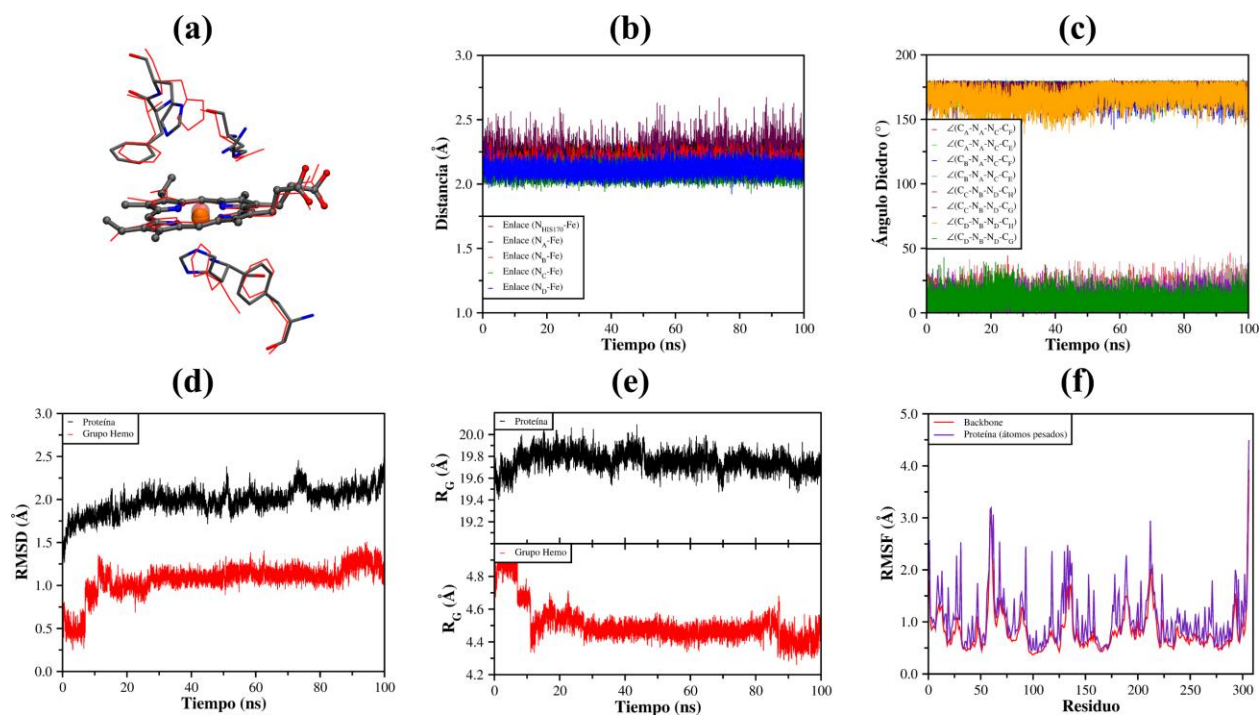
Å y 2.086 Å. Una tendencia similar se observó para los ángulos diedros (ver Figura 33(c)); en los cuales, los valores promedios a partir de las simulaciones MD son 9.6° para $\angle(\text{C}_A\text{-N}_A\text{-N}_C\text{-C}_F)$, 173.3° para $\angle(\text{C}_A\text{-N}_A\text{-N}_C\text{-C}_E)$, 171.0° para $\angle(\text{C}_B\text{-N}_A\text{-N}_C\text{-C}_F)$, 11.2° para $\angle(\text{C}_B\text{-N}_A\text{-N}_C\text{-C}_E)$, 8.0° para $\angle(\text{C}_C\text{-N}_B\text{-N}_D\text{-C}_H)$, 172.4° para $\angle(\text{C}_C\text{-N}_B\text{-N}_D\text{-C}_G)$, 167.6° para $\angle(\text{C}_D\text{-N}_B\text{-N}_D\text{-C}_H)$, y 8.8° para $\angle(\text{C}_D\text{-N}_B\text{-N}_D\text{-C}_G)$; los cuales son comparables y en buen acuerdo con lo calculado en la estructura nativa con valores de 5.68°, 174.3°, 170.3°, 6.67°, 7.27°, 176.7°, 172.1° y 5.3° respectivamente.

En cuanto al RMSD y R_G del grupo Hemo, los resultados se presentan en las Figuras 33(d) y 33(e); y cuyos valores son $1.06 \text{ \AA} \pm 0.8 \text{ \AA}$ y $4.50 \text{ \AA} \pm 0.08 \text{ \AA}$. Estos resultados indican que el grupo Hemo se mantiene satisfactoriamente en el sitio activo de la proteína HRP. Lo anterior se pudo evidenciar en la Figura 33(a) donde se hizo una superposición del grupo Hemo y el residuo HIS170 entre la estructura nativa y las coordenadas atómica a obtenida a partir de las simulaciones MD al tiempo de 100 ns.

Por otra parte, la unidad proteica de la HRP conserva su estructura interna a lo largo de las simulaciones MD. En la Figura 33(d,e,f) se muestran los cálculos de RMSD, R_G y RMSF respectivamente. El valor para el RMSD es de $1.98 \text{ \AA} \pm 0.14 \text{ \AA}$; mientras que el valor para el parámetro R_G es de $19.7 \text{ \AA} \pm 0.08 \text{ \AA}$. Ambos parámetros indican que la estructura interna de la proteína HRP se conserva. Lo anterior también se evidenció con los cálculos de RMSF mostrando que los átomos del backbone y los átomos pesados de la HRP fluctúan en valores aceptados en el marco de simulaciones MD (Arnitali et al., 2019; Gohlke et al., 2000; Herrera-Calderon et al., 2020).

Figura 33

Parámetros geométricos y estructurales para la validación de la topología FF de la enzima HRP (incluido el grupo Hemo dentro de la enzima). (a) Superposición de la estructura tridimensional del grupo Hemo (rojo: estructura original; resultados de MD); (b) distancias de enlace N-Fe del grupo Hemo; (c) Ángulos diedros C-N-N-C del grupo Hemo; (d) RMSD de la unidad proteica y el grupo Hemo; (e) radio de giro (R_G) de la unidad proteica y el grupo Hemo; (f) Resultados del RMSF de la proteína.

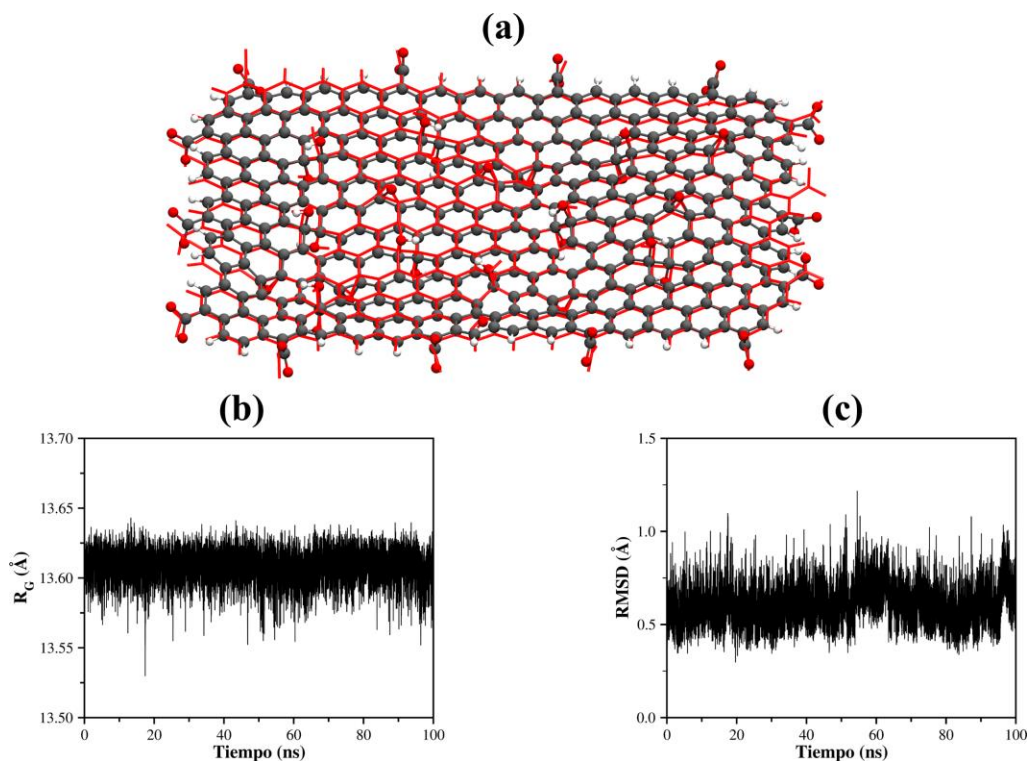


Por último, la validación de la topología FF para el GODs se llevó a cabo a partir de las coordenadas atómicas obtenidas a lo largo de las simulaciones MD de la etapa de producción. Para esta molécula, únicamente se calcularon el R_G y el RMSD los resultados se muestran en la Figura 34. Ambos parámetros no presentaron fluctuaciones significativas indicando que la topología FF simula adecuadamente las características geométricas intrínsecas del GODs, en relación con la

planaridad de su estructura debido a la presencia de anillos tanto aromáticos como la presencia de carbonos con hibridación sp^3 ; y como consecuencia de la inserción de grupos oxigenados epóxidos y alcoholes. Lo anterior se muestra en la Figura 34(a) donde se hizo una superposición entre la estructura del GODs originalmente construida y minimizado con las coordenadas atómicas extraídas del último ciclo de simulación MD de la etapa de producción ($t = 100$ ns). Lo anterior se evidenció considerando que el valor promedio del R_G (ver Figura 34(b)) es de $13.6 \text{ \AA} \pm 0.01 \text{ \AA}$; mientras que el valor promedio del RMSD (ver Figura 34(c)) es de $0.59 \text{ \AA} \pm 0.10 \text{ \AA}$.

Figura 34

Validación de la topología FF para la lámina de GODs. (a) Superposición de la estructura tridimensional de lámina de GODs (rojo: estructura optimizada; resultados de MD); (b) RMSD; (c) Radio de giro (R_G)



4.4.2 Resultados MD del sistema GODs-HRP

Luego de la validación de la topología FF para cada una de las unidades moleculares involucradas en este trabajo de investigación, se procedió a llevar a cabo las simulaciones MD para la funcionalización de la HRP con el GODs, descrito en la sección de la metodología. Posterior a la obtención de las coordenadas atómicas para todas las configuraciones, previamente construidas y teniendo en cuenta tanto la formación del enlace C-N de la interfaz GODs-HRP como la orientación del GODs en torno a la superficie de la HRP, se calcularon los parámetros RMSD, R_G y RMSF para explorar los posibles cambios del espacio configuracional del sistema en mención a lo largo del tiempo de muestreo en la fase de producción. Los resultados promedios para las configuraciones S1 hasta S20 se presentan en la Tabla 12 y sus valores en función del tiempo se muestra en el Apéndice D.

Los resultados de las simulaciones MD de la etapa de producción permitieron explorar las fluctuaciones de las posiciones atómicas, a lo largo del tiempo de muestreo, que forman el complejo GODs-HRP. En este sentido, la primera propiedad que se calculó fue el RMSD para cada unidad molecular (GODs, HRP y fragmento Hemo en el complejo GODs-HR) a partir de las coordenadas atómicas que fueron previamente ajustadas mediante mínimos cuadrados y usando los carbonos alfa del backbone de la HRP al tiempo $t = 0$ ns como referencia, para eliminar las contribuciones rotacionales y traslaciones ocasionados por las simulaciones MD. El primer aspecto destacable que se observó para todas las configuraciones es que los valores promedio del RMSD para la subunidad proteica de la HRP son menores a 3 Å con desviaciones estándar por debajo de 0.6 Å.

Adicionalmente, los valores promedio del RMSD para los átomos pesados del grupo Hemo son en general menores a 1.5 Å con desviaciones estándar menores que 0.5 Å. Estos resultados

indican que independiente del residuo de LYS ubicados en la superficie de la proteína (LYS232 y LYS241) al que se une la lámina de GODs para la funcionalización, la proteína conserva su estructura original (ver resultados de RMSF en el Apéndice D), lo que sugiere que la funcionalización a través de los sitios de unión mencionados anteriormente puede ser viable sin alterar las propiedades estructurales y originales de la proteína HRP. Lo anterior se complementa al observar los valores promedio del R_G tanto para la unidad proteica como el grupo Hemo de la HRP, que se encuentran alrededor de 4.7 Å y 20.7 Å respectivamente (ver Tabla 12).

Tabla 12

Resultados de RMSD y R_G para las unidades moleculares HRP, GODs y Hemo en la funcionalización GODs-HR, a partir de 100 ns de simulaciones MD

Configuración	RMSD (Å)			R_G (Å)		
	HRP	GODs	Hemo	HRP	GODs	Hemo
S1	2.36 ± 0.24	16.76 ± 2.53	1.23 ± 0.15	20.23 ± 0.08	13.58 ± 0.01	4.44 ± 0.05
S2	2.08 ± 0.15	3.42 ± 1.26	0.76 ± 0.19	19.79 ± 0.10	13.58 ± 0.01	4.42 ± 0.04
S3	2.20 ± 0.25	26.81 ± 4.58	0.75 ± 0.25	19.60 ± 0.08	13.56 ± 0.01	4.73 ± 0.12
S4	2.35 ± 0.32	6.47 ± 1.38	0.71 ± 0.32	19.66 ± 0.08	13.56 ± 0.01	4.76 ± 0.15
S5	2.51 ± 0.50	3.82 ± 0.82	1.21 ± 0.13	19.87 ± 0.09	13.57 ± 0.01	4.50 ± 0.07
S6	2.26 ± 0.23	33.32 ± 8.58	1.24 ± 0.21	19.64 ± 0.10	13.57 ± 0.02	4.62 ± 0.06
S7	1.72 ± 0.11	4.47 ± 1.32	0.73 ± 0.14	19.45 ± 0.06	13.57 ± 0.01	4.70 ± 0.10
S8	2.12 ± 0.30	2.42 ± 0.38	1.06 ± 0.19	19.82 ± 0.21	13.56 ± 0.01	4.50 ± 0.10
S9	1.85 ± 0.19	20.56 ± 4.4	0.50 ± 0.09	19.67 ± 0.10	13.59 ± 0.01	4.84 ± 0.04
S10	2.03 ± 0.28	2.55 ± 1.30	0.76 ± 0.16	19.53 ± 0.08	13.58 ± 0.02	4.75 ± 0.08
S11	1.82 ± 0.15	1.54 ± 0.38	0.71 ± 0.12	19.60 ± 0.09	13.60 ± 0.01	4.80 ± 0.06
S12	1.82 ± 0.17	9.77 ± 6.43	0.63 ± 0.15	19.54 ± 0.09	13.57 ± 0.01	4.80 ± 0.10
S13	1.99 ± 0.26	13.47 ± 7.61	0.94 ± 0.21	19.75 ± 0.13	13.57 ± 0.01	4.66 ± 0.09
S14	1.86 ± 0.12	3.49 ± 0.79	0.80 ± 0.15	19.46 ± 0.09	13.54 ± 0.02	4.77 ± 0.05
S15	2.66 ± 0.41	7.14 ± 1.88	1.20 ± 0.16	19.96 ± 0.13	13.57 ± 0.01	4.47 ± 0.09
S16	2.11 ± 0.19	28.50 ± 4.76	1.02 ± 0.14	19.72 ± 0.09	13.57 ± 0.01	4.49 ± 0.08
S17	1.94 ± 0.23	18.13 ± 3.95	1.05 ± 0.22	19.75 ± 0.08	13.56 ± 0.02	4.54 ± 0.12
S18	1.85 ± 0.16	3.65 ± 0.58	0.55 ± 0.12	19.59 ± 0.06	13.49 ± 0.03	4.85 ± 0.04
S19	1.82 ± 0.22	10.95 ± 7.68	0.69 ± 0.19	19.54 ± 0.08	13.57 ± 0.02	4.68 ± 0.09
S20	1.96 ± 0.25	2.01 ± 0.75	0.81 ± 0.24	19.60 ± 0.08	13.57 ± 0.02	4.77 ± 0.10

Aunque la HRP conserva su estructura original durante la etapa de producción de las simulaciones MD, una situación contraria ocurrió con la lámina de GODs. De acuerdo con sus resultados presentados en la Tabla 12, dos grupos de configuraciones presentan diferencias significativas en los valores RMSD. Un primer grupo corresponde a aquellas configuraciones que exhiben valores de RMSD promedio significativamente elevado. En este caso, aparecen las configuraciones S1 con un valor de $16.76 \text{ \AA} \pm 2.53 \text{ \AA}$, S3 con un valor de $26.81 \text{ \AA} \pm 4.58 \text{ \AA}$, S4 con un valor de $6.47 \text{ \AA} \pm 1.38 \text{ \AA}$, S6 con un valor de $33.32 \text{ \AA} \pm 8.58 \text{ \AA}$; S7 con un valor de $4.47 \text{ \AA} \pm 1.32 \text{ \AA}$, S9 con un valor de $20.56 \text{ \AA} \pm 4.4 \text{ \AA}$; S12 con un valor de $9.77 \text{ \AA} \pm 6.43 \text{ \AA}$; S13 con un valor de $13.47 \text{ \AA} \pm 7.61 \text{ \AA}$; S15 con un valor de $7.14 \text{ \AA} \pm 1.88 \text{ \AA}$; S16 con un valor de $28.50 \text{ \AA} \pm 4.76 \text{ \AA}$; S17 con un valor de $18.13 \text{ \AA} \pm 3.95 \text{ \AA}$ y S19 con un valor de $10.95 \text{ \AA} \pm 7.68 \text{ \AA}$.

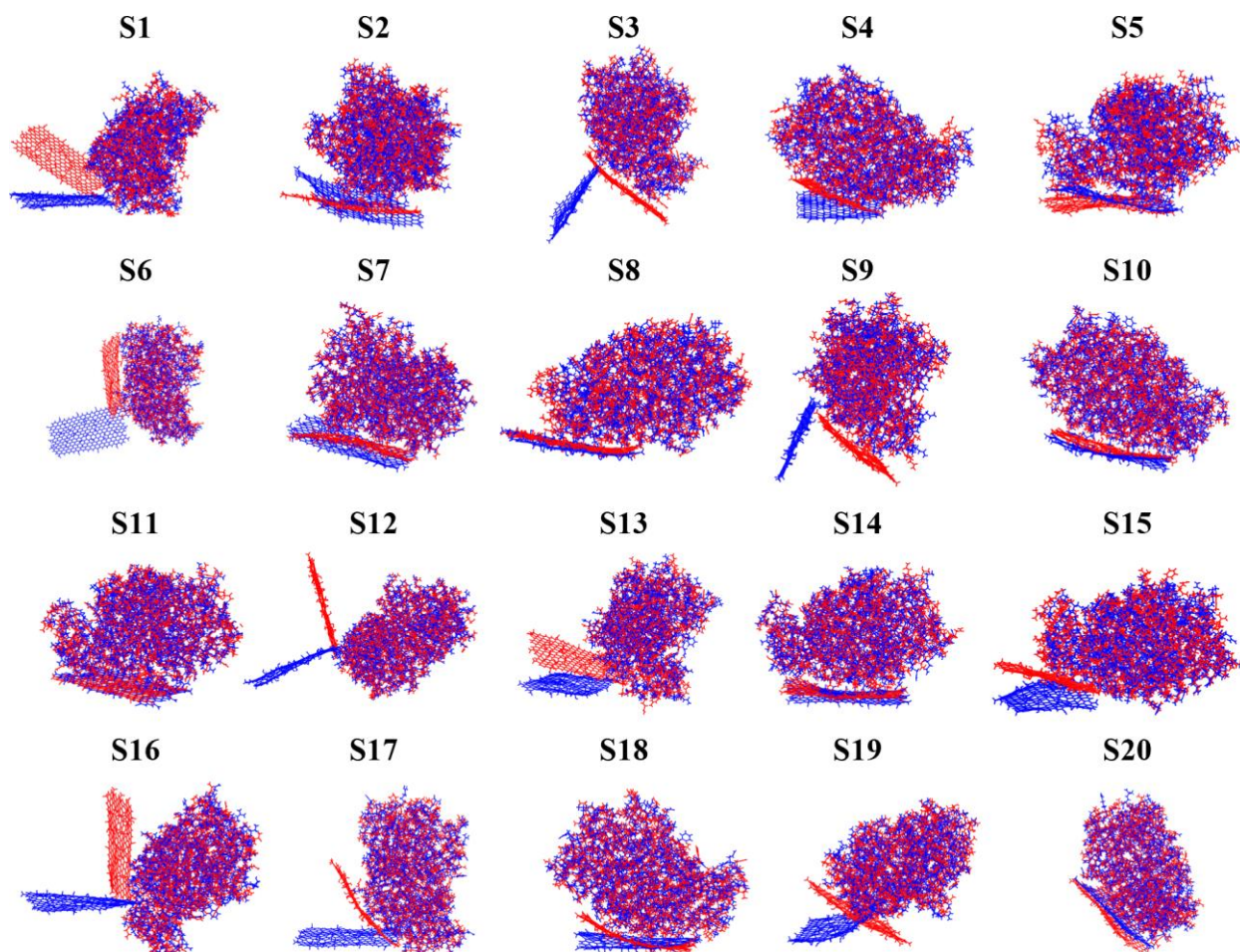
Los valores elevados para las configuraciones mencionadas anteriormente obedecen al hecho que la lámina de GODs, durante las simulaciones MD, cambia drásticamente su orientación relativa a la HRP como consecuencia de la rotabilidad del enlace C-N (que forma la funcionalización) lo que favorece un aumento de la superficie de contacto de la interfaz GODs-HRP debido al aumento en las posibles interacciones entre los residuos de aminoácidos cercanos a la superficie de la lámina GODs. Esto se evidencia al observar la Figura 35 donde se presenta la superposición de las estructuras del compuesto GODs-HRP de cada configuración en los tiempos de simulación $t = 0 \text{ ns}$ y $t = 100 \text{ ns}$.

El segundo grupo de configuraciones se caracterizaron por exhibir un valor de RMSD promedio bajo. En este caso, aparecen las configuraciones S2 con un valor de $3.42 \text{ \AA} \pm 1.26 \text{ \AA}$, S5 con un valor de $3.82 \text{ \AA} \pm 0.82 \text{ \AA}$, S8 con un valor de $2.42 \text{ \AA} \pm 0.38 \text{ \AA}$, S10 con un valor de $2.55 \text{ \AA} \pm 1.30 \text{ \AA}$, S11 con un valor de $1.54 \text{ \AA} \pm 0.38 \text{ \AA}$, S14 con un valor de $3.49 \text{ \AA} \pm 0.79 \text{ \AA}$, S18 con un valor de $3.65 \text{ \AA} \pm 0.58 \text{ \AA}$ y S20 con un valor de $2.01 \text{ \AA} \pm 0.75 \text{ \AA}$. Estos resultados obedecen al

hecho que al inicio de las simulaciones MD de la etapa de producción, gran parte de la superficie de la lámina de GODs interacciona con la proteína HRP (ver Figura 35) y se conserva a lo largo de todo el tiempo de muestreo (ver Apéndice D).

Figura 35

Superposición de las estructuras del compuesto GODs-HRP obtenidas a partir de 100 ns de simulaciones MD. Las estructuras en color rojo para $t = 100$ ns. Las estructuras en color azul para $t = 0$ ns



Si bien el 60% de las configuraciones exploradas presentaron significativas fluctuaciones del RMSD a lo largo del tiempo de muestreo, los valores calculados del R_G promedio para todas las configuraciones son cercanos a 13.5 Å con desviaciones estándar menores a 0.02 Å (ver Tabla 12). Aunque la lámina de GODs fluctúa considerablemente en la interfaz GODs-HRP, se conserva su carácter cuasiplanar durante todo el periodo de muestreo por MD (ver Apéndice D).

Además, de las 20 configuraciones estudiadas, 18 de ellas exhiben una alta superficie de contacto entre la lámina GODs y la proteína al final de los 100 ns; sugiriendo que desde el punto de vista estructural todas las configuraciones son posibles. Sin embargo, en este estudio no se contó con evidencia experimental acerca de las características estructurales de la funcionalización GODs-HRP que permitiera realizar comparativos.

Posterior a las simulaciones MD se llevó a cabo un estudio desde la perspectiva termodinámica para explorar cuál de las 20 configuraciones es la termodinámicamente más favorable y los resultados se presentan y discuten a continuación.

4.2.3 Resultados MM-GBSA del compuesto GODs-HRP

Los cálculos de MM-GBSA realizados a partir de las coordenadas atómicas de la funcionalización GODs-HRP a partir de 100 ns de simulaciones MD permitió explorar desde una perspectiva energética la naturaleza de las posibles interacciones entre el GODs y la HRP y su contribución (favorable o no) hacia la estabilidad de cada una de las configuraciones estudiadas en este trabajo de investigación. Además, con base en estos resultados se pudo identificar cuál de las 20 configuraciones son las termodinámicamente más favorable. Los resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13

Resultados de los cálculos MM-GBSA a partir de 100 ns de simulaciones MD para las 20 configuraciones de la funcionalización GODs-HRP. Valores de energía libre de Gibbs reportados en kJ/mol

Configuración	V_{enlace}	$V_{\text{ángulo}}$	$V_{\text{torsión}}$	V_{LJ}	$V_{\text{Coul.}}$	E_{GB}	E_{SASA}	$G_{\text{Cond.}}$	G_{Rel}
S1	76.3	2924.3	-3410.5	-2693.9	-19782.9	-4704.3	126.0	-27465.1	0.0
S2	72.0	2927.8	-3414.7	-2744.7	-19930.5	-4451.2	122.5	-27418.7	46.3
S3	76.5	2666.5	-3409.2	-2749.4	-20002.8	-4422.7	121.3	-27719.8	-254.8
S4	74.4	2674.8	-3418.8	-2806.3	-19953.8	-4434.3	118.0	-27746.0	-280.9
S5	74.5	2683.2	-3405.5	-2751.0	-19902.1	-4476.7	123.7	-27653.8	-188.7
S6	75.8	2674.4	-3421.6	-2731.5	-19812.6	-4599.0	121.2	-27693.3	-228.2
S7	71.8	2658.6	-3391.9	-2841.7	-20003.7	-4393.0	113.6	-27786.3	-321.2
S8	74.7	2670.4	-3402.4	-2793.0	-19765.9	-4568.1	121.1	-27663.4	-198.3
S9	75.1	2655.2	-3406.1	-2771.4	-19901.2	-4546.4	119.2	-27775.7	-310.6
S10	76.4	2675.1	-3394.8	-2780.9	-19834.1	-4555.2	119.2	-27694.5	-229.4
S11	75.2	2657.8	-3396.4	-2838.3	-19946.5	-4451.4	118.9	-27780.7	-315.6
S12	72.9	2669.4	-3410.3	-2720.7	-19783.0	-4614.3	119.6	-27666.4	-201.3
S13	76.5	2673.7	-3407.7	-2685.1	-19644.5	-4768.0	124.9	-27630.1	-165.0
S14	73.9	2663.2	-3398.3	-2800.9	-20041.9	-4388.4	116.7	-27775.6	-310.5
S15	75.8	2672.1	-3422.3	-2689.9	-19704.5	-4708.8	128.7	-27648.9	-183.8
S16	80.2	2668.8	-3394.4	-2717.8	-19826.7	-4620.5	122.4	-27687.9	-222.8
S17	75.4	2661.5	-3403.5	-2757.3	-19780.4	-4608.9	121.6	-27691.6	-226.6
S18	76.8	2661.5	-3402.9	-2806.6	-19884.3	-4471.9	117.3	-27710.1	-245.0
S19	74.6	2658.6	-3391.8	-2748.9	-19745.9	-4693.4	121.0	-27725.8	-260.7
S20	74.8	2673.2	-3407.6	-2793.8	-19938.5	-4473.2	119.0	-27746.0	-280.9

Brevemente, los valores tabulados en las columnas 2-6 corresponden a las contribuciones enlazantes y no-enlazantes provenientes de la topología FF (fase gaseosa); mientras que las columnas 7 y 8 pertenecen a las contribuciones energéticas polares y no-polares respectivamente. En la columna 9 se tabulan los resultados de la energía libre de Gibbs total en fase condensada (calculada como la suma de las energías en fase gaseosa y condensada). En la última columna se tabulan las energías libres de Gibbs en fase condensada relativas (G_{Rel}) calculadas como la diferencia de la energía libre de Gibbs en fase condensada (G_{Cond}) entre la configuración seleccionada y la configuración de referencia. En este caso, se tomó a S1 como configuración de referencia. Nótese que el valor de G_{Rel} para S1 es cero. Además, aquellas configuraciones que

presentan una energía libre de Gibbs relativa menor a cero significan que son termodinámicamente más estable que la configuración de referencia S1.

Partiendo de los valores de energía libre de Gibbs relativa, se pudo observar que únicamente la configuración S2 exhibe un valor positivo; mientras que las configuraciones restantes (S3 hasta S20) sus valores son negativos. Es decir, las últimas configuraciones mencionadas son termodinámicamente más estables y favorables que la configuración de referencia S1. Además, se obtuvo una diversidad en cuanto a los valores de esta propiedad termodinámica. Dentro del grupo de configuraciones con menor energía libre de Gibbs relativa se observó que la configuración S7 presenta el valor más negativo de -321.2 kJ/mol; siendo la configuración termodinámicamente más favorable. Esta diferencia significativa, comparadas con S1, refleja las características particulares de las interacciones en la interfaz formada por la HRP y el GODs. Estas interacciones tuvieron un impacto favorable sobre la energía libre de Gibbs total sobre cada uno de ellos.

Partiendo de lo anterior, se realizó un análisis comparativo en detalle de las contribuciones energéticas individuales sobre la energía libre de Gibbs total entre S1 y S7. La contribución V_{enlace} entre S7 y S1 se observa una ligera diferencia de -4.5 kJ/mol menor en S7, la contribución $V_{\text{ángulo}}$ exhibe una diferencia de -265.6 kJ/mol menor en S7, la contribución $V_{\text{torsión}}$ presenta una diferencia de 18.6 k/mol mayor en S7, la contribución V_{GB} exhibe una diferencia 311.3 kJ/mol mayor en S7 y la contribución E_{SASA} presenta una diferencia de -12.4 kJ/mol menor en S7. En este punto, se observó un aspecto interesante y es que, si bien la configuración S7 tiene una contribución energética V_{GB} significativamente desfavorable, frente a S1, esta última es compensada por la contribución $V_{\text{ángulo}}$ significativamente menor con respecto a la misma en S1. Adicionalmente, si

se suman todas las diferencias de contribuciones descritas anteriormente, se obtiene un valor total de 47.4 kJ/mol.

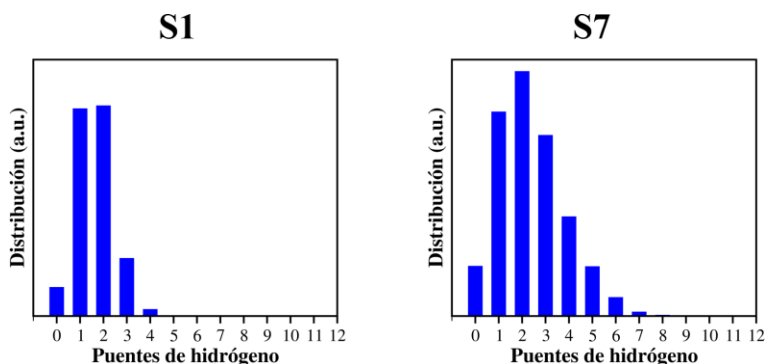
Por tanto, la diferencia central entre las energías libres de Gibbs en fase condensada entre S1 y S7 obedecen exclusivamente a las contribuciones no-enlazantes (Lennard-Jones y de Coulomb) involucradas en la interfaz del compuesto GODs-HRP. Lo anterior se demuestra al comparar la contribución V_{LJ} que presenta una diferencia de -147.8 kJ/mol menor en S7 y V_{Coul} . exhibe una diferencia de -220.8 kJ/mol menor en S7, que al ser sumadas da como resultado un valor de -368.6 kJ/mol. Esto último se observó al comparar las estructuras S1 y S7 presentadas en la Figura 35 donde lámina GODs en el compuesto GODS-HRP de la configuración S1 presenta una menor superficie de contacto con la HRP; mientras que en S7 es mayor.

Partiendo de la anterior premisa, seguidamente se realizó una exploración de la naturaleza de los contactos entre la GODs y la HRP. Para ello, inicialmente se usaron trayectorias obtenidas en la fase de producción de las simulaciones MD para calcular la cantidad de puentes de hidrógeno entre GODs y la HRP a partir de la definición convencional de un puente de hidrógeno, usando el subprograma *hbond* y posteriormente se realizó un análisis de distribución de frecuencias de puentes de hidrógeno.

El segundo análisis consistió en identificar otros contactos entre la lámina de GODs y la HRP usando la herramienta Discovery Studio Visualizer (<https://www.3ds.com>), usando las coordenadas atómicas de las simulaciones MD de la etapa de producción al tiempo $t = 100\text{ns}$, para explorar las diversas interacciones no-enlazantes en la interfaz del sistema funcionalizado.

Figura 36

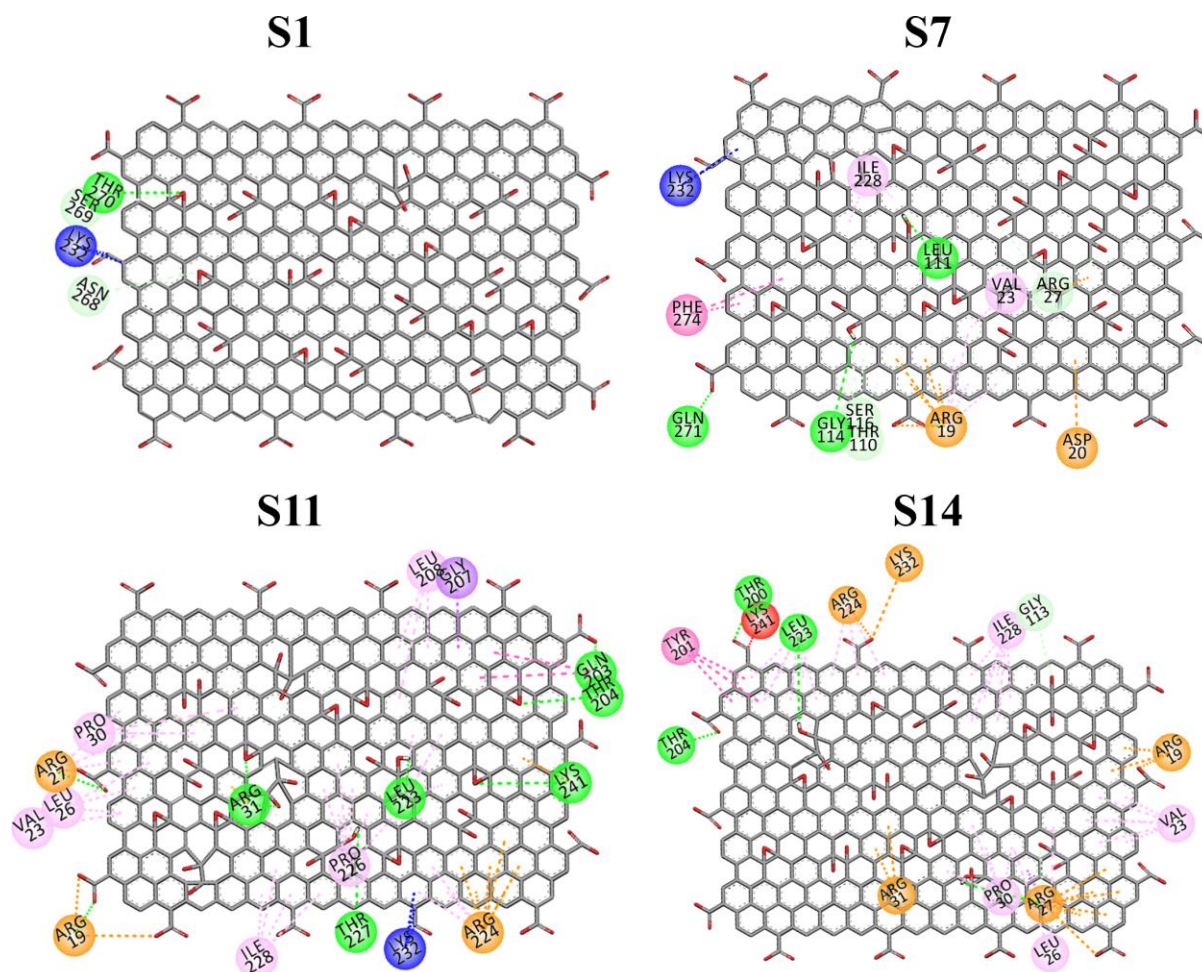
Perfiles de distribución de frecuencia de puentes de hidrógeno en la interfaz GODs-HRP para las configuraciones S1 y S7 a partir de 100 ns de simulaciones MD



En la Figura 36 se muestra los perfiles de distribución de frecuencias de puentes de hidrógeno entre GODs y la HRP para las configuraciones S1 y S7, permitiendo observar diferencias notorias entre ambas configuraciones. Mientras que en S1 aparecen entre 1 y 2 puentes con mayor frecuencia; la distribución de puentes de hidrógeno en S7 se concentra principalmente entre 1 y 4 puentes de hidrógeno favoreciendo significativamente la contribución del término V_{LJ} sobre la energía libre de Gibbs total. Lo anterior se evidencia a partir del mapa 2D de contacto presentado en la Figura 37 donde se muestra que la superficie de la configuración S1 no participa significativamente en la interfaz del compuesto GODs-HRP; mientras que en la configuración S7 es notoria. Además, otro aspecto clave de estos resultados es que los grupos -OH y -COO de la lámina GODs son los responsables de la formación de los puentes de hidrógeno.

Figura 37

Mapa 2D de contacto entre la lámina de GODs y HRP en la interfaz GODS-HRP a partir de las simulaciones MD en $t = 100$ ns



Interacciones:

■ Enlace HRP-GODs	■ Interacción $\pi - \sigma$
■ Interacción electrostática favorable	■ Interacción π - alquil
■ Puente de hidrógeno convencional	■ Interacción ion-ion desfavorable
■ Interacción C-H favorable	

Otro aspecto que se mencionó anteriormente es en relación con las diferencias energéticas del término $V_{Coul.}$ entre las configuraciones S1 y S7 y para entender su naturaleza se recurrió

nuevamente a los resultados presentados en la Figura 37. En este sentido, nuevamente se obtienen diferencias notorias entre S1 y S7. Mientras que en S1 no se observan interacciones de Coulomb en la interfaz GODs-HRP, la configuración S7 presenta numerosas interacciones que favorecen energéticamente la formación del compuesto GODs-HRP. Además, en todos los casos se observó que en estas interacciones existe una participación directa de los anillos que contienen átomos de carbono sp^2 deslocalizados y ubicados en la superficie del GODs. Por tanto, otro aspecto clave de los resultados obtenidos es el hecho que la funcionalización entre la HRP y GODs es igualmente controlada por los efectos de deslocalización de carga.

Si bien la configuración S7 presenta la menor energía libre de Gibbs relativa más negativa, otras configuraciones GODs-HRP demostraron ser, igualmente, muy estable. En este sentido, la configuración S11 tiene una energía relativa de -315.6 kJ/mol y la configuración S14 exhibe una energía relativa de -310.5 kJ/mol. Además, para estas configuraciones se observó una tendencia similar en relación con la importancia tanto de la formación de puentes de hidrógeno como de las interacciones con los carbonos sp^2 en la interfaz GODs-HRP (ver Figura 37). Las restantes configuraciones también muestran una característica similar y sus resultados se muestran tanto en la Tabla 14 como en el apéndice E.

4.2.3 Resultados de acoplamiento molecular

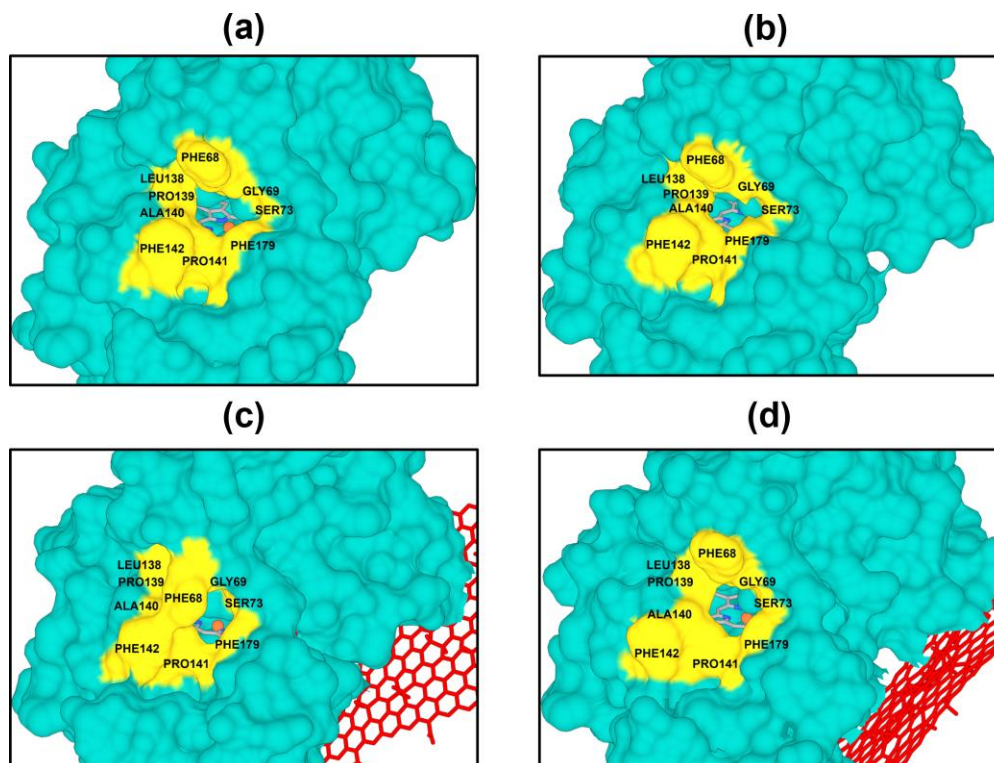
Los resultados de las simulaciones computacionales desarrolladas hasta este punto permitieron realizar una exploración profunda desde las bases moleculares sobre los posibles puntos de unión entre el GODs y la HRP; demostrando que la formación del compuesto GODs-HRP es posible desde una perspectiva estructural y energética. Además, permitieron demostrar la importancia de la participación de la superficie de la GODs hacia la formación de interacciones en

la interfaz GODs-HRP que favorecieran su formación. Adicionalmente, se pudo demostrar que, si bien la HRP presenta dos residuos de LYS sobre su superficie, la LYS232 es más favorable termodinámicamente. A partir de lo descrito anteriormente, se realizaron cálculos computacionales basados en acoplamiento molecular para ahondar sobre la conservación del sitio activo de la HRP, antes y después de la funcionalización, que corresponde al grupo Hemo en combinación con los residuos de aminoácidos que rodean al grupo prostático; quienes son los responsables de la actividad enzimática de la HRP frente a compuestos fenólicos (Veitch, 2004). Adicionalmente, antes de iniciar estos cálculos computacionales se realizó una exploración preliminar del canal de entrada hacia el sitio activo de la HRP. Este canal es formado por los residuos PHE68, GLY69, SER73, LEU138, PRO139, ALA140, PRO141, PHE142, PHE179 que restringen el acceso de los sustratos hacia el sitio activo de la HRP que se encuentra al interior de unidad proteica (Mogharrab et al., 2007).

Aunque la actividad enzimática de la HRP ocurre mediante activación previa con peróxido de hidrógeno (Veitch, 2004) para dar lugar a la formación de los intermedios denominados compuesto I y II (ver Figura 7), en este trabajo se usaron tanto la estructura nativa de la HRP como las configuraciones GODs-HRP sin tener en cuenta la presencia de peróxido de hidrógeno. En este sentido, los cálculos de acoplamiento molecular se llevaron a cabo tanto para la HRP libre como los compósitos S7 y S11. Estas dos últimas configuraciones GODs-HRP fueron seleccionados debido a que presentan la menor energía libre de Gibbs relativa. Además, se usó al fenol como estructura representativa de los compuestos fenólicos. En la Figura 38 se presenta las estructuras tridimensionales de la HRP nativa, HRP luego de ser optimizada y las mejores estructuras para las configuraciones S1 y S7. Estas estructuras fueron generadas para explorar el comportamiento de los residuos de aminoácido involucrados en el canal de entrada hacia el sitio activo de la HRP.

Figura 38

Representación estructural del canal de entrada al sitio activo de la HRP. La superficie en color amarillo corresponde a los residuos aa del canal de entrada. (a) HRP nativa; (b) HRP luego de optimizada su estructura; (c) S7; (d) S11



De acuerdo con la figura anterior, lo primero que se evidenció es que la HRP luego de ser optimizada su geometría, se conserva el canal de entrada que conduce hacia el sitio activo de esta proteína. Adicionalmente, el segundo aspecto, más importante aún, se observó al analizar la disposición del canal en las configuraciones S7 y S11. Lo anterior indica que luego de la funcionalización de la lámina de GODs con la HRP, el canal de entrada se mantiene de tal forma que pueda entrar el sustrato que sería oxidado posteriormente a partir de la reactividad propia de

la HRP. Estos resultados son muy importantes debido a que refleja el hecho que las configuraciones del sistema GODs-HRP más estables, termodinámicamente, garantizarían acceso del sitio activo de la HRP a través del canal formado por los residuos mencionados anteriormente. Una vez analizado la disposición del canal de entrada de la HRP se realizaron las simulaciones de acoplamiento molecular y los resultados se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14

Resultados de los cálculos de acoplamiento molecular. Valores reportados en kJ/mol

Configuración	Grid _{vdw}	Grid _{ES}	Grid _{ER}	G _{TOTAL}
HRP libre	-19.50	-2.77	0.02	-22.25
S7 (GODs-HRP)	-18.59	-4.58	0.02	-23.15
S11 (GODs-HRP)	-17.27	-1.61	0.02	-18.86

Teniendo en cuenta las características del programa DOCK6, Grid_{vdw} es la contribución de van der Waals, Grid_{ES} es la contribución electrostática y Grid_{ER} es la contribución por repulsión entre el ligando y el receptor; mientras que G_{TOTAL} es el valor total de la puntuación y es calculada como la suma de Grid_{vdw}, Grid_{ES} y Grid_{ER}. Entre más negativo sea el valor de G_{TOTAL} la interacción entre el ligando y el receptor es más favorable (Allen et al., 2015). A partir de los resultados de acoplamiento molecular obtenidos en este trabajo se observó un aspecto importante en el sentido que tanto en la HRP como en la configuración S7 exhiben valores cercanos de G_{TOTAL} indicando que la formación del complejo receptor-ligando es viable. Este resultado es de gran relevancia debido al hecho que los resultados experimentales de la actividad enzimática tanto de la HRP libre como del sistema GODs-HRP exhiben valores cercanos.

Aunque los resultados experimentales mostraron que el compuesto GODs-HRP exhibe una actividad enzimática menor que la HRP (con una de retención del 92% de la actividad enzimática

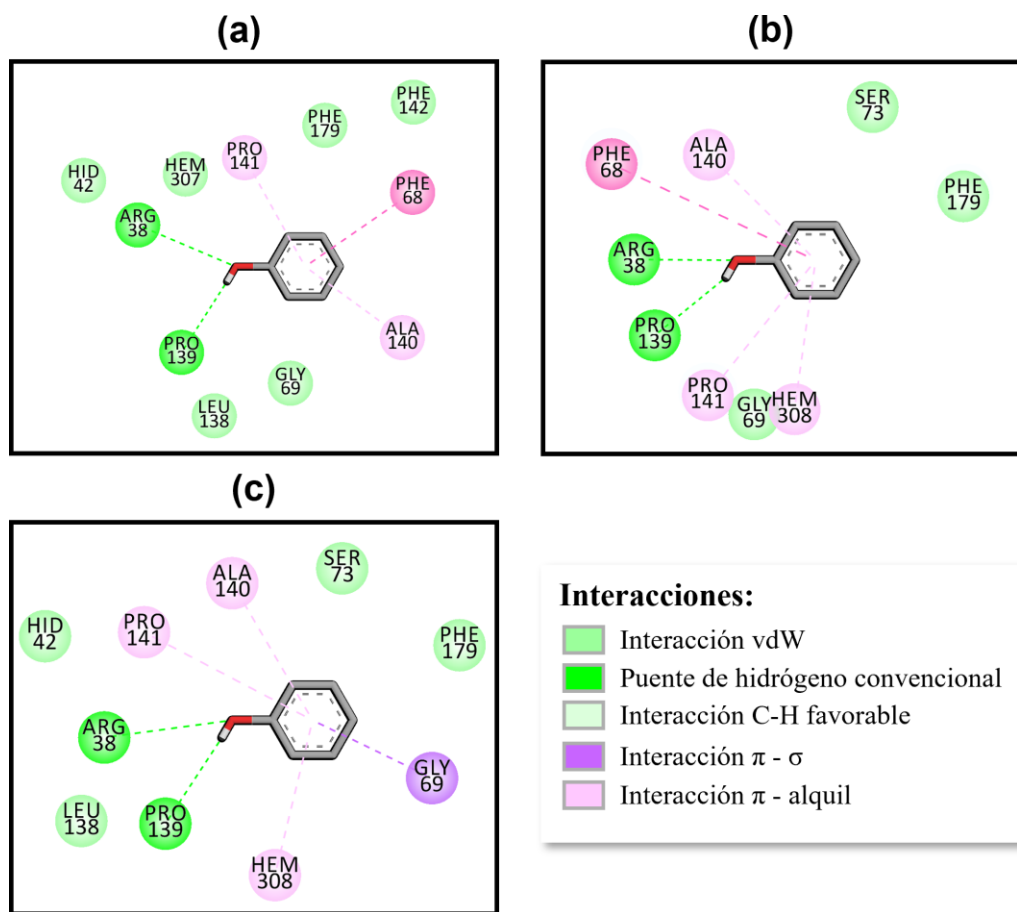
frente a la HRP), estos resultados de acoplamiento molecular en combinación con las simulaciones de dinámica molecular y MM-GBSA están en muy buen acuerdo con todo lo desarrollado experimentalmente, brindando luces adicionales desde una perspectiva estructural. En correspondencia con lo anterior, a partir de los resultados de acoplamiento molecular se hizo un análisis estructural para explorar la naturaleza de la interfaz del complejo ligando-receptor. En este sentido, se construyeron los mapas 2D de contacto del sistema ligando-receptor que se presentan en la Figura 39.

Los mapas 2D de contacto a partir de los resultados de acoplamiento molecular permitieron identificar satisfactoriamente las interacciones claves para la formación y estabilización del complejo ligando-receptor. Una inspección general reveló que se presentan ligeras diferencias en cuanto al conjunto de interacciones entre el fenol y la HRP libre o las configuraciones S7 y S11. Sin embargo, las interacciones que se conservan en todos los casos son aquellas que involucran los residuos ARG38, PRO139, PRO141; mientras que la interacción con el residuo PHE68 aparece únicamente en la HRP libre y S7. Estas diferencias ocurrieron como consecuencia de los cambios conformacionales sobre el sitio activo de la HRP cuando se encuentra funcionalizada con la GODs.

Otra diferencia que se observó al comparar los resultados entre S7 y S11 es en relación con la cantidad de contactos entre el ligando y el receptor. Mientras que S7 mostró 7 contactos en total; la configuración S11 únicamente mostró 6 contactos. El resultado anterior es consecuente con los valores de G_{TOTAL} ; siendo S7 ligeramente menor comparado con S11. Partiendo de lo anterior, el análisis de la naturaleza entre el ligando y el receptor se llevó a cabo usando únicamente la configuración S7.

Figura 39

Mapa 2D de interacciones ligando-receptor. (a) HRP libre; (b) S7; (c) S11



Tanto en la HRP libre como en S7, tres interacciones son claves durante la formación del complejo ligando-receptor. La primera se exhibe entre el anillo aromático del fenol y el residuo PHE68 a través de interacciones π - σ y las otras dos se generan entre el grupo hidroxilo del fenol con los residuos ARG38 y PRO139 mediante puentes de hidrógeno. Estas interacciones han sido encontradas por diversos autores a partir de estudios experimentales y teóricos demostrando su papel determinante en la actividad enzimática de la HRP ([Azevedo et al., 2003](#); [Bretz et al., 2020](#); [Campomanes et al., 2015](#); [Mogharrab et al., 2007](#); [Reihmann & Ritter, n.d.](#); [Veitch, 2004](#)).

5. Conclusiones

Se sintetizaron nanoestructuras de carbono de tipo Puntos de Óxido de Grafeno (GODs) fluorescentes con una intensa emisión en la región azul, mediante el corte de láminas de OG utilizando un método de síntesis hidrotérmica asistida por microondas. El estudio de las variables influyentes en la síntesis de GODs, condujo a descartar y establecer parámetros que facilitaran una ruta de síntesis óptima, que favoreciera las propiedades ópticas de emisión de fluorescencia de este nanomaterial. Este proceso, dio como resultado GODs con estabilidad a lo largo del tiempo, altos rendimientos cuánticos (QY: 8,02%, usando cumarina 120 como referencia), emisiones estrechas, tamaños hidrodinámico inferior a los 6,4 nm y baja citotoxicidad manteniendo la viabilidad celular en un 98.5% a una concentración de 175ug/mL.

La caracterización de GODs por espectroscopía IR, Raman, XPS y DRX dan como resultado indicios de la reducción del OG tanto de tamaño como en grupos funcionales oxigenados. Sin embargo, estos estudios arrojaron que aún están presentes grupos carboxilos sobre su superficie lo que lo convierte en un sustrato ideal para su funcionalización con la enzima HRP.

La funcionalización de los GODs con la enzima HRP, se logró a través de un acoplamiento peptídico utilizando los agentes de acoplamiento químico NHS y EDC. En este proceso, el EDC activó los grupos carboxilos presentes en los GODs generando un intermediario reactivo altamente inestable. La adición de NHS estabiliza este intermediario a través de la formación de un éster de N-hidroxisuccinimida, el cual es más eficiente para reaccionar con los grupos α -amino presentes en el residuo terminal lisina de la HRP. Esto facilitó la formación del enlace amida entre los GODS y la enzima, logrando así una funcionalización estable y eficiente.

El estudio de la relación volumétrica en la síntesis de GODs-HRP condujo a establecer la ruta de síntesis óptima. La condición 4(2,5:1) mostró la mayor intensidad de fluorescencia

probablemente debido a la mayor proporción de HRP usada, que optimizó la interacción y transferencia de energía. Los cálculos de la actividad enzimática revelaron que la enzima, en el sistema funcionalizado, conserva más del 90 % de su actividad enzimática en comparación con las otras relaciones volumétricas estudiadas.

La caracterización de GODs-HRP mediante las técnicas espectroscópicas confirmaron la funcionalización exitosa de los GODs. El análisis estructural mediante DRX evidenció modificaciones en la estructura cristalina de los GODs atribuibles a la reducción de los grupos funcionales oxigenados y a la incorporación de la enzima HRP, reflejados en el espaciamiento interlaminar y en el número de láminas. Los espectros IR y Raman mostraron bandas características de las tensiones de grupos funcionales presentes en los GODs y HRP; así como de los enlaces amidas, lo cual confirmó el enlace químico entre GODs y HRP y la conservación de la estructura secundaria α -hélice de la HRP. Los resultados por espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y espectroscopia UV-Vis revelaron que el sistema GODs-HRP obtenido retienen las propiedades fotoluminiscentes propias de las GODs. Este comportamiento refuerza la estabilidad estructural y funcional del sistema GODs-HRP, indicando su eficacia como un promisorio material para la detección de compuestos fenólicos.

Finalmente, los cálculos computacionales llevados a cabo para este trabajo de investigación brindaron luces desde una perspectiva atómica/molecular acerca de la estabilidad estructural de la HRP una vez ha sido funcionalizada con láminas de GODs. Estos resultados mostraron las interacciones más dominantes sobre la interfaz del sistema funcionalizado, destacándose la participación de los anillos aromáticos ubicados en la superficie del GODs y la importancia de la presencia de grupos oxígenos; los cuales, interaccionan eficientemente con la superficie de la HRP a través de puentes de hidrógeno.

6. Recomendaciones

Se recomienda la validación del biosensor basado en puntos de óxido de grafeno y funcionalizado con la HRP. Su construcción estará enfocada en la detección de fenoles como contaminantes en aguas. Esto podría convertirse en un método altamente selectivo, sensible y rápido para monitoreo ambiental.

Se sugiere una exploración exhaustiva empleando técnicas como Microscopía de Transmisión Electrónica de alta resolución (HRTEM) que permita estudiar en detalle las características morfológicas y estructurales de los GODs funcionalizados con la HRP. Este análisis proporcionará información complementaria sobre su tamaño, forma y dispersión, así como posibles cambios en su estructura luego de la funcionalización.

Referencias Bibliográficas

- Abid, Sehwat, P., Islam, S. S., Mishra, P., & Ahmad, S. (2018). Reduced graphene oxide (rGO) based wideband optical sensor and the role of Temperature, Defect States and Quantum Efficiency. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21686-2>
- Ajala, O. J., Tijani, J. O., Bankole, M. T., & Abdulkareem, A. S. (2022). A critical review on graphene oxide nanostructured material: Properties, Synthesis, characterization and application in water and wastewater treatment. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 18, 100673. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100673>
- Allen, W. J., Balius, T. E., Mukherjee, S., Brozell, S. R., Moustakas, D. T., Lang, P. T., Case, D. A., Kuntz, I. D., & Rizzo, R. C. (2015). DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *Journal of Computational Chemistry*, 36(15), 1132–1156. <https://doi.org/10.1002/jcc.23905>
- Anegbe, B., Ifijen, I. H., Maliki, M., Uwidia, I. E., & Aigbodion, A. I. (2024). Graphene oxide synthesis and applications in emerging contaminant removal: a comprehensive review. *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00814-4>
- Anku, W. W., Mamo, M. A., & Govender, P. P. (2017). Phenolic Compounds in Water: Sources, Reactivity, Toxicity and Treatment Methods. In *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66927>
- Anwar, A., Chang, T.-P., & Chen, C.-T. (2022). Graphene oxide synthesis using a top–down approach and discrete characterization techniques: a holistic review. *Carbon Letters*, 32(1), 1–38. <https://doi.org/10.1007/s42823-021-00272-z>
- Arnittali, M., Rissanou, A. N., & Harmandaris, V. (2019). Structure Of Biomolecules Through Molecular Dynamics Simulations. *Procedia Computer Science*, 156, 69–78.

<https://doi.org/10.1016/j.procs.2019.08.181>

Azevedo, A. M., Cabral, J. M. S., & Fonseca, L. P. (2003). Horseradish peroxidase : a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 9(03), 199–247.

[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(03\)09003-3](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(03)09003-3)

Baker, S. N., & Baker, G. A. (2010). Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(38), 6726–6744.

<https://doi.org/10.1002/anie.200906623>

Bao, H., Liu, Y., Li, H., Qi, W., & Sun, K. (2023). Luminescence of carbon quantum dots and their application in biochemistry. *Heliyon*, 9(10), e20317.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20317>

Barca, G. M. J., Bertoni, C., Carrington, L., Datta, D., De Silva, N., Deustua, J. E., Fedorov, D. G., Gour, J. R., Gunina, A. O., Guidez, E., Harville, T., Irle, S., Ivanic, J., Kowalski, K., Leang, S. S., Li, H., Li, W., Lutz, J. J., Magoulas, I., ... Gordon, M. S. (2020). Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. *The Journal of Chemical Physics*, 152(15). <https://doi.org/10.1063/5.0005188>

Bauer, P., Hess, B., & Lindahl, E. (2022). *GROMACS 2022.3 Manual*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7037337>

Bej, S., Ghosh, M., Das, R., & Banerjee, P. (2022). Evaluation of nanomaterials-grafted enzymes for application in contaminants degradation: Need of the hour with proposed IoT synchronized nanosensor fit sustainable clean water technology in en masse. *Journal of the Indian Chemical Society*, 99(5), 100429. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100429>

Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., & Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417(6887), 463–468.

<https://doi.org/10.1038/417463a>

Biosciences. (n.d.). *Protein Cross-Linkers G-Biosciences Handbook & Selection Guide*.

www.GBiosciences.com

Bretz, R. R., de Castro, A. A., Lara Ferreira, I. F., Ramalho, T. C., & Silva, M. C. (2020).

Experimental and theoretical affinity and catalysis studies between halogenated phenols and peroxidases: Understanding the bioremediation potential. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110895. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110895>

Brouwer, A. M. (2011). Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution

(IUPAC technical report). In *Pure and Applied Chemistry* (Vol. 83, Issue 12, pp. 2213–2228). <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>

Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling.

The Journal of Chemical Physics, 126(1), 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>

Campomanes, P., Rothlisberger, U., Alfonso-Prieto, M., & Rovira, C. (2015). The Molecular

Mechanism of the Catalase-like Activity in Horseradish Peroxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 137(34), 11170–11178. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b06796>

Case, D. A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Cerutti, D. S., Cisneros, G. A., Cruzeiro, V. W. D.,

Forouzesh, N., Giese, T. J., Götz, A. W., Gohlke, H., Izadi, S., Kasavajhala, K., Kaymak, M. C., King, E., Kurtzman, T., Lee, T.-S., Li, P., Liu, J., Luchko, T., ... Merz, K. M. (2023). AmberTools. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(20), 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>

Cayuela, A., Soriano, M. L., Carrillo-Carrión, C., & Valcárcel, M. (2015). Semiconductor and

carbon-based fluorescent nanodots: The need for consistency. *Chem. Commun.*, 52(7), 1311–1326. <https://doi.org/10.1039/C5CC07754K>

- Chien, C. T., Li, S. S., Lai, W. J., Yeh, Y. C., Chen, H. A., Chen, I. S., Chen, L. C., Chen, K. H., Nemoto, T., Isoda, S., Chen, M., Fujita, T., Eda, G., Yamaguchi, H., Chhowalla, M., & Chen, C. W. (2012). Tunable photoluminescence from graphene oxide. *Angewandte Chemie - International Edition*, *51*(27), 6662–6666. <https://doi.org/10.1002/anie.201200474>
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., & Kollman, P. A. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, *117*(19), 5179–5197. <https://doi.org/10.1021/ja00124a002>
- Cruz, S. M. A., Girão, A. F., Gonçalves, G., & Marques, P. A. A. P. (2016). Graphene: The missing piece for cancer diagnosis? *Sensors (Switzerland)*, *16*(1). <https://doi.org/10.3390/s16010137>
- Curulli, A., Cusmà, A., Kaciulis, S., Padeletti, G., Pandolfi, L., Valentini, F., & Viticoli, M. (2006). Immobilization of GOD and HRP enzymes on nanostructured substrates. *Surface and Interface Analysis*, *38*(4), 478–481. <https://doi.org/10.1002/sia.2217>
- Dhale, D., & Sharma, J. (2023). *Recent Developments in Nanoscience and Nanotechnology: an overview* (pp. 83–95).
- Díez-Pascual, A. M. (2021). Carbon-Based Nanomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14), 7726. <https://doi.org/10.3390/ijms22147726>
- Dimiev, A. M., & Tour, J. M. (2014). Mechanism of Graphene Oxide Formation. *ACS Nano*, *8*(3), 3060–3068. <https://doi.org/10.1021/nn500606a>
- Ding, H., Li, X.-H., Chen, X.-B., Wei, J.-S., Li, X.-B., & Xiong, H.-M. (2020). Surface states of carbon dots and their influences on luminescence. *Journal of Applied Physics*, *127*(23). <https://doi.org/10.1063/1.5143819>
- Ehtesabi, H., Hallaji, Z., Najafi Nobar, S., & Bagheri, Z. (2020). Carbon dots with pH-responsive

- fluorescence: a review on synthesis and cell biological applications. *Microchimica Acta*, 187(2). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4091-4>
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Etefa, H. F., Tessema, A. A., & Dejene, F. B. (2024). Carbon Dots for Future Prospects: Synthesis, Characterizations and Recent Applications: A Review (2019–2023). *C*, 10(3), 60. <https://doi.org/10.3390/c10030060>
- Facure, M. H. M., Schneider, R., Mercante, L. A., & Correa, D. S. (2022). Rational hydrothermal synthesis of graphene quantum dots with optimized luminescent properties for sensing applications. *Materials Today Chemistry*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100755>
- Feicht, P., Biskupek, J., Gorelik, T. E., Renner, J., Halbig, C. E., Maranska, M., Puchtler, F., Kaiser, U., & Eigler, S. (2019). Brodie's or Hummers' Method: Oxidation Conditions Determine the Structure of Graphene Oxide. *Chemistry – A European Journal*, 25(38), 8955–8959. <https://doi.org/10.1002/chem.201901499>
- Freitas, C. D. T., Costa, J. H., Germano, T. A., de O. Rocha, R., Ramos, M. V., & Bezerra, L. P. (2024). Class III plant peroxidases: From classification to physiological functions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130306>
- Gascho, J. L. S., Costa, S. F., Recco, A. A. C., & Pezzin, S. H. (2019). Graphene oxide films obtained by vacuum filtration: X-ray diffraction evidence of crystalline reorganization. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 12–16. <https://doi.org/10.1155/2019/5963148>
- Geddes, C. D., & Lakowicz, J. R. (2015). *Reviews in Fluorescence* (C. D. Geddes (ed.)). Springer.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-24609-3> ISBN

- Gohlke, H., Hendlich, M., & Klebe, G. (2000). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, 295(2), 337–356. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3371>
- Gomez, I. (2012). *Síntesis y caracterización de grafeno químicamente reducido (CRG), empleando técnicas espectroscópicas y microscopía electrónica de barrido*. Universidad Industrial de Santander.
- Groeneveld, M., Catalán, N., Einarsdottir, K., Bravo, A. G., & Kothawala, D. N. (2022). The influence of pH on dissolved organic matter fluorescence in inland waters. *Analytical Methods*, 14(13), 1351–1360. <https://doi.org/10.1039/d1ay01702k>
- Gutiérrez, P. M. (2011). *Estudio de la polimerización de fenoles utilizando peroxidasas presentes en Rábano común (Raphanus sativus var sativus), con aplicación en la biorremediación de aguas residuales de una empresa textilera*. Escuela politécnica del ejercito.
- Habte, A. T., & Ayele, D. W. (2019). Synthesis and Characterization of Reduced Graphene Oxide (rGO) Started from Graphene Oxide (GO) Using the Tour Method with Different Parameters. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/5058163>
- Hammad, S., Bouaziz-Terrachet, S., Meghmem, R., & Meziane, D. (2020). Pharmacophore development, drug-likeness analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations for identification of new CK2 inhibitors. *Journal of Molecular Modeling*, 26(6), 160. <https://doi.org/10.1007/s00894-020-04408-2>
- Hashim, H. S., Fen, Y. W., Omar, N. A. S., Fauzi, N. I. M., & Daniyal, W. M. E. M. M. (2021). Recent advances of priority phenolic compounds detection using phenol oxidases-based

- electrochemical and optical sensors. *Measurement*, 184, 109855. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.109855>
- Herrera-Calderon, O., Yepes-Pérez, A. F., Quintero-Saumeth, J., Rojas-Armas, J. P., Palomino-Pacheco, M., Ortiz-Sánchez, J. M., Cieza-Macedo, E. C., Arroyo-Acevedo, J. L., Figueroa-Salvador, L., Peña-Rojas, G., & Andía-Ayme, V. (2020). Carvacrol: An in silico approach of a candidate drug on HER2, PI3K α , mTOR, HER- α , PR, and EGFR receptors in the breast cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8830665>
- Jakalian, A., Jack, D. B., & Bayly, C. I. (2002). Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry*, 23(16), 1623–1641. <https://doi.org/10.1002/jcc.10128>
- Jones, G., & Jackson, W. (1985). Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism. *The Journal of Physical Chemistry*, 89(2), 294–300. <https://doi.org/10.1021/j100248a024>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Jorgensen, W. L., & Tirado-Rives, J. (1988). The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, 110(6), 1657–1666. <https://doi.org/10.1021/ja00214a001>
- Kapral, R., & Ciccotti, G. (2005). Molecular dynamics. In *Theory and Applications of Computational Chemistry* (pp. 425–441). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978->

044451719-7/50059-7

- Khan, M. A., Kumar, A., Zhang, J., & Kumar, M. (2021). Recent advances and prospects in reduced graphene oxide-based photodetectors. *Journal of Materials Chemistry C*, 9(26), 8129–8157. <https://doi.org/10.1039/d1tc01306h>
- Kitagawa, T., & Hirota, S. (2006). Raman Spectroscopy of Proteins. *Biochemical Applications*, 1, 3426–3446. <https://doi.org/10.1002/9780470027325.s8202>
- Kondyurin, A. V, Naseri, P., Tilley, J. M. R., Nosworthy, N. J., Bilek, M. M. M., & Mckenzie, D. R. (2012). *Mechanisms for Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase on Ion-Beam-Treated Polyethylene*. 2012.
- Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., & Kim, S. J. (2013). The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon*, 53, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.10.013>
- Kudin, K. N., Ozbas, B., Schniepp, H. C., Prud'homme, R. K., Aksay, I. A., & Car, R. (2008). Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets. *Nano Letters*, 8(1), 36–41. <https://doi.org/10.1021/nl071822y>
- Lagos, K. J., García, D., Cuadrado, C. F., de Souza, L. M., Mezzacappo, N. F., da Silva, A. P., Inada, N., Bagnato, V., & Romero, M. P. (2023). Carbon dots: Types, preparation, and their boosted antibacterial activity by photoactivation. Current status and future perspectives. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 15(4). <https://doi.org/10.1002/wnan.1887>
- Lan, D., Li, B., & Zhang, Z. (2008). Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 934–938. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.064>
- Li, J., Zhang, L., Li, P., Zhang, Y., & Dong, C. (2018). One step hydrothermal synthesis of carbon

- nanodots to realize the fluorescence detection of picric acid in real samples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 258, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.096>
- Li, M., Cushing, S. K., Zhou, X., Guo, S., & Wu, N. (2012). Fingerprinting photoluminescence of functional groups in graphene oxide. *Journal of Materials Chemistry*, 22(44), 23374–23379. <https://doi.org/10.1039/c2jm35417a>
- Li, N., Than, A., Wang, X., Xu, S., Sun, L., Duan, H., Xu, C., & Chen, P. (2016). Ultrasensitive Profiling of Metabolites Using Tyramine-Functionalized Graphene Quantum Dots. *ACS Nano*, 10(3), 3622–3629. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b08103>
- Li, P., Roberts, B. P., Chakravorty, D. K., & Merz, K. M. (2013). Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(6), 2733–2748. <https://doi.org/10.1021/ct400146w>
- Li, Z., Sun, R., Ni, Y., & Kokot, S. (2014). A novel fluorescent probe involving a graphene quantum dot-enzyme hybrid system for the analysis of hydroquinone in the presence of toxic resorcinol and catechol. *Analytical Methods*, 6(18), 7420–7425. <https://doi.org/10.1039/C4AY01222D>
- Liu, J., Li, R., & Yang, B. (2020). Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Central Science*, 6(12), 2179–2195. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01306>
- Liu, Y., Roy, S., Sarkar, S., Xu, J., Zhao, Y., & Zhang, J. (2021). A review of carbon dots and their composite materials for electrochemical energy technologies. *Carbon Energy*, 3(5), 795–826. <https://doi.org/10.1002/cey2.134>
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer,

- S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., ... Karplus, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules*, 28(2), 661. <https://doi.org/10.3390/molecules28020661>
- Mansuriya, B. D., & Altintas, Z. (2021a). Enzyme-Free Electrochemical Nano-Immunosensor Based on Graphene Quantum Dots and Gold Nanoparticles for Cardiac Biomarker Determination. *Nanomaterials*, 11(3), 578. <https://doi.org/10.3390/nano11030578>
- Mansuriya, B. D., & Altintas, Z. (2021b). Carbon Dots: Classification, Properties, Synthesis, Characterization, and Applications in Health Care—An Updated Review (2018–2021). *Nanomaterials*, 11(10), 2525. <https://doi.org/10.3390/nano11102525>
- Martínez, M., Vivas, M., Marrero, S., Meléndez, W., Garbán, G., & Benavides, A. (2003). Características morfológicas y cristalográficas del grafito de Osumita, Venezuela, y su uso como geotermómetro. *Estudios Geológicos*, 59(5–6), 267–276. <https://doi.org/10.3989/egeol.03595-6103>
- Mekuye, B., & Abera, B. (2023). Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select*, 4(8), 486–501. <https://doi.org/10.1002/nano.202300038>

- Michael W Allen, T. F. S. M. W. I. U. S. a. (2010). *Measurement of Fluorescence Quantum Yields* (pp. 1–4).
- Miller, B. R., McGee, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. E. (2012). MMPBSA.py : An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3314–3321. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>
- Mogharrab, N., Ghourchian, H., & Amininasab, M. (2007). Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon Modification of Accessible Lysines: Experiments and Simulation. *Biophysical Journal*, 92(4), 1192–1203. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.092858>
- Mohammadi, S. A., Najafi, H., Zolgharnian, S., Sharifian, S., & Asasian-Kolur, N. (2022). Biological oxidation methods for the removal of organic and inorganic contaminants from wastewater: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, 843, 157026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157026>
- Morales-Urrea, D., López-Córdoba, A., & Contreras, E. M. (2023). Inactivation kinetics of horseradish peroxidase (HRP) by hydrogen peroxide. *Scientific Reports*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39687-1>
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63. <https://doi.org/10.1039/c6ra17788c>
- Moyo, M. (2014). Horseradish Peroxidase Biosensor to Detect Zinc Ions in Aqueous Solutions. *Open Journal of Applied Biosensor*, 03(01), 1–7. <https://doi.org/10.4236/ojab.2014.31001>
- Mushahary, N., Sarkar, A., Basumatary, F., Brahma, S., Das, B., & Basumatary, S. (2024). Recent developments on graphene oxide and its composite materials: From fundamentals to

- applications in biodiesel synthesis, adsorption, photocatalysis, supercapacitors, sensors and antimicrobial activity. *Results in Surfaces and Interfaces*, 15, 100225. <https://doi.org/10.1016/j.rsurfi.2024.100225>
- Muthurasu, A., & Ganesh, V. (2014). Horseradish Peroxidase Enzyme Immobilized Graphene Quantum Dots as Electrochemical Biosensors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(3), 945–959. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1019-7>
- Nasrollahzadeh, M., Issaabadi, Z., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Atarod, M. (2019). Chapter 2 - Types of Nanostructures. In M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi, & M. B. T.-I. S. and T. Atarod (Eds.), *An Introduction to Green Nanotechnology* (Vol. 28, pp. 29–80). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00002-X>
- Omietimi, H. B., Afolalu, S. A., Kayode, J. F., Monye, S. I., Lawal, S. L., & Emeteri, M. E. (2023). An overview of nanotechnology and its application. *E3S Web of Conferences*, 391, 01079. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202339101079>
- Ossonon, B. D., & Bélanger, D. (2017). Synthesis and characterization of sulfophenyl-functionalized reduced graphene oxide sheets. *RSC Advances*, 7(44), 27224–27234. <https://doi.org/10.1039/C6RA28311J>
- Ozyurt, D., Kobaisi, M. Al, Hocking, R. K., & Fox, B. (2023). Properties, synthesis, and applications of carbon dots: A review. *Carbon Trends*, 12, 100276. <https://doi.org/10.1016/j.cartre.2023.100276>
- Pan, D., Zhang, J., Li, Z., & Wu, M. (2010). Hydrothermal Route for Cutting Graphene Sheets into Blue-Luminescent Graphene Quantum Dots. *Advanced Materials*, 22(6), 734–738. <https://doi.org/10.1002/adma.200902825>
- Parrinello, M. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics

- method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7182. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Paun, I., Pascu, L. F., Iancu, V. I., Pirvu, F., Galaon, T., & Chiriac, F. L. (2024). Simultaneous Determination of 17 Phenolic Compounds in Surface Water and Wastewater Matrices Using an HPLC-DAD Method. *Environments*, 11(6), 117. <https://doi.org/10.3390/environments11060117>
- Rajender, G., & Giri, P. K. (2016). Formation mechanism of graphene quantum dots and their edge state conversion probed by photoluminescence and Raman spectroscopy. *J. Mater. Chem. C*, 4(46), 10852–10865. <https://doi.org/10.1039/C6TC03469A>
- Rao, N., Singh, R., & Bashambu, L. (2021). Carbon-based nanomaterials: Synthesis and prospective applications. *Materials Today: Proceedings*, 44, 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.593>
- Reihmann, M., & Ritter, H. (n.d.). Synthesis of Phenol Polymers Using Peroxidases. In *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers* (pp. 1–49). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/12_034
- Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K. M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., & Baranska, M. (2013). Raman spectroscopy of proteins: A review. In *Journal of Raman Spectroscopy* (Vol. 44, Issue 8, pp. 1061–1076). <https://doi.org/10.1002/jrs.4335>
- Saxena, S., Tyson, T. A., Shukla, S., Negusse, E., Chen, H., & Bai, J. (2011). Investigation of structural and electronic properties of graphene oxide. *Applied Physics Letters*, 99(1). <https://doi.org/10.1063/1.3607305>
- Schneider, R., Sharma, A. R., & Rai, A. (2008). *Introduction to Molecular Dynamics* (pp. 3–40). https://doi.org/10.1007/978-3-540-74686-7_1
- Scientific, T. (2018). Easy molecular bonding, crosslinking technology–Reactivity chemistries, applications and structure references. *Thermo Scientific Crosslinking Technical Handbook*.

Thermo Scientific, 1–56.

- Sharma, S., Tripathi, V. L., Dixit, V., Nagrami, F. ul H., Kumari, P., Singh, P., Chaubey, K. K., Pal, A. K., & Joshi, N. C. (2024). *Functionalization of Carbon-Based Nanoparticles for Various Applications* (pp. 59–81). https://doi.org/10.1007/978-981-97-0240-4_4
- Shin, M., Lim, J., Park, Y., Lee, J.-Y., Yoon, J., & Choi, J.-W. (2024). Carbon-based nanocomposites for biomedical applications. *RSC Advances*, *14*(10), 7142–7156. <https://doi.org/10.1039/D3RA08946K>
- Singh, U. C., & Kollman, P. A. (1984). An approach to computing electrostatic charges for molecules. *Journal of Computational Chemistry*, *5*(2), 129–145. <https://doi.org/10.1002/jcc.540050204>
- Sousa da Silva, A. W., & Vranken, W. F. (2012). ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Research Notes*, *5*(1), 367. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>
- Sprenger, K. G., Jaeger, V. W., & Pfaendtner, J. (2015). The General AMBER Force Field (GAFF) Can Accurately Predict Thermodynamic and Transport Properties of Many Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry B*, *119*(18), 5882–5895. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b00689>
- Storm, M. M., Johnsen, R. E., & Norby, P. (2016). In situ X-ray powder diffraction studies of the synthesis of graphene oxide and formation of reduced graphene oxide. *Journal of Solid State Chemistry*, *240*, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2016.05.019>
- Sun, H., Gao, N., Wu, L., Ren, J., Wei, W., & Qu, X. (2013). Highly photoluminescent amino-functionalized graphene quantum dots used for sensing copper ions. *Chemistry - A European Journal*, *19*(40), 13362–13368. <https://doi.org/10.1002/chem.201302268>
- Sun, L. (2019). Structure and synthesis of graphene oxide. *Chinese Journal of Chemical*

- Engineering*, 27(10), 2251–2260. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.05.003>
- Tang, Y., Moretti, R., & Meiler, J. (2024). Recent Advances in Automated Structure-Based De Novo Drug Design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 64(6), 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00247>
- Tao, S., Zhu, S., Feng, T., Zheng, C., & Yang, B. (2020). Crosslink-Enhanced Emission Effect on Luminescence in Polymers: Advances and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(25), 9826–9840. <https://doi.org/10.1002/anie.201916591>
- Tetsuka, H., Asahi, R., Nagoya, A., Okamoto, K., Tajima, I., Ohta, R., & Okamoto, A. (2012). Optically tunable amino-functionalized graphene quantum dots. *Advanced Materials*, 24(39), 5333–5338. <https://doi.org/10.1002/adma.201201930>
- Thermoscientific. (n.d.). *Intructions EDC*. <https://www.thermoscientific.com/>
- Trikkaliotis, D. G., Christoforidis, A. K., Mitropoulos, A. C., & Kyzas, G. Z. (2021). Graphene Oxide Synthesis, Properties and Characterization Techniques: A Comprehensive Review. *ChemEngineering*, 5(3), 64. <https://doi.org/10.3390/chemengineering5030064>
- Valdés-Tresanco, M. S., Valdés-Tresanco, M. E., Valiente, P. A., & Moreno, E. (2021). gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(10), 6281–6291. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & Mackerell, A. D. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, 31(4), 671–690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>

- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, *65*(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Vempati, S., & Uyar, T. (2014). Fluorescence from graphene oxide and the influence of ionic, π – π interactions and heterointerfaces: electron or energy transfer dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *16*(39), 21183–21203. <https://doi.org/10.1039/C4CP03317E>
- Ventrella, A., Camisasca, A., Fontana, A., & Giordani, S. (2020). Synthesis of green fluorescent carbon dots from carbon nano-onions and graphene oxide. *RSC Advances*, *10*(60), 36404–36412. <https://doi.org/10.1039/d0ra06172g>
- Vidal-Limon, A., Aguilar-Toalá, J. E., & Liceaga, A. M. (2022). Integration of Molecular Docking Analysis and Molecular Dynamics Simulations for Studying Food Proteins and Bioactive Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(4), 934–943. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06110>
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
- Wang, Q., Zheng, H., Long, Y., Zhang, L., Gao, M., & Bai, W. (2011). Microwave–hydrothermal synthesis of fluorescent carbon dots from graphite oxide. *Carbon*, *49*(9), 3134–3140. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.03.041>
- Wei, B., Zhong, H., Wang, L., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, J., Xu, C., He, L., & Wang, H. (2019). Facile preparation of a collagen-graphene oxide composite: A sensitive and robust electrochemical aptasensor for determining dopamine in biological samples. *International Journal of Biological Macromolecules*, *135*, 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.176>

- Wei, G., Yu, J., Gu, M., & Tang, T. B. (2016). Dielectric relaxation and hopping conduction in reduced graphite oxide. *Journal of Applied Physics*, *119*(22). <https://doi.org/10.1063/1.4953357>
- Wong, X. Y., Quesada-González, D., Manickam, S., New, S. Y., Muthoosamy, K., & Merkoçi, A. (2021). Integrating gold nanoclusters, folic acid and reduced graphene oxide for nanosensing of glutathione based on “turn-off” fluorescence. *Scientific Reports*, *11*(1), 2375. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81677-8>
- Wu, C., Liu, Z., Sun, H., Wang, X., & Xu, P. (2016). Selective determination of phenols and aromatic amines based on horseradish peroxidase-nanoporous gold co-catalytic strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 843–849. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.026>
- Xiao, X., Zhang, Y., Zhou, L., Li, B., & Gu, L. (2022). Photoluminescence and Fluorescence Quenching of Graphene Oxide: A Review. *Nanomaterials*, *12*(14). <https://doi.org/10.3390/nano12142444>
- Xu, H., Yang, X., Li, G., Zhao, C., & Liao, X. (2015). Green Synthesis of Fluorescent Carbon Dots for Selective Detection of Tartrazine in Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(30), 6707–6714. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02319>
- Yu, W., Sisi, L., Haiyan, Y., & Jie, L. (2020). Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: a review. *RSC Advances*, *10*(26), 15328–15345. <https://doi.org/10.1039/D0RA01068E>
- Zhang, J., Clennell, M. B., & Dewhurst, D. N. (2023). Transport Properties of NaCl in Aqueous Solution and Hydrogen Solubility in Brine. *The Journal of Physical Chemistry B*, *127*(41), 8900–8915. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c03863>
- Zhang, Q., Wang, R., Feng, B., Zhong, X., & Ostrikov, K. (2021). Photoluminescence mechanism

of carbon dots: triggering high-color-purity red fluorescence emission through edge amino protonation. *Nature Communications*, *12*(1), 6856. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27071-4>

Zhi, B., Yao, X. X., Cui, Y., Orr, G., & Haynes, C. L. (2019). Synthesis, applications and potential photoluminescence mechanism of spectrally tunable carbon dots. *Nanoscale*, *11*(43), 20411–20428. <https://doi.org/10.1039/c9nr05028k>

Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J., & Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Research*, *8*(2), 355–381. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3>

Apéndices

Apéndice A. Protocolo para las simulaciones de acoplamiento molecular del sistema GODs-HRP-fenol.

Las simulaciones de acoplamiento molecular se llevaron a cabo con la finalidad de explorar la conservación del sitio activo de la proteína HRP una vez funcionalizada con la lámina GODs. Para este propósito se realizaron tres etapas: *i*) preparación de las estructuras de partida del ligando (fenol) y el receptor (HRP libre y GODs-HRP); *ii*) condiciones de simulación de acoplamiento molecular; *iii*) análisis de los resultados.

A1. Preparación del ligando y el receptor

La estructura del ligando fue previamente dibujada con el programa ChemSketch (<https://www.acdlabs.com/>) y exportado en formato MOL. Posteriormente, se usó el módulo *Dock_Prep* implementado en el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) para agregar hidrógenos, optimizar su estructura y asignar cargas atómicas bajo el esquema AM1-BCC con el subprograma *Antechamber*. Posteriormente, la estructura final del ligando fue exportada en formato MOL2.

En cuanto al receptor, se consideraron dos tipos de receptores, el primero correspondiente a la proteína HRP libre formada por la unidad proteica y el grupo Hemo; mientras que el segundo correspondió al sistema funcionalizado GODs-HRP. Lo anterior para explorar la conservación del sitio activo de la HRP luego de la funcionalización. En el caso de la HRP, su preparación consistió en tomar inicialmente la estructura nativa (PDB ID: 1HCH) preparada en la etapa de las simulaciones MD y llevar a cabo una optimización de su geometría usando el programa

GROMACS. Posteriormente, se usó el programa UCSF Chimera para preparar tres archivos: dos archivos en formato MOL2 (el primero contenía únicamente átomos pesados y el segundo contenía todos los átomos incluidos hidrógenos), un tercer archivo en formato DMS que fue usado posteriormente para generar la superficie de contacto del receptor. Para el caso del segundo receptor, correspondiente a la funcionalización GODs-HRP, se usaron los resultados de la etapa de producción MD de las configuraciones S7 y S11. Estas últimas fueron seleccionadas debido a que presentaron la menor energía libre de Gibbs relativa. En este sentido, las coordenadas atómicas fueron extraídas de las simulaciones MD cada 20 ns. Seguidamente se realizó un cálculo de minimización de la energía con el programa GROMACS y los resultados finales fueron cargados con UCSF Chimera para finalmente generar los archivos MOL2 y DMS descritos anteriormente.

A2. Condiciones de simulaciones de acoplamiento molecular

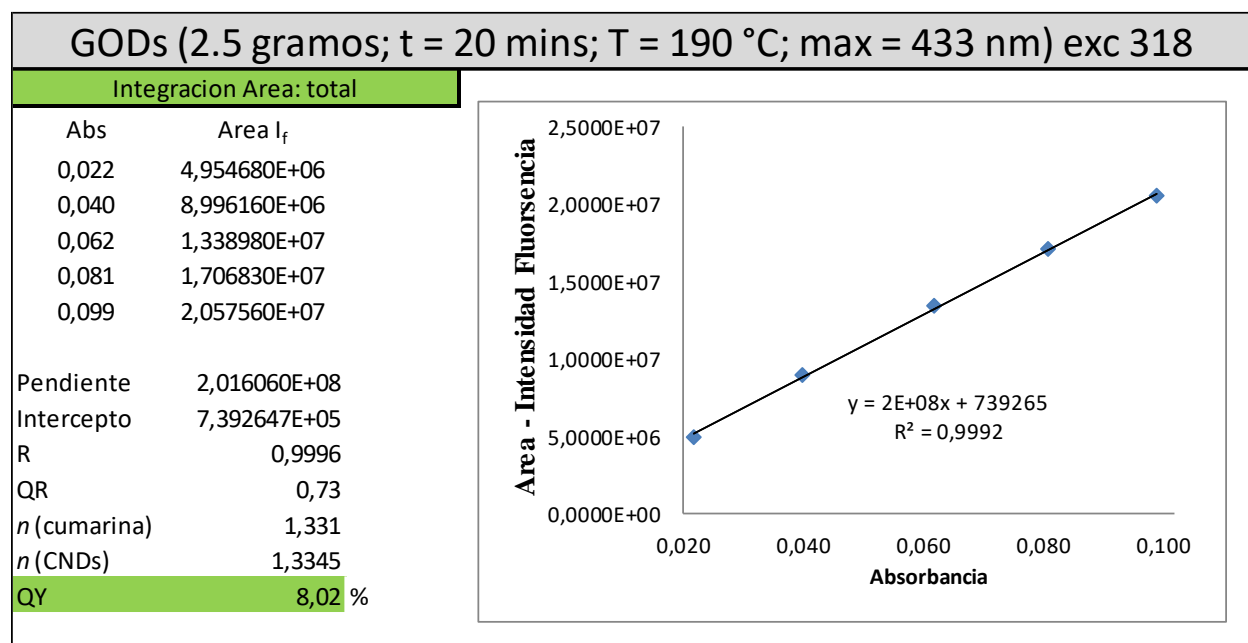
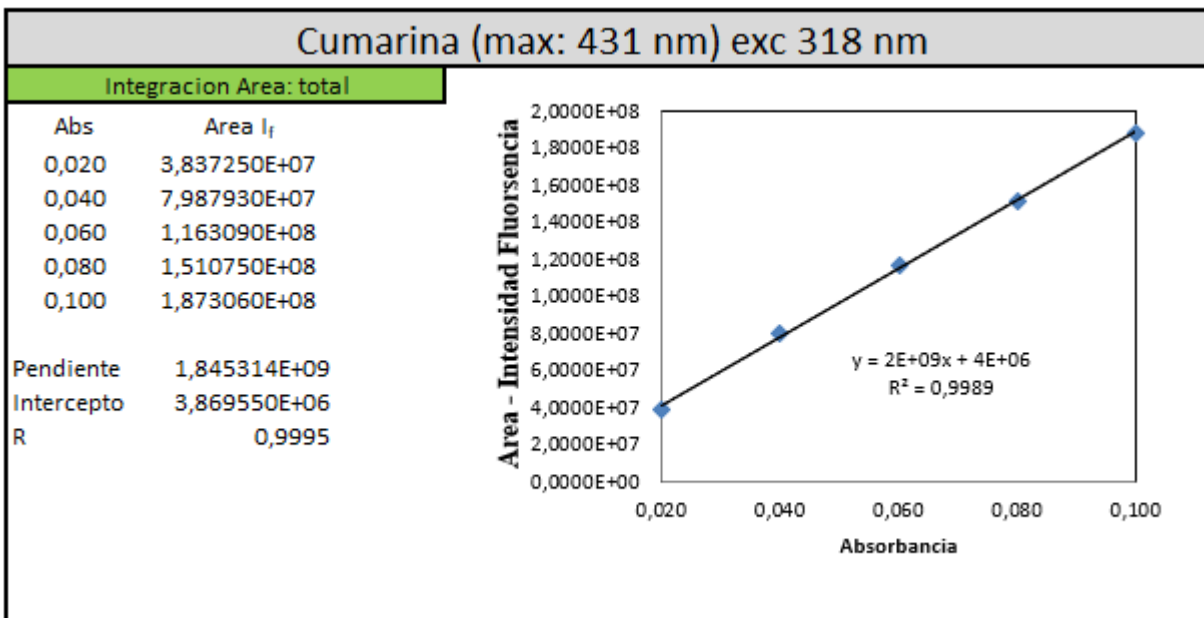
Todas las simulaciones de acoplamiento molecular fueron llevadas a cabo con el programa DOCK V6.9 (Allen et al., 2015). Este programa fue escogido debido a que permite usar los parámetros FF *amber99ff* empleados en las simulaciones MD. Brevemente, previo a los cálculos de acoplamiento molecular se determinó la superficie molecular del receptor usando los archivos MDS con un radio de prueba de 1.4 Å. Posteriormente, el subprograma *sphgen* fue usado para generar las esferas de contacto del receptor y seguidamente se seleccionaron aquellas que estuvieran en un radio de corte de 10 Å en torno al átomo de hierro del grupo Hemo que fueron usadas para definir el sitio activo del receptor. Una vez definido el sitio activo, se usó el subprograma *showbox* para construir una caja tridimensional que rodeara las esferas seleccionadas y usando un margen de distancia adicional de 8 Å. Finalmente, el subprograma *grid* fue usado para pre-calcular las energías de interacción entre un átomo de prueba (dummy) y todos los átomos del

receptor con un espaciado de 0.3 Å. Para estas simulaciones, se usó potenciales de Lennard-Jones con exponentes atractivos-repulsivos 6-9; mientras que las interacciones de cargas fueron modeladas con un potencial de Coulomb dependiente de la constante dieléctrica del medio del orden $\epsilon = 4r$; siendo r la distancia de separación entre pares de átomos. una vez definida todas las condiciones de simulación, se realizaron los cálculos de acoplamiento molecular usando la función de puntuación *grid_score* implementado en el programa DOCK.

A3. Análisis de los resultados de acoplamiento molecular

Posterior a las simulaciones de acoplamiento molecular, se procedió a realizar un análisis de los resultados. Para este propósito, se seleccionaron los resultados que exhibieran el menor valor de la función de puntuación *grid_score* como la más favorable. Posteriormente, se realizó un análisis estructural de las interacciones entre el receptor y el ligando usando los programas VMD y Discovery Studio Visualizer.

Apéndice B. Método comparativo para el cálculo del rendimiento cuántico de GODs.



Apéndice C. Constantes cinéticas y actividad específica de los sistemas funcionalizados GODs-HRP: condición 1, 2 y 3.

Catalizador	U/mg Ensayo 1	U/mg Ensayo 2	U/mg Ensayo 3	Promedio	SD	%Recuperación¹
GODs-HRP cond 1	93,0	136,8	89,3	106,4	26,4	57%
GODs-HRP cond 2	67,2	71,9	65,2	68,1	3,5	36%
GODs-HRP cond 3	61,0	71,7	65,1	65,9	5,4	35%

¹ %Recuperación con respecto al valor promedio de la actividad específica de la HRP libre
187,4 U/mg

Apéndice D. Resultados de RMSD, R_G y RMSF a partir de 100 ns de simulaciones MD para la funcionalización GODs-HRP

Figura D.1

RMSD, R_G y RMSF para las configuraciones S1-S4.

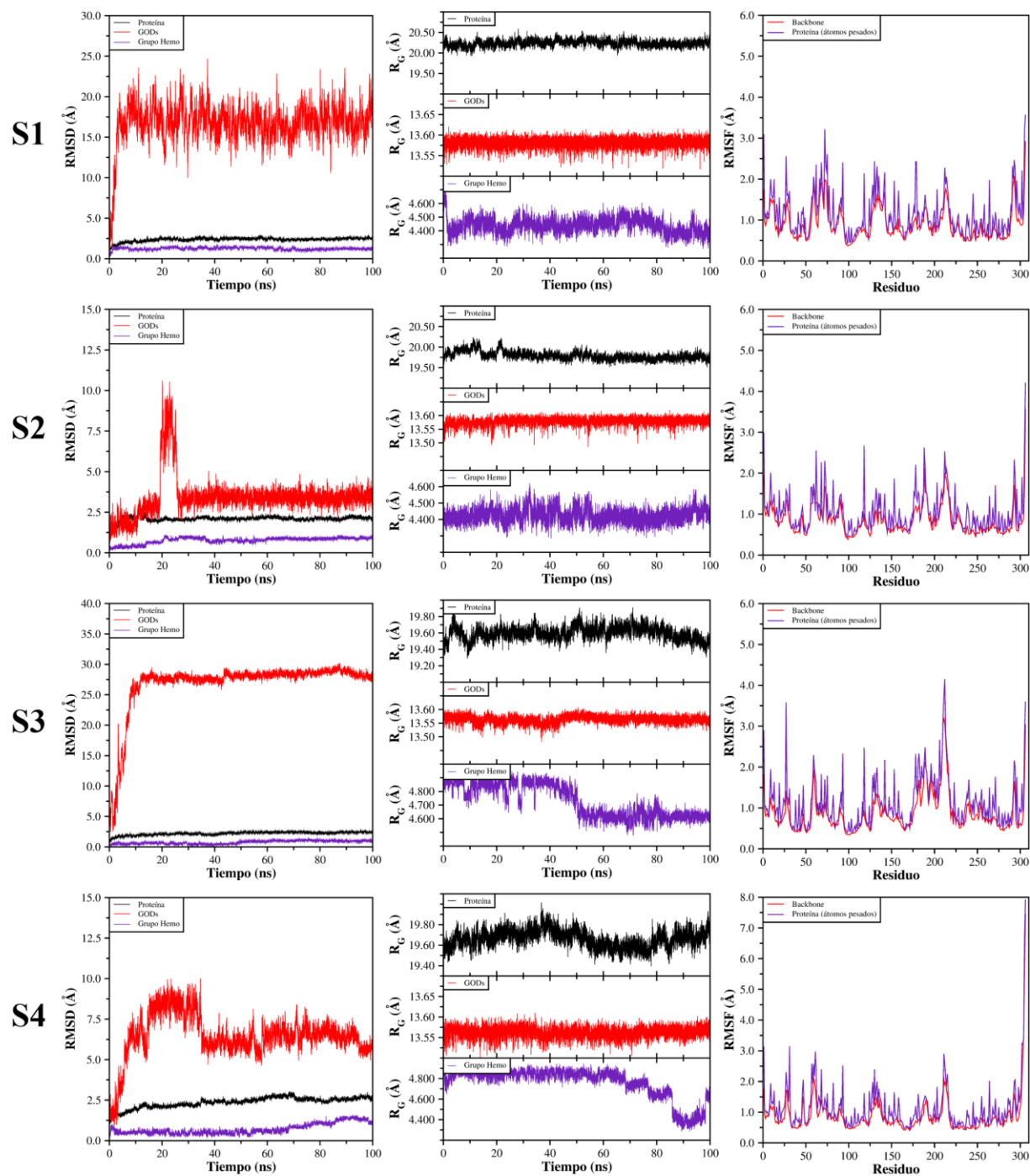


Figura D.2

RMSD, R_G y RMSF para las configuraciones S5-S8.

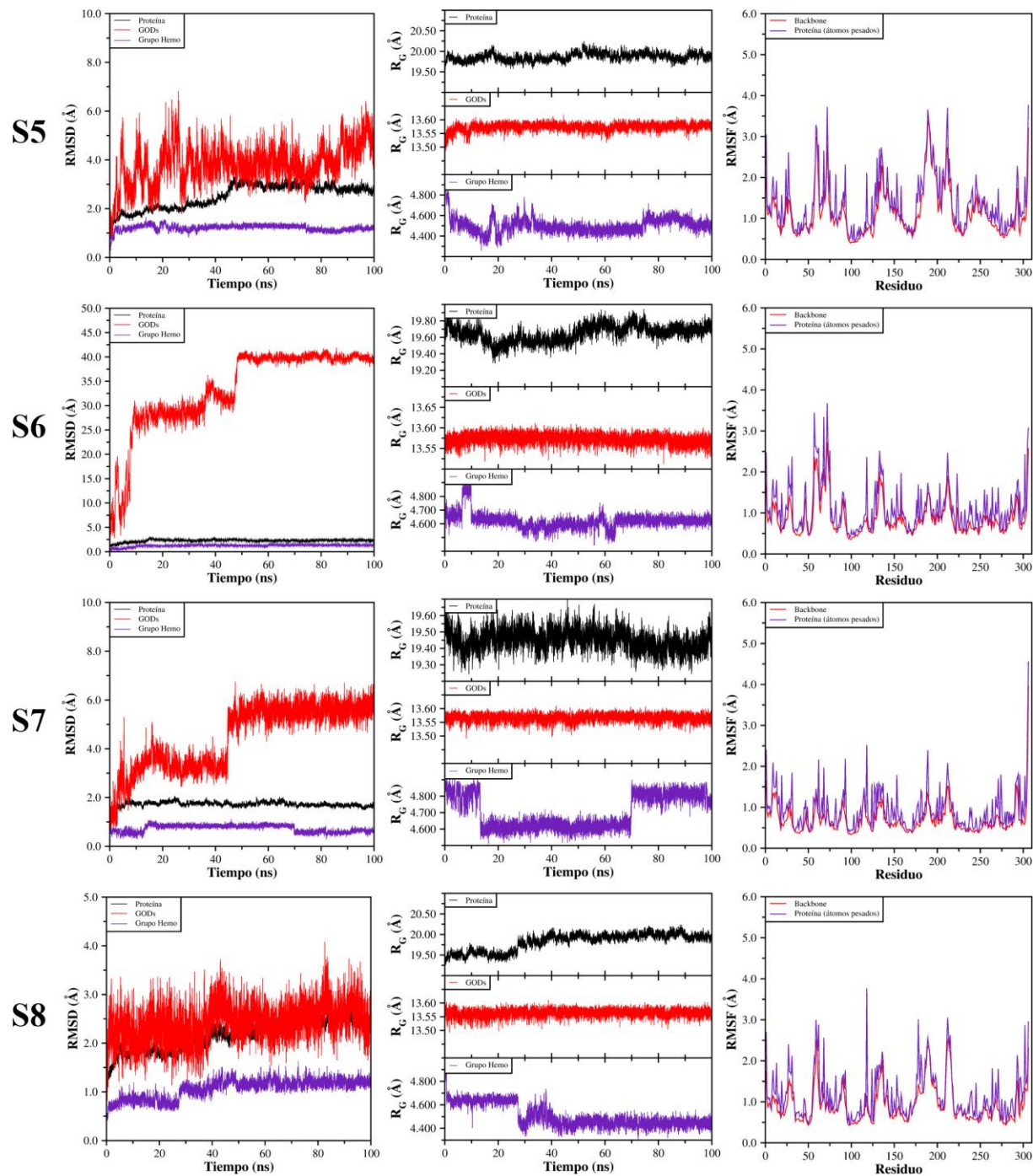


Figura D.3.

RMSD, R_G y RMSF para las configuraciones S9-12

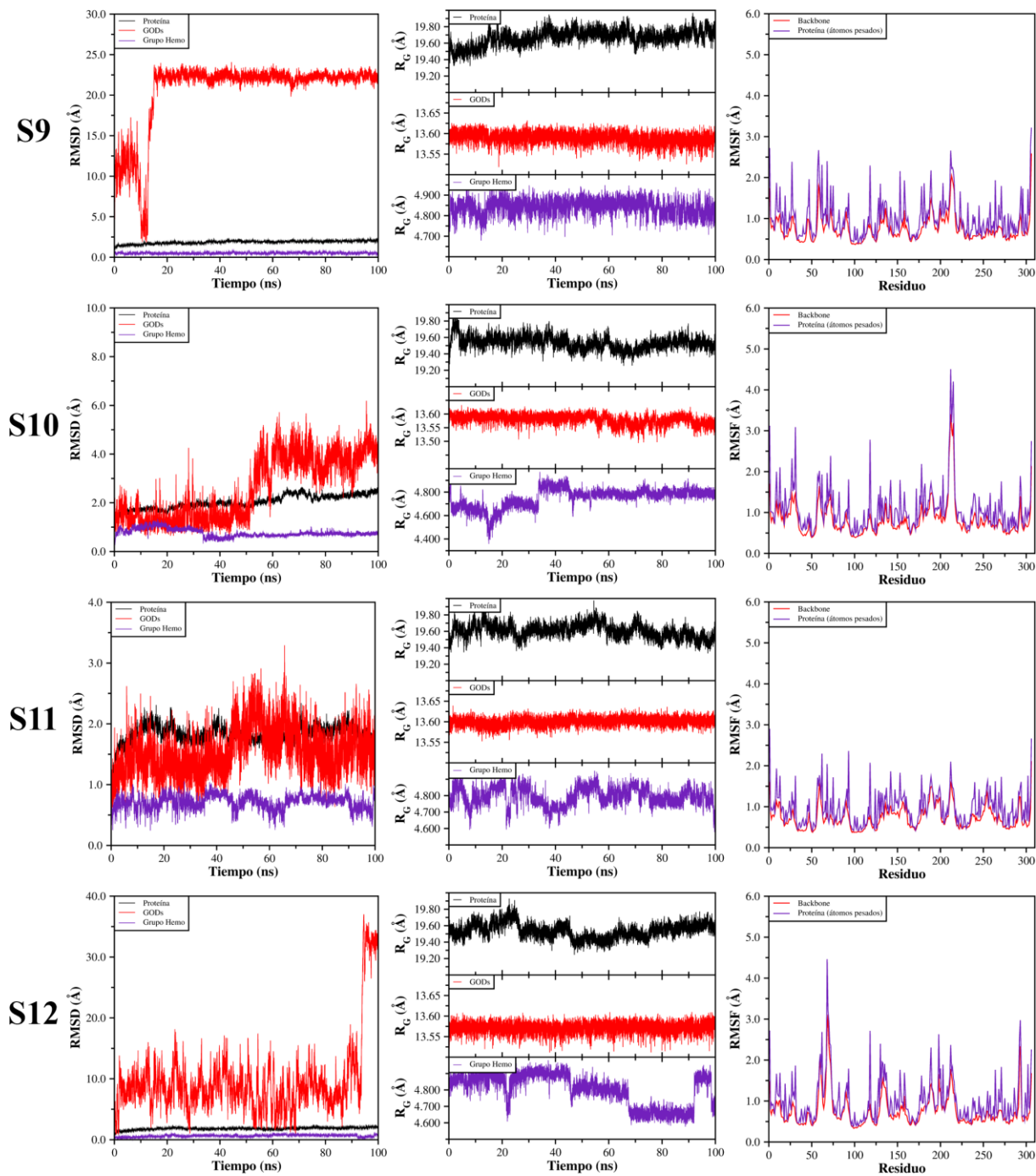


Figura D.4

RMSD, R_G y RMSF para las configuraciones S13-S16

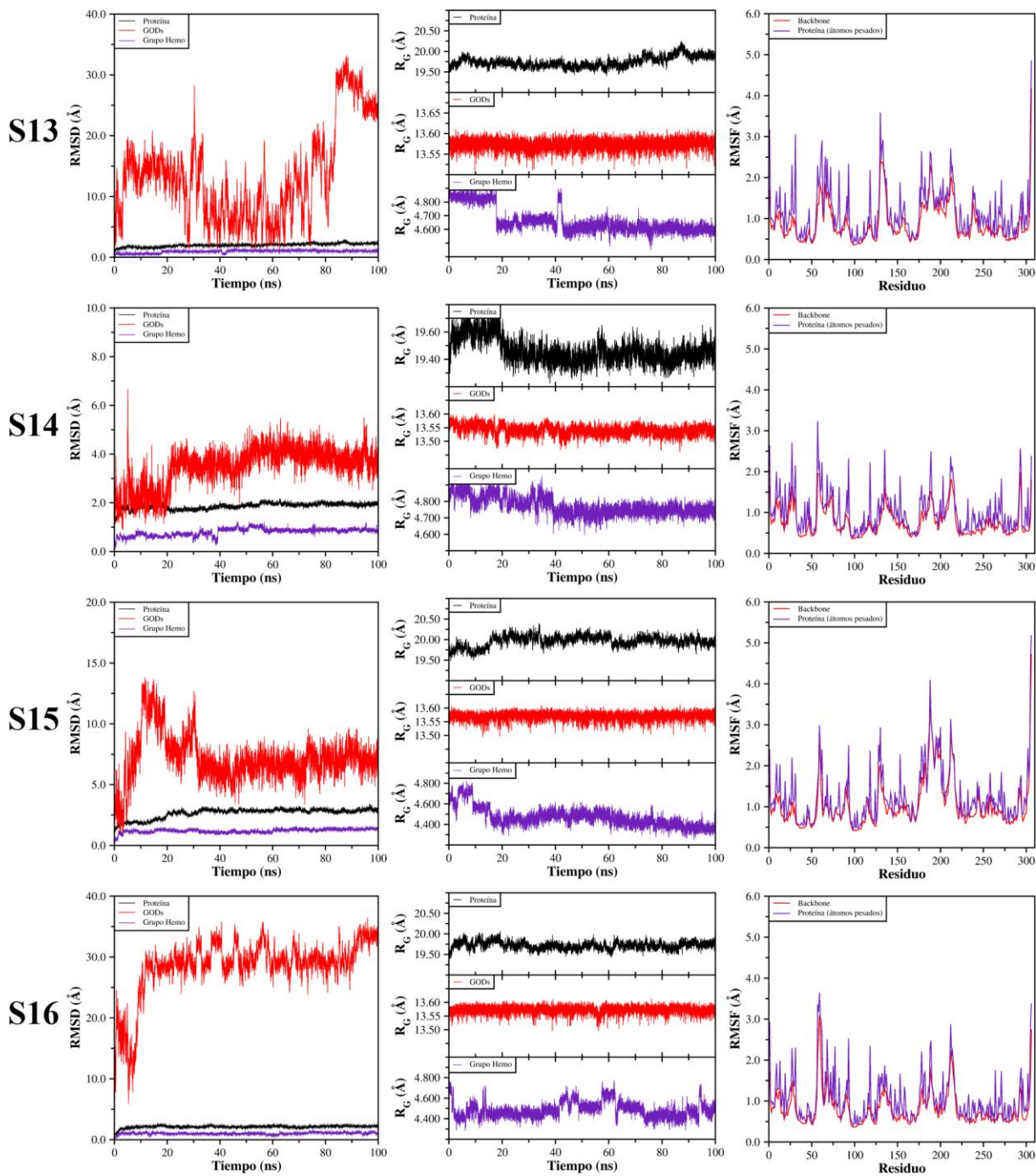
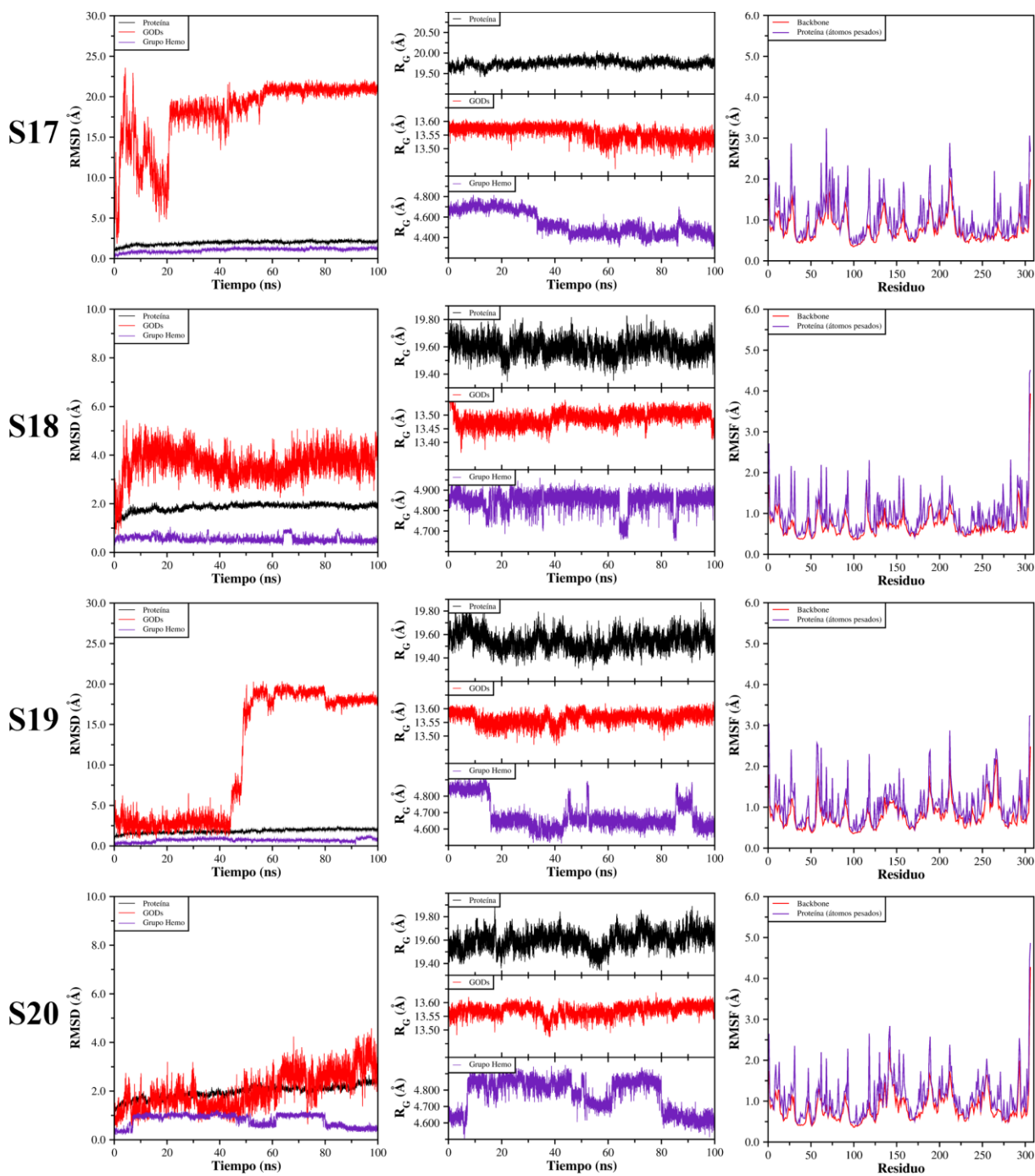


Figura D.5

RMSD, R_G y RMSF para las configuraciones S17-S20



Apéndice E. Perfiles de distribución de frecuencias de puentes de hidrógeno entre el GODs y la enzima HRP.

Figura E.1

Perfiles de distribución de frecuencia de puentes de hidrógeno de la interfaz GODs-HRP a partir de simulaciones MD

