

Desarrollo de un biosensor electroquímico usando un péptido como elemento de reconocimiento biológico inmovilizado en nanotubos de carbono para la detección de mercurio en matrices

acuosas

Ing. María Alejandra Galvis Vargas

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Ingeniería Química

Director

Julio Andrés Pedraza Avella

Doctor en Química

Codirector

Jose Luis Roperro Vega

Doctor en Química

Asesora

Johanna Marcela Flórez Castillo

Doctora en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Fisicoquímica

Escuela de Ingeniería Química

Maestría en Ingeniería Química

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

A Dios, por ser guía en mi camino, luz para mi espíritu y por darme la fe inquebrantable en mí misma para alcanzar mis metas.

A mi familia, por su apoyo moral de cada día; especialmente a mi hermana, por ser quien me impulsó a continuar con mis estudios.

A mi novio, Nicolás, por ser ese apoyo firme e inamovible que siempre me sostuvo, me animó y también me señaló lo necesario para mejorar.

Agradecimientos

A mi director, el *profesor Julio* por escucharme y darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de investigación en un tema de mi interés y con un enfoque diferente para el grupo de investigación.

A mi codirector y asesora de tesis, especialmente al *profesor Jose* por su dedicación y acompañamiento constante, además de su paciencia infinita para ayudarme con todas las preguntas que surgieron a lo largo del camino y lo más importante, por todo el apoyo moral que me dio en mis días de crisis.

A los maravillosos integrantes del Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente (GIMBA), en particular a *Viviana Rojas, Yury López, Diana Cañas* y *Ximena Vera* por cada una de las vivencias compartidas, las sonrisas, las frustraciones y toda la comida deliciosa que pudimos compartir.

A mis compañeros y amigos de maestría *Yuly Rojas, Marcos Carrillo, Valentina Gómez* y *Nicolas Cabrera* por hacernos compañía en esta travesía donde muchas veces reímos, sufrimos, nos quejamos y compartimos nuestro cansancio, pero al final luchamos por conseguir nuestros objetivos.

Mi más sincero agradecimiento a los diferentes grupos de investigación y laboratorios del Parque Tecnológico de Guatiguará – UIS que siempre estuvieron prestos a brindarme su ayuda ante cualquier obstáculo.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Marco teórico	18
1.1 Mercurio.....	18
1.1.1 Toxicidad del mercurio	18
1.1.2 Mercurio (II)	18
1.1.3 Metilmercurio (MeHg).....	19
1.1.4 Límites máximos permisibles de mercurio en Colombia.....	19
1.2 Biosensores	20
1.2.1 Clasificación de los biosensores	20
1.2.2 Biosensores electroquímicos.....	20
1.2.3 Técnicas electroquímicas	22
1.3 Péptidos como elemento de reconocimiento.....	24
1.3.1 Métodos de inmovilización	24
1.4 Nanotubos de carbono (NTC's)	25
1.5 Bioinformática estructural.....	26
2. Estado del arte	27
2.1 Simulación bioinformática.....	27
2.2 Desarrollo de biosensores	28
3. Hipótesis	33
4. Objetivos.....	34
4.1 Objetivo General	34

4.2 Objetivos Específicos.....	34
5. CAPÍTULO 1: DISEÑO DEL ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO	35
5.1 Metodología	35
5.1.1 Modificación de la secuencia peptídica	35
5.1.2 Diseño de la estructura molecular	36
5.1.3 Docking molecular (interacción péptido-ligando)	37
5.2 Resultados y discusión	37
5.2.1 Modelos estructurales	37
5.2.2 Desviación cuadrática media en secuencias peptídicas	40
5.2.3 Selección de la estructura peptídica	42
5.2.4 Conclusiones parciales.....	44
6. CAPÍTULO 2: CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO	45
6.1 Metodología	45
6.1.1 Caracterización del electrodo serigrafiado (SPE)	45
6.1.2 Nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT's).....	46
6.1.2.1 Deposición de MWCNT's al electrodo serigrafiado.....	47
6.1.2.2 Caracterización SPE/MWCNT	48
6.1.3 Preparación del ensamblado del biosensor electroquímico	48
6.1.3.1 Preparación de la secuencia peptídica.....	48
6.1.3.2 Preparación de los nanotubos de carbono para inmovilización al péptido	48
6.1.3.3 Inmovilización de MWCNT a la secuencia peptídica	49
6.1.3.4 Deposición SPE/MWCNT/PÉPTIDO.....	50
6.1.4 Caracterización electroquímica del biosensor.....	51

6.2 Resultados y discusión	51
6.2.1 Caracterización preliminar SPE	51
6.2.1.1 Caracterización y composición morfológica.....	51
6.2.1.2 Voltametrías cíclicas	52
6.2.1.3 Determinación del área electroactiva del SPE	54
6.2.2 Caracterización SPE/MWCNT	56
6.2.2.1 Dispersión de los nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT).....	56
6.2.2.2 Voltametrías cíclicas MWCNT/SPE.....	57
6.2.3 Caracterización SPE/MWCNT/PÉPTIDO.....	59
6.2.3.1 Porcentaje de inmovilización	59
6.2.3.2 Análisis de FTIR	61
6.2.3.3 Selección de la concentración de péptido	63
6.2.3.4 Diagrama de Pourbaix.....	66
6.2.3.5 Comparación de secuencias DGPFHR y DGPEFER.....	68
6.2.3.6 Caracterización morfológica	70
6.2.4 Conclusiones parciales.....	72
7. CAPÍTULO 3: PARÁMETROS DE DETECCIÓN DEL BIOSENSOR.....	74
7.1 Metodología	74
7.1.1 Condiciones de la técnica electroquímica.....	74
7.1.2 Curva de calibración	75
7.1.3 Estabilidad y reproducibilidad	75
7.1.4 Selectividad.....	76
7.2 Resultados y discusión	76

7.2.1 Selección de variables de trabajo	76
7.2.2 Calibración del biosensor electroquímico.....	79
7.2.3 Límite de detección y límite de cuantificación	82
7.2.4 Estabilidad y reproducibilidad	83
7.2.5 Selectividad	84
7.2.6 Conclusiones parciales.....	86
Conclusiones.....	87
Recomendaciones	89
Referencias Bibliográficas	90
Apéndices.....	100

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Límites máximos permisibles de mercurio</i>	19
Tabla 2 <i>Biosensores según el tipo de transducción electroquímica</i>	22
Tabla 3 <i>Tipos de técnicas electroquímicas</i>	23
Tabla 4 <i>Estado del arte en el desarrollo de biosensores para la detección de mercurio (II)</i>	29
Tabla 5 <i>Características de la secuencia peptídica</i>	31
Tabla 6 <i>Modificaciones (Mod.) planteadas de secuencias peptídicas</i>	36
Tabla 7 <i>Estructuras moleculares de las secuencias peptídicas planteadas</i>	38
Tabla 8 <i>Desviación cuadrática media de las posiciones atómicas</i>	40
Tabla 9 <i>Energía de enlace resultante del acoplamiento molecular</i>	42
Tabla 10 <i>Corrientes pico de oxidorreducción para el sistema $K_3Fe(CN)_6$ y $HgCl_2$</i>	54
Tabla 11 <i>% de inmovilización de la secuencia peptídica a los nanotubos de carbono</i>	61
Tabla 12 <i>Estabilidad del biosensor electroquímico a pH neutro a una concentración de $HgCl_2$ de 5,0 ppm</i>	83

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 <i>Componentes de un biosensor</i>	21
Figura 2 <i>Clasificación de los métodos de inmovilización</i>	25
Figura 3 <i>Alótropos de carbono</i>	26
Figura 4 <i>Clasificación de los métodos de inmovilización</i>	30
Figura 5 <i>Resultado del docking molecular con el software AutoDock</i>	43
Figura 6 <i>Electrodo serigrafiado (SPE) marca Italsens IS-C</i>	46
Figura 7 <i>Técnica de drop-casting</i>	47
Figura 8 <i>Inmovilización SPE/MWCNT/PÉPTIDO</i>	49
Figura 9 <i>Micrografías SEM con aumento de 100000x y escala de 1 μm para (A) morfología y (B) mapeo elemental de carbono (C) del SPE</i>	52
Figura 10 <i>Voltametrías cíclicas del electrodo serigrafiado sin modificar en concentraciones de (A) KCl 0,1 M, (B) K₃Fe(CN)₆ 0,005 M y (C) HgCl₂ 0,005 M (1352 ppm)</i>	53
Figura 11 <i>Montaje para la dispersión de los MWCNT en agua</i>	56
Figura 12 <i>Dispersión de 800 μg/mL de MWCNT en agua después de 2 semanas de preparación</i>	57
Figura 13 <i>Voltametrías cíclicas a velocidad de barrido de 30 mV/s y electrolito KCl 0,1 M en configuración MWCNT/SPE de (A) K₃Fe(CN)₆ 0,005 M y (B) HgCl₂ 0,005 M</i>	58
Figura 14 <i>Voltametría cíclica a velocidad de barrido de 30 mV/s usando como electrolito KCl 0,1 M en configuración MWCNT_{7,5μg/mL}/SPE de K₃Fe(CN)₆ 0,005 M</i>	59

Figura 15 *Espectros UV-VIS del método de Bradford para la secuencia DGPFHR y DGPFHR/MWCNT_{7,5µg/mL} en concentraciones peptídicas de: (A) 0,1 µM, (B) 0,5 µM, (C) 1,0 µM, (D) 5,0 µM y (E) 10,0 µM* 60

Figura 16 *Espectro FTIR-ATR de la configuración SPE/MWCNT y SPE/MWCNT/DGPEFER, correspondiente a una concentración de 7,5 µg/mL de MWCNT y 0,1 µM de DGPEFER*..... 62

Figura 17 *Voltametrías cíclicas registradas a una velocidad de barrido de 30 mV/s en presencia de 1 ppm de HgCl₂, utilizando como electrolito una solución de KCl 0,1 M y la configuración DGPFHR/MWCNT/SPE. Se evaluaron tres condiciones de pH: 2,25, 6,88 y 11,89, para las siguientes concentraciones de DGPFHR: (A) 0,1 µM, (B) 0,5 µM, (C) 1,0 µM y (D) 5,0 µM*..... 63

Figura 18 *Voltametrías cíclicas (30 mV/s) en configuración SPE/MWCNT/DGPEFER con 1 ppm de HgCl₂ y KCl 0,1 M como electrolito, evaluadas a pH 2,25, 6,88 y 11,89 para distintas concentraciones de DGPEFER: (A) 0,1 µM, (B) 0,5 µM, (C) 1,0 µM, y (D) 5,0 µM*..... 65

Figura 19 *Diagrama de equilibrio potencial-pH a 25°C para el sistema Hg²⁺-Cl⁻-H₂O a partir de una solución de HgCl₂ 3,68 × 10⁻⁶ M (1 ppm) y KCl 0,1 M*..... 67

Figura 20 *Voltametrías cíclicas registradas a una velocidad de barrido de 30 mV/s, utilizando como electrolito una solución de KCl 0,1 M a pH 6,88, MWCNT (7,5 µg/mL), DGPFHR y DGPEFER (0,1 µM) para la configuración SPE/MWCNT/PÉPTIDO en las siguientes concentraciones de HgCl₂, (A) 1 ppm (B) 10 ppm (C) 100 ppm*..... 69

Figura 21 *Micrografías SEM con detector ETD (100 µm) y aumento de 500x para (A) SPE y (B) SPE/MWCNT/DGPEFER*..... 71

Figura 22 *Micrografías SEM con aumento de 50000x y escala de 2 µm para la configuración SPE/MWCNT/DGPEFER en (A) morfología y (B) mapeo elemental de carbono (C) mapeo elemental de nitrógeno y (D) mapeo elemental de oxígeno*..... 72

Figura 23 *Voltametrías de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} µg/mL/DGPEFER_{0,1} µM a 10 ppm de HgCl₂ y KCl 0,1 M como electrolito soporte para distintos tiempos de preconcentración para: (A) pH neutro y (B) pH básico, a un potencial de preconcentración de -0,5 V.....* 76

Figura 24 *Voltametrías de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} µg/mL/DGPEFER_{0,1} µM a 10 ppm de HgCl₂ y KCl 0,1 M como electrolito para distintos voltajes de preconcentración para: (A) pH neutro (t_{preconcentración} 60 s) y (B) pH básico (t_{preconcentración} 90 s).....* 78

Figura 25 *Voltametrías de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} µg/mL/DGPEFER_{0,1} µM, utilizando KCl 0,1 M como electrolito, frente a distintas concentraciones de cloruro de mercurio (II) (0, 0,01; 0,50; 2,50; 5,00; 7,50 y 10,0 ppm) en: (A) pH neutro, (B) pH básico, (C) curva de calibración a pH neutro y (D) curva de calibración a pH básico.* 79

Figura 26 *Voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} µg/mL/DGPEFER_{0,1} µM, utilizando KCl 0,1 M como electrolito soporte (blanco).....* 81

Figura 27 *Reproducibilidad del biosensor electroquímico en pH neutro (concentración: 2,50 ppm HgCl₂)* 84

Figura 28 *Voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} µg/mL/DGPEFER_{0,1} µM, utilizando KCl 0,1 M como electrolito a pH neutro, frente a concentraciones 5 ppm de Pb(NO₃)₂, MnSO₄·H₂O y HgCl₂* 85

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Estructuras moleculares seleccionadas para el acoplamiento con iones de Hg^{2+} ..	100
Apéndice B. Voltametrías cíclicas registradas a una velocidad de barrido de 30 mV/s, utilizando como electrolito una solución de KCl 0,1 M a pH básico de 11,89, MWCNT (7,5 μ g/mL), DGPFHR y DGPEFER (0,1 μ M) para la configuración PÉPTIDO/MWCNT/SPE en las siguientes concentraciones de $HgCl_2$, (A) 1 ppm (B) 10 ppm (C) 100 ppm.....	101

Resumen

Título: Desarrollo de un biosensor electroquímico usando un péptido como elemento de reconocimiento biológico inmovilizado en nanotubos de carbono para la detección de mercurio en matrices acuosas *

Autor: María Alejandra Galvis Vargas, Julio Andrés Pedraza Avella, Jose Luis Roperó Vega y Johanna Marcela Flórez Castillo **

Palabras Clave: Contaminación ambiental, agua, mercurio, biosensores, nanomateriales, aminoácidos, metales pesados

Descripción: En esta investigación se desarrolló un biosensor electroquímico basado en péptidos para la detección de iones de mercurio (Hg^{2+}) en medios acuosos, con el objetivo de avanzar hacia herramientas analíticas más sensibles, selectivas y sostenibles, aplicables al monitoreo de aguas contaminadas por actividad minera. La metodología integró herramientas de modelado molecular para seleccionar la secuencia peptídica DGPEFER, la cual mostró alta afinidad por Hg^{2+} . Esta secuencia fue inmovilizada sobre nanotubos de carbono (MWCNT) depositados en electrodos serigrafiados, optimizando las condiciones de modificación mediante ensayos electroquímicos. La caracterización fisicoquímica confirmó una adecuada funcionalización de la superficie del electrodo, y las pruebas electroanalíticas en un medio de pH neutro demostraron que el biosensor presenta un comportamiento lineal en un rango de 0,35 a 10,0 ppm de Hg^{2+} , con un límite de detección de 0,011 ppm. La evaluación de la estabilidad y reproducibilidad del biosensor, reportó un desempeño adecuado bajo condiciones controladas de limpieza y regeneración del electrodo. Además, se estudió la selectividad frente a otros iones presentes en efluentes mineros, como Pb^{2+} y Mn^{2+} , demostrando una respuesta preferencial hacia Hg^{2+} . Este trabajo representa un avance en el desarrollo de plataformas electroquímicas basadas en péptidos, sentando las bases para futuras mejoras en sensibilidad, miniaturización y aplicación en campo para la detección de mercurio en aguas contaminadas.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Maestría en Ingeniería Química. Director: Julio Andrés Pedraza Avella. Doctor en Química. Codirector: Jose Luis Roperó Vega. Doctor en Química. Asesora: Johanna Marcela Flórez Castillo. Doctora en Química

Abstract

Title: Development of an electrochemical biosensor using a peptide as a biological recognition element immobilized on carbon nanotubes for the detection of mercury in aqueous matrices*

Author(s): María Alejandra Galvis Vargas, Julio Andrés Pedraza Avella, Jose Luis Roperó Vega y Johanna Marcela Flórez Castillo**

Key Words: Environmental pollution, water, mercury, biosensors, nanomaterials, amino acids, heavy metals

Description: In this study, a peptide-based electrochemical biosensor was developed for the detection of mercury ions (Hg^{2+}) in aqueous media, aiming to advance toward more sensitive, selective, and sustainable analytical tools applicable to the monitoring of water contaminated by mining activities. The methodology integrated molecular modeling tools to select the peptide sequence DGPEFER, which exhibited high affinity for Hg^{2+} . This sequence was immobilized onto multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) deposited on screen-printed electrodes, with modification conditions optimized through electrochemical testing. Physicochemical characterization confirmed appropriate functionalization of the electrode surface, and electroanalytical tests in a neutral pH medium demonstrated that the biosensor exhibited linear behavior in the range of 0.35 to 10.0 ppm of Hg^{2+} , with a detection limit of 0.011 ppm. Evaluation of the biosensor's stability and reproducibility showed adequate performance under controlled cleaning and electrode regeneration conditions. Additionally, the sensor's selectivity was assessed in the presence of other ions commonly found in mining effluents, such as Pb^{2+} and Mn^{2+} , demonstrating a preferential response toward Hg^{2+} . This work represents a significant step forward in the development of peptide-based electrochemical platforms, laying the foundation for future improvements in sensitivity, miniaturization, and field application for mercury detection in contaminated water.

* Degree Work

**Facultad de Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Maestría en Ingeniería Química. Director: Julio Andrés Pedraza Avella. Doctor en Química. Codirector: Jose Luis Roperó Vega. Doctor en química Asesora: Johanna Marcela Flórez Castillo. Doctora en Química

Introducción

La región de Santander, Colombia, posee una notable riqueza mineral, en particular en yacimientos auríferos, lo que ha dado lugar a la conformación del distrito minero Vetas–California. En este contexto, la minería ilegal a cielo abierto y aluvial ha implicado durante décadas el uso indiscriminado de mercurio metálico, un elemento poco soluble en agua pero altamente volátil (Corporación Compromiso, 2020). Aunque esta práctica fue regulada mediante la Ley 1658 de 2013, los efectos derivados de su uso prolongado aún persisten. La exposición continua de este metal al ambiente acuático ha generado reacciones químicas y biológicas indeseadas, ocasionando impactos ambientales no resueltos, conocidos como pasivos ambientales (Castillo, 2009). La subcuenca alta del río Suratá, que atraviesa el distrito minero y una parte del páramo de Santurbán, abastece de agua potable a cerca de 13 municipios del departamento.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el mercurio es una de las especies metálicas de mayor preocupación a nivel mundial por su toxicidad, en especial para el desarrollo fetal y de la infancia temprana (OMS, 2021). En 2022, el Acueducto Metropolitano de Bucaramanga (AMB) reportó dos picos de concentración de mercurio en las captaciones hídricas de la planta Bosconia, con valores de 0,1 mg/L y 0,163 mg/L, aproximadamente 80 veces superiores al límite permitido de 0,002 mg/L establecido por la EPA (Revista Semana, 2022).

En medios acuáticos, el mercurio puede encontrarse en forma inorgánica u orgánica. Dentro de las especies inorgánicas, la más común es el ion Hg^{2+} , el cual presenta una fuerte afinidad por grupos funcionales presentes en biomoléculas, como sulfhidrilos, carboxilos, fosforilos, amidas y aminas (Alanoca, 2016). Esta afinidad facilita su participación como precursor en la formación de metilmercurio, una de las formas más tóxicas de mercurio orgánico.

A pesar de que existen técnicas analíticas altamente sensibles para la detección de mercurio, su implementación en zonas rurales y acueductos veredales resulta limitada por el alto costo, complejidad operativa y necesidad de personal especializado. Entre estas técnicas destacan la espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), que aunque precisas, implican elevados costos de operación, tiempos largos de respuesta y limitaciones en la discriminación de especies químicas.

Frente a estas restricciones, ha surgido el desarrollo de sensores como alternativa para la cuantificación de metales *in situ*. En particular, los biosensores han demostrado ventajas significativas por su alta especificidad, bajo costo, facilidad de operación y posibilidad de miniaturización (Domínguez, 2013). Estos dispositivos emplean un elemento de reconocimiento biológico que proporciona la especificidad frente al analito de interés, permitiendo además la portabilidad y operación directa en campo (Lejía, 2009; Guarín, 2019).

Tradicionalmente, los elementos de reconocimiento en biosensores incluyen enzimas, anticuerpos, proteínas y ácidos nucleicos. No obstante, en los últimos años se ha explorado con creciente interés el uso de péptidos como elementos de reconocimiento debido a su capacidad de generar interacciones específicas (hidrofóbicas, hidrofílicas, electrostáticas) y su facilidad de diseño y modificación mediante herramientas químicas e informáticas (Yuan & Liu, 2021). Los péptidos presentan alta afinidad por ciertos analitos, pueden diseñarse para ser selectivos, son biocompatibles y no tóxicos (Ghanaati *et al.*, 2009), lo que los convierte en candidatos atractivos para el desarrollo de sensores dirigidos a la detección de metales pesados. Sin embargo, el uso de péptidos para la detección específica de especies de mercurio aún es un campo poco explorado.

Por otro lado, el uso de nanomateriales en biosensores —como nanopartículas de oro, nanotubos de carbono, grafeno o polímeros conductores— ha contribuido significativamente a

mejorar la sensibilidad del sistema. Estos materiales no solo actúan como soportes para la inmovilización del elemento de reconocimiento, sino que también favorecen la transferencia electrónica y amplifican la señal analítica (Yuan & Liu, 2021; Andrade *et al.*, 2012). En particular, los nanotubos de carbono han demostrado propiedades eléctricas superiores debido a su estructura unidimensional y su quiralidad, lo cual mejora la conductividad a lo largo de su eje frente a materiales bidimensionales como el grafeno (Merino *et al.*, 2014).

En este contexto, la presente investigación tuvo como finalidad seleccionar un péptido con alta afinidad por especies de mercurio, y modificar su estructura mediante herramientas informáticas para optimizar su efectividad y estabilidad en procesos de detección. Este péptido fue posteriormente incorporado en un biosensor, junto con nanomateriales conductores, con el objetivo de desarrollar una plataforma analítica sensible, específica y potencialmente aplicable para el monitoreo in situ de mercurio en fuentes hídricas afectadas por pasivos ambientales.

1. Marco teórico

1.1 Mercurio

El mercurio es un elemento metálico líquido a temperatura ambiente que, por su alta tensión superficial es capaz de formar amalgamas con facilidad con otros metales. El mercurio existe fundamentalmente en tres formas: como mercurio elemental, formando compuestos orgánicos y formando iones inorgánicos; en función de la forma en que se encuentre puede presentar estado de oxidación Hg^{1+} o Hg^{2+} (Rodríguez, J. 2020).

1.1.1 Toxicidad del mercurio

El mercurio elemental y los compuestos de mercurio orgánico e inorgánico son considerados por la US-EPA y OMS como principal fuente de contaminación. Además, son responsables de efectos agudos y crónicos tales como afecciones del sistema nervioso central y daño renal. Se considera que el tipo de mercurio más tóxico es el mercurio orgánico (metilmercurio) debido a que son venenos protoplásmicos y sus compuestos pueden ingresar al cuerpo a través de la piel, del tracto gastrointestinal y del tracto respiratorio (Cortés, C., 2017).

1.1.2 Mercurio (II)

El mercurio (II) es un estado de oxidación del mercurio. En la minería, el oro forma una amalgama que puede ser separada fácilmente por sedimentación. Esta amalgama es quemada para volatilizar el mercurio, y como resultado, el mercurio entra en la atmósfera. El vapor de mercurio elemental liberado a la atmósfera es oxidado a Hg^{2+} en presencia de ozono, luz solar y vapor de agua. Una vez oxidado, el mercurio iónico Hg^{2+} es lavado de la atmósfera por las lluvias y depositado sobre el medio terrestre y acuático (Sánchez, J., & Cameselle, C., 2017). Su principal vía de absorción es por inhalación, y se conoce que aproximadamente el 80% de Hg^{2+} se absorbe

debido a su gran volatilidad y a su solubilidad en tejido graso (Ministerio de Salud y Protección Social, 2018).

1.1.3 *Metilmercurio (MeHg)*

Se ha encontrado que las especies de MeHg se producen a partir de Hg^{2+} por procesos biológicos que ocurren dentro de los cuerpos de agua (European Commission, 2019). Este compuesto es conocido como un potente agente neurotóxico con propiedades de bioacumulación y biomagnificación (Panduro, 2020), es decir que, es capaz de depositarse en la cadena alimentaria. Dicha especie es 50 veces más tóxica que el mercurio elemental.

1.1.4 *Límites máximos permisibles de mercurio en Colombia*

Dada la evidente toxicidad del mercurio y sus efectos perjudiciales para la salud humana, se han establecido normativas referentes a los límites máximos permitidos en diferentes fuentes como: agua, aire, suelo y alimentos. La Tabla 1 presenta la normatividad vigente en Colombia referente a la matriz agua, basada en lineamientos internacionales.

Tabla 1

Límites máximos permisibles de mercurio

Tipo de agua	Límite	Normatividad
Agua potable	0,001 mg/L	Resolución 2115 del 2007
Agua de uso pecuario	0,01 mg/L	Decreto 1594 de 1984
Vertimientos de aguas superficiales	0,02 mg/L	Resolución 631 de 2015

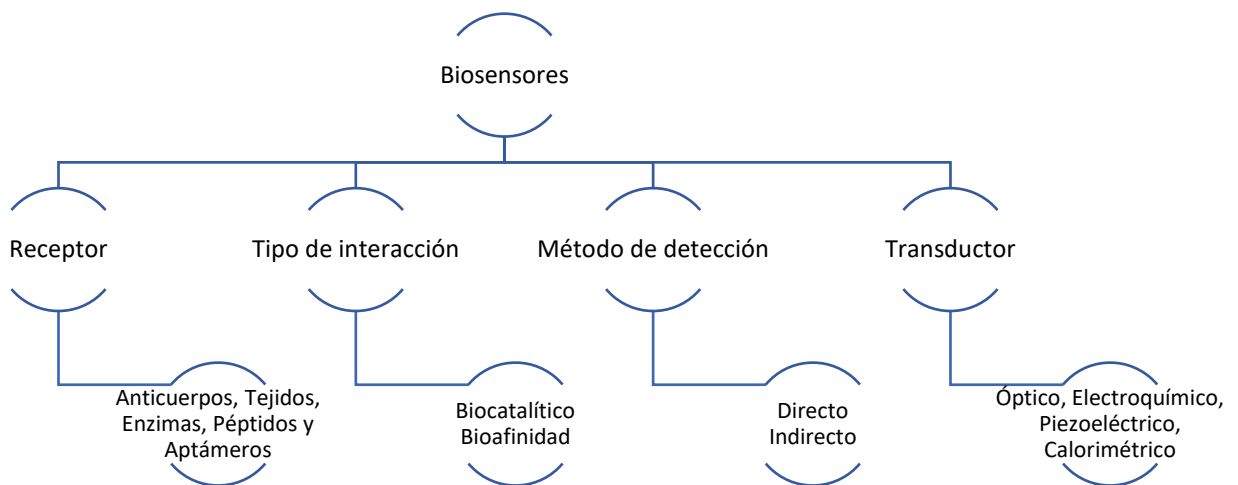
Nota. Tomado y adaptado del ministerio de ambiente y desarrollo sostenible

1.2 Biosensores

Un biosensor es un dispositivo de análisis conformado por un elemento de reconocimiento biológico (célula, tejido, receptor, ácido nucleico, enzima, ribozima o anticuerpo, entre otros), asociados a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, entre otras, obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico. Cabe destacar que las características fisicoquímicas del analito de interés son las determinantes para la elección del material biológico, mientras que, el tipo de elemento de reconocimiento es el que determina el sistema transductor (Jimenes y León., 2009).

1.2.1 Clasificación de los biosensores

Entre las distintas clasificaciones para los biosensores, se considera que una de las más completas se describe a partir de las siguientes variables.



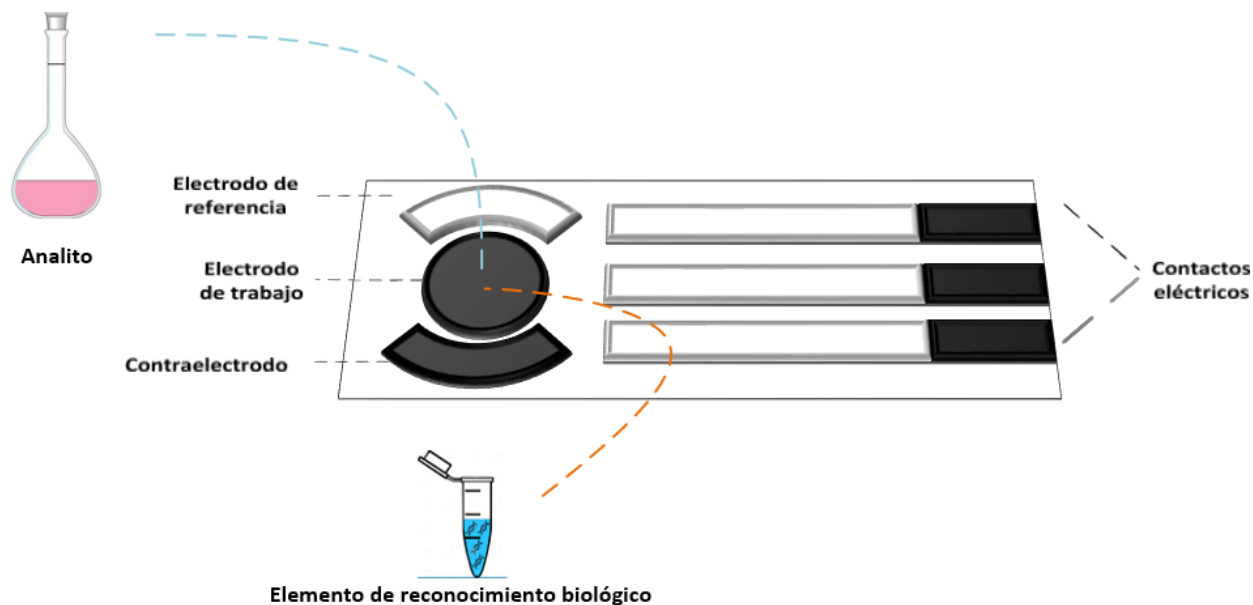
1.2.2 Biosensores electroquímicos

Se caracterizan por su capacidad de convertir la señal obtenida en una señal eléctrica, es decir, la energía producida por la interacción electroquímica del receptor biológico-analito se

emplea para producir una señal analizable (Rodríguez, J., 2020) tal como se describe en la Figura 1. El concepto de biosensor implica que el elemento de reconocimiento biológico esté en íntimo contacto con el elemento transductor; para garantizar el contacto permanente. Además, el material biológico debe fijarse a la superficie del transductor y este proceso de fijación es llamado inmovilización (Calvo. A., 2014). Actualmente, los biosensores electroquímicos son los más usados por la capacidad de construcción de dispositivos de detección sensibles, de bajo costo, simplicidad de operación y rápido tiempo de respuesta (Zhao. Y., 2018).

Figura 1

Componentes de un biosensor



Nota. La figura representa un electrodo serigrafiado conformado por un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. Este se convierte en biosensor al modificar el electrodo de trabajo con un componente biológico para de mejorar la detección de un analito de interés.

La Tabla 2 describe los tipos de transductores electroquímicos que se pueden presentar en un sensor. En estos tipos, se destacan los biosensores potenciométricos debido a la facilidad de adquirir comercialmente electrodos serigrafiados que permiten realizar mediciones sensibles en tiempo real y de fácil implementación.

Tabla 2

Biosensores según el tipo de transducción electroquímica

Transductor electroquímico	Tipo de medida
Conductimétrico	Mide la variación de las propiedades de conductividad de un medio electrolítico.
Potenciométrico	Mide el potencial entre el electrodo en el que se inmoviliza el bio-receptor y un electrodo de referencia.
Amperométrico	Mide la intensidad de corriente resultante de la oxidación/reducción de una especie electroactiva en una reacción bioquímica.
Impedimétrico	Mide la combinación entre la resistencia y la reactancia causada por la unión del analito al receptor inmovilizado en la superficie del electrodo.

Nota. Adaptado de Moran, K. *et al.*, 2016.

1.2.3 Técnicas electroquímicas

Estas técnicas permiten comprender la cinética de las reacciones electroquímicas y los tipos de procesos de electrodos, incluidas las reacciones faradaicas y no faradaicas (Nasirpouri, 2017). Se pueden realizar detecciones de metales a partir de técnicas electroquímicas midiendo las señales

eléctricas de las reacciones redox. Teniendo un electrodo serigrafiado, es posible modificar el electrodo de trabajo con nanomateriales para aumentar la intensidad de la señal, reducir el ruido y permitir la detección de metales a nivel de trazas (Hosseini *et al.*, 2025). Estas reacciones redox se producirán entre los iones metálicos y las superficies modificadas de los electrodos. En la Tabla 3 se muestran algunas de las técnicas electroquímicas de mayor uso en la detección de metales.

Tabla 3

Tipos de técnicas electroquímicas

Técnica	Descripción de la técnica
Voltametría Lineal (LV)	Comúnmente determina la cinética de los procesos de electrodos. La voltametría se basa en las técnicas de barrido de pasos potenciales. En esta técnica, la corriente se registra a
Voltametría Cíclica (CV)	medida que se cambia el potencial del electrodo. Dependiendo de los pasos utilizados para cambiar el potencial, las técnicas pueden dividirse en dos categorías: de barrido lineal y cíclica.
Voltametría de Redisolución Anódica de Pulso Diferencial (DP-ASV)	Estás técnicas combinan dos tipos de voltametrías, la voltametría de redisolución anódica (ASV), que permite la preconcentración del analito mediante un proceso faradaico con el fin de aumentar la sensibilidad y la voltametría de pulso diferencial (DPV) para medir la desorción del analito con una mayor resolución

Nota. Tomado y adaptado de Nasirpouri, (2017) y Gao, C., & Huang, X.-J., (2013).

1.3 Péptidos como elemento de reconocimiento

Un péptido se forma a partir de cadenas cortas de aminoácidos y es esta formación estructural la que facilita la interacción con diferentes iones y moléculas. Los péptidos son una clase de moléculas señalizadoras muy estables, que utilizan los organismos multicelulares para regular sus complejas actividades (Mckee, T., y Mckee J., 2020). Se ha promovido su uso, debido al tipo de interacciones que puede llegar a formar con otros compuestos, las cuales se podrían dividir en tres categorías. La primera categoría consiste en aquellos aminoácidos con propiedades hidrofóbicas, es decir, aquellos que presentan interacciones electrostáticas repulsivas hacia las moléculas de H₂O. En contraposición, la segunda categoría agrupa a los aminoácidos hidrofílicos o polares, que son aquellos cuya interacción electrostática con las moléculas del solvente es atractiva; y en una tercera categoría, se encuentran los aminoácidos cuyo grupo residual tiene carga eléctrica distinta de cero (Olivares, 2004).

Estudios experimentales apuntan a que la contribución más significativa, en la estabilización de la estructura terciaria de una secuencia peptídica proviene de la agrupación al interior de la estructura de los aminoácidos con grupos R de interacción hidrofóbica, para que los aminoácidos hidrofílicos de la secuencia puedan interactuar con las moléculas de agua circundantes (Creighton, 1985).

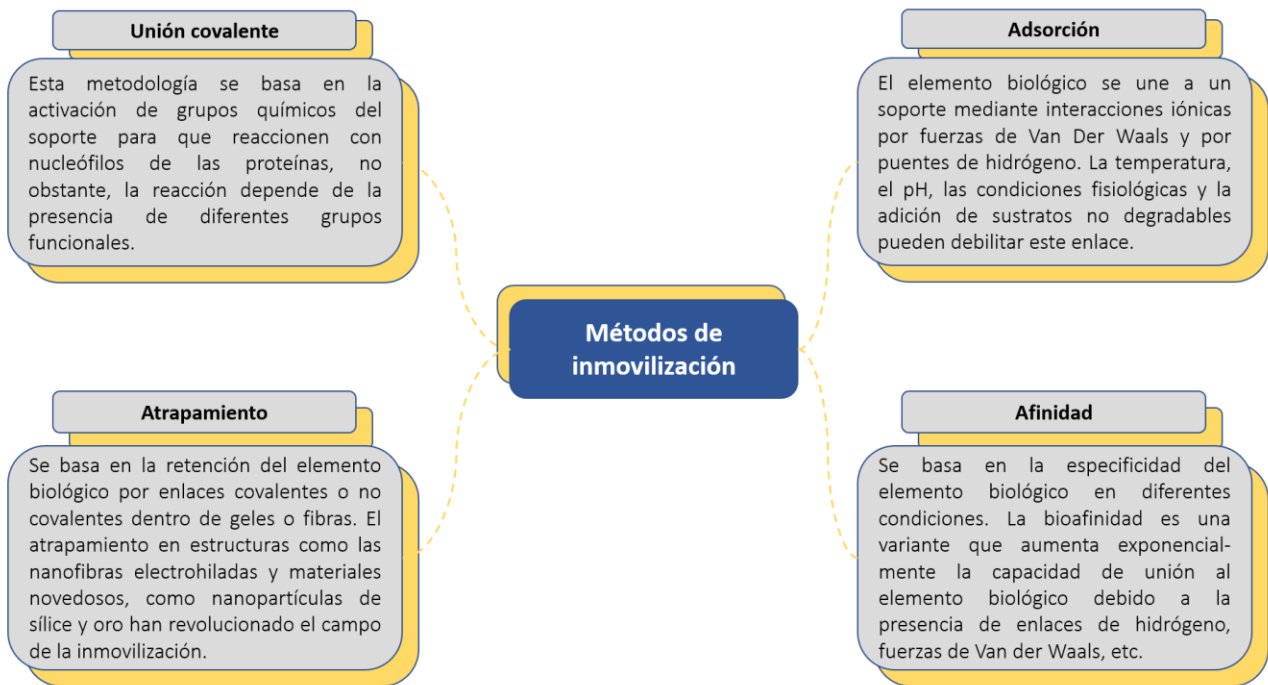
1.3.1 Métodos de inmovilización

La inmovilización es un proceso en el que se confina o localiza el material biológico o una molécula. Por ejemplo, en un biosensor, el bioreceptor se inmoviliza sobre el transductor electroquímico para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad (Calvo. A., 2014). La metodología de inmovilización utilizada puede afectar características del biosensor como el tiempo

de vida o la sensibilidad. Existen diversas formas de llevar a cabo dicho proceso de inmovilización. En la Figura 2 se describen principalmente los métodos más desarrollados, los cuales se pueden clasificar en dos grupos, los de retención física y los de unión química.

Figura 2

Clasificación de los métodos de inmovilización



Nota. Adaptado de Meneau, R., Borrego, K., Liva, M., y Fariñas, T., 2021.

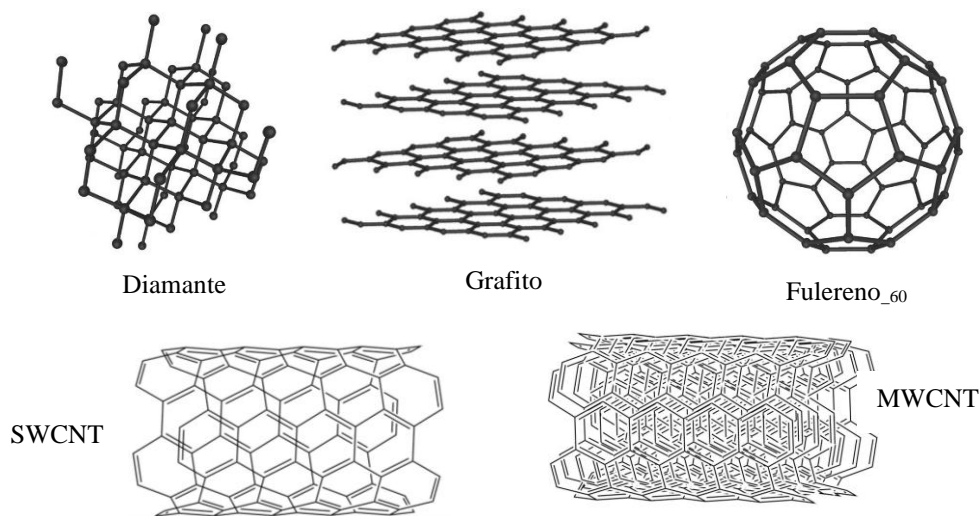
1.4 Nanotubos de carbono (NTC's)

Son alótropos del carbono, como el diamante, el grafito o los fullerenos (ver Figura 3). Existen diferentes tipos de NTC's en función de las capas de grafito que los forman. Estos pueden ser nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNT's) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT's), que pueden considerarse como capas de láminas de grafito enrolladas concéntricamente, donde cada átomo de carbono está unido con otros tres mediante hibridación

sp^2 (Andrade *et al.*, 2012). Estos nanomateriales tienen excelentes propiedades físicas y químicas como son su área superficial, resistencia y conductividad eléctrica, que resultan en materiales interesantes para la fabricación de electrodos (Manikandan *et al.*, 2023).

Figura 3

Alótropos de carbono



1.5 Bioinformática estructural

La bioinformática es la disciplina que permite el estudio, modelado y simulación de sistemas biológicos, orientados al análisis de datos en distintas áreas de conocimiento. El uso de herramientas bioinformáticas podría predecir e incrementar la probabilidad de interacción entre el ligando y las moléculas de interés. (Redondo, 2021).

En el estudio de temas químico-biológicos, la simulación computacional representa un aspecto esencial de la bioinformática estructural. En ella, se utiliza la física teórica incorporada a programas computacionales, para calcular estructuras y propiedades de biomoléculas que logren describir un sistema o proceso molecular (Drusin, S., 2018).

2. Estado del arte

En las últimas décadas se han diseñado diversas herramientas y metodologías analíticas tradicionales para la detección de metales, como la espectroscopia de absorción atómica, la espectrometría de masas, la cromatografía líquida de alta resolución, los sensores electroquímicos y biomiméticos. Entre estos, los sensores electroquímicos y biomiméticos, brindan una alta sensibilidad, selectividad y respuestas rápidas en dispositivos portátiles y fáciles de usar (Stortini, A., *et al.*, 2020). Con base en esta información, durante los últimos años se ha visto un aumento de investigaciones que desarrollan biosensores electroquímicos, en donde la selección del elemento de reconocimiento biológico ha sido influenciada por el análisis de datos bioinformáticos.

2.1 Simulación bioinformática

A diferencia de los métodos tradicionales de síntesis y validación experimental de moléculas que requieren etapas sucesivas de diseño químico, síntesis, purificación y evaluación bioquímica, la bioinformática estructural permite optimizar el diseño molecular mediante simulaciones computacionales previas al trabajo experimental. Este campo interdisciplinario combina herramientas matemáticas, informáticas y teóricas de la biología para analizar e interpretar interacciones moleculares complejas (Li *et al.*, 2025). En las últimas décadas, el número de procesamientos de bioinformática estructural, (bibliotecas, complementos, recursos web y software disponibles) ha aumentado exponencialmente lo que ha consolidado su aplicación (Rosignoli, S., y Paiardini, A., 2022).

Uno de los softwares ampliamente utilizados en los últimos años es PyMOL. Este software es comúnmente usado para la visualización tridimensional (3D) de proteínas, ácidos nucleicos,

moléculas pequeñas, densidades de electrones, superficies y trayectorias, incluyendo también el análisis de biomoléculas (Yuan, S., Chan, H., y Hu, Z., 2017). Por otra parte, las técnicas computacionales de acoplamiento y puntuación han revolucionado la bioinformática estructural, al proporcionar información sin precedentes sobre aspectos clave de la interacción ligando-receptor. El acoplamiento se utiliza para optimizar fármacos y para identificar nuevos aglutinantes, mediante la predicción de su modo de unión y afinidad (Forli, *et al.*, 2016). El software AutoDock y AutoDockTools son herramientas gratuitas que han sido ampliamente citadas en la literatura, como herramientas esenciales en el diseño de fármacos basados en estructuras, lo que presenta una reducción de los tiempos y costos asociados a la síntesis física de compuestos por cuando se realiza por métodos tradicionales. Además, estos métodos son lo suficientemente rápidos como para permitir el cribado virtual (identificación) de bibliotecas de ligandos que contienen decenas de miles de compuestos (El-Hachem, *et al.*, 2017).

Investigaciones expuestas por Prada en 2021, demuestran que el desarrollo de nuevas estrategias para la obtención de péptidos basados en herramientas biocomputacionales, es indispensable, tanto para la síntesis de nuevos fármacos, como para el entendimiento de las vías de señalización celular y la comprensión de las interacciones de pares moleculares tipo ligando-receptor en sistemas vivos.

2.2 Desarrollo de biosensores

Los biosensores electroquímicos ofrecen un enfoque prometedor en el monitoreo en tiempo real para el tratamiento de fuentes hídricas. Los avances en la ciencia de los materiales y las tecnologías de microfabricación están allanando el camino para producir biosensores electroquímicos portátiles, que sean más pequeños y económicos (Bindu *et al.*, 2024). Los

biosensores pueden diseñarse para detectar metales pesados específicos, como plomo, mercurio o cromo en fuentes hídricas, permitiendo así una detección temprana que haga posible la implementación de técnicas de eliminación adecuadas, antes de que lleguen al consumo humano. La continuación de esta línea de investigación ha permitido mejorar parámetros de los biosensores como su robustez, selectividad y rentabilidad. En la Tabla 4, se muestra el avance, durante los últimos años, en el desarrollo de biosensores para la detección de mercurio.

Tabla 4

Estado del arte en el desarrollo de biosensores para la detección de mercurio (II)

Tipo de sensor	Elemento de reconocimiento	Rango de medición	Límite de detección	Año de publicación
Electroquímico	ADN	0,05 – 20 ppb Hg ²⁺	0,02 ppb	2015
Electroquímico	PNA	5x10 ⁻⁶ – 5x10 ⁻⁴ ppb Hg ²⁺	4,5x10 ⁻⁶ ppb	2017
Electroquímico	Enzima	2x10 ⁻¹¹ – 2x10 ⁻⁶ ppb Hg ²⁺	8,4x10 ⁻¹² ppb	2017
Luminiscencia	Bacteria <i>escherichia coli</i>	6 – 48 ppb Hg ²⁺	–	2018
Colorimétrico	Péptido	2x10 ⁻⁵ – 1,6x10 ⁻⁴ ppb Hg ²⁺	5,6x10 ⁻⁶ ppb	2021

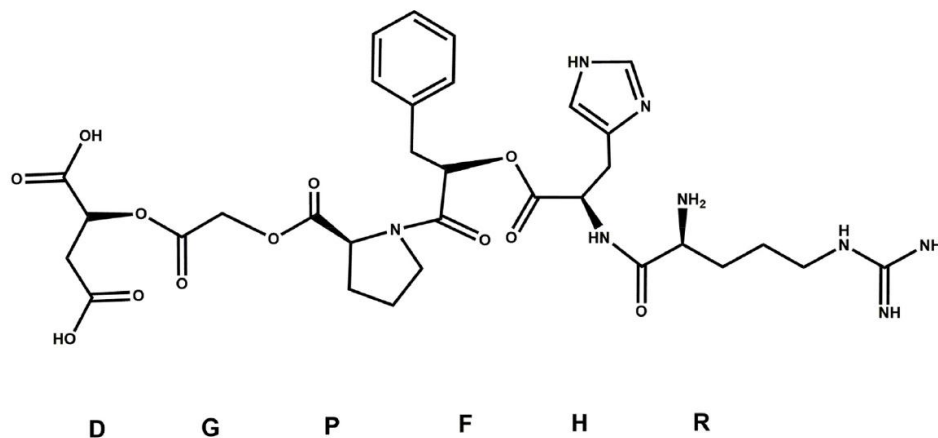
Electroquímico	ADN	0,001 ppb – 0,02 ppb Hg ²⁺	0,07 ppb	2024
----------------	-----	--	----------	------

Nota. Tomado y adaptado de Tortolini, *et al.*, 2015. Bala, *et al.*, 2017. Cai, *et al.*, 2017. Santacruz, P., 2018. Li, Z *et al.*, 2021. Hu, L, *et al.*, 2024

Ahora bien, el enfoque de esta investigación se centra en el uso de péptidos como elemento de reconocimiento biológico, debido a que la carga de sus aminoácidos puede facilitar la interacción con iones metálicos. Además, presentan un costo de síntesis más bajo en comparación con otros elementos biológicos como el ADN o las enzimas, y cuentan con una vida útil ligeramente mayor. Hasta la fecha solo se encontró un trabajo de investigación de relevancia que emplee el mismo elemento de reconocimiento. Li, Z. *et al*, construyó un biosensor para cuantificar iones de mercurio Hg²⁺ a partir de la secuencia peptídica DGPFHR (Figura 4), el cual demostró buena selectividad en presencia de otro tipo de iones metálicos comunes a altas concentraciones.

Figura 4

Clasificación de los métodos de inmovilización

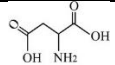
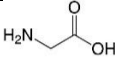
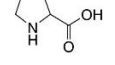
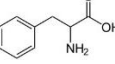
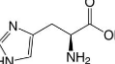
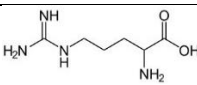


Nota. Tomado de Li, Z *et al.*, 2021).

Los aminoácidos se clasifican de acuerdo a la polaridad de su cadena lateral o grupo R, posteriormente pueden recibir una subclasificación en 3 grupos: neutros, ácidos y básicos, lo que les confiere una carga determinada (López, M. y Mohiuddin, S., 2025). La Tabla 5 describe la característica principal de la secuencia peptídica usada para la determinación de iones de Hg^{2+} . La adición de R, D y H tuvo como objetivo coordinarse con Hg^{2+} para lograr una identificación específica. Por otro lado, las características estructurales específicas de G, P y F podrían ofrecer la posibilidad de ajustar en cierta medida la configuración espacial de la secuencia. (Li, Z *et al.*, 2021)

Tabla 5

Características de la secuencia peptídica

Aminoácido	Nombre	Características	Representación
D	Ácido aspártico	Aminoácido polar con carga negativa	
G	Glicina	Aminoácido no polar	
P	Prolina	Aminoácido alifático no polar	
F	Fenilalanina	Aminoácido aromático no polar	
H	Histidina	Aminoácido polar con carga positiva	
R	Arginina	Aminoácido polar con carga positiva	

Finalmente, se observó que en los últimos años el desarrollo de biosensores electroquímicos ha cobrado relevancia como alternativa para la detección de elementos metálicos. Sin embargo, a conocimiento de los autores, no se han encontrado referencias que reporten el desarrollo de biosensores electroquímicos específicamente orientados a la detección de mercurio

utilizando un péptido como elemento de reconocimiento biológico. Por lo tanto, este trabajo de investigación destaca por su carácter innovador.

3. Hipótesis

El diseño de un péptido mediante herramientas bioinformáticas y su inmovilización sobre nanotubos de carbono posibilitan el desarrollo de un biosensor electroquímico sensible y selectivo, capaz de detectar mercurio en soluciones acuosas con una respuesta rápida.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Desarrollar un biosensor electroquímico usando un péptido como elemento de reconocimiento biológico inmovilizado en nanotubos de carbono para la detección de mercurio en matrices acuosas.

4.2 Objetivos Específicos

Diseñar un péptido como elemento de reconocimiento biológico de mercurio a partir de modificaciones bioinformáticas de su estructura.

Determinar las condiciones de un biosensor de mercurio a partir de electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de carbono y un péptido como elemento biológico.

Evaluar las características analíticas del biosensor electroquímico en relación a la detección de mercurio en una matriz acuosa.

5. CAPÍTULO 1: DISEÑO DEL ELEMENTO DE RECONOCIMIENTO

En este capítulo se describe la metodología empleada para el diseño del elemento de reconocimiento biológico diseñado para el biosensor electroquímico. El proceso inicio con la selección de una secuencia peptídica reportada en la literatura, en la cual se identifica el aminoácido responsable del reconocimiento de los iones Hg^{2+} . A partir de esto, se propusieron modificaciones incorporando otros aminoácidos que podrían mejorar la capacidad de reconocimiento. Posteriormente, se utilizaron diversas herramientas informáticas para predecir la estructura tridimensional de cada secuencia modificada, analizar los tipos de enlace intramoleculares formados, calcular la desviación cuadrática media (RMSD) y, finalmente, se realizó un acoplamiento molecular entre cada secuencia peptídica y el ligando (Hg^{2+}). Este acoplamiento permitió identificar la orientación que minimiza la energía libre del sistema, es decir, la configuración más estable.

5.1 Metodología

5.1.1 *Modificación de la secuencia peptídica*

Teniendo en cuenta la secuencia DGPFHR diseñada por Li, Z. *et al.* (2021), quienes propusieron que el aminoácido histidina (H) podría presentar una alta afinidad por los iones de Hg^{2+} . Por esta razón, se realizó como primera modificación, la adición de más aminoácidos H, con el objetivo de evaluar su efecto sobre la interacción con los iones de Hg^{2+} y, al mismo tiempo, los efectos de aumentar la longitud de la cadena peptídica.

Adicionalmente, se investigaron otros aminoácidos que pudiesen reemplazar la histidina, seleccionando así al ácido glutámico (E), debido a sus propiedades polares y su carga negativa. También se incluyeron modificaciones con aminoácidos como fenilalanina (F), tirosina (Y) y

triptófano (W), que poseen características apolares y son los únicos que contienen grupos funcionales aromáticos en sus cadenas laterales, y, además, las interacciones π - π de estos grupos funcionales podrían favorecer la unión con los iones Hg^{2+} . La Tabla 6 resume las modificaciones propuestas para cada una de las secuencias analizadas.

Tabla 6

Modificaciones (Mod.) planteadas de secuencias peptídicas

	Secuencia 1	Secuencia 2	Secuencia 3	Secuencia 4	Secuencia 5
Mod. 1	DGPFHR*	DGPFER	DGPFRR	DPGFWR	DGPFYR
Mod. 2	DHGPFHR	DEGPFER	DFGPFRR	DWGPFWR	DYGPFYR
Mod. 3	DGPHFHR	DGPEFER	DGPFFRR	DGPWFWR	DGPYFYR
Mod. 4	DHGPHFHR	DEGPEFER	DFGPFFRR	DWGPWFWR	DYGPYFYR

*Secuencia original tomada de Li, Z. *et al.*, (2021).

5.1.2 *Diseño de la estructura molecular*

En esta etapa se usaron tres herramientas informáticas de acceso libre. La primera etapa fue la plataforma en línea PEP-FOLD, la cual permitió realizar una predicción rápida y precisa de la estructura tridimensional de cada una de las secuencias peptídicas propuestas (Tabla 6). Una vez ingresada la secuencia, se generaron los cinco mejores modelos estructurales en 3D, los archivos de salida se obtuvieron en formato PDB (Protein Data Bank), lo que facilitó su posterior visualización y análisis estructural.

Posteriormente se usó el visualizador de estructuras en línea iCn3D, el cual es una herramienta de análisis estructural, dónde se cargaron los archivos de entrada en formato PDB, y se visualizaron los tipos de interacciones (puentes de hidrógeno, interacciones iónicas,

interacciones covalentes e interacciones π - π) que se formaron en las estructuras peptídicas planteadas. Finalmente, en el programa Pymol, empleando el código “align name_String1, name_String2”, se calculó la desviación cuadrática media (RMSD), que representa la desviación de la interacción entre aminoácidos. Esta desviación se determinó para cada secuencia teniendo como referencia la modificación 1, respecto a las demás modificaciones, por ejemplo, se determinó la desviación de la secuencia DHGPFHR teniendo como referencia a la secuencia DGPFHR.

5.1.3 Docking molecular (interacción péptido-ligando)

Para realizar el análisis de acoplamiento molecular (docking), se utilizó el software de acceso libre AutoDock4 versión v4.2.6, cuyo objetivo principal fue predecir la forma óptima en que el ligando (Hg^{2+}) se uniría a cada una de las secuencias peptídicas propuestas. Luego, se seleccionó la secuencia peptídica que sería enviada a síntesis, teniendo en cuenta la energía de enlace. Esta selección se basó en los algoritmos del software, los cuales buscan la orientación y conformación del ligando, que minimice la energía libre del sistema, lo que indica una configuración más estable.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Modelos estructurales

La herramienta PEP-FOLD generalmente muestra los cinco mejores modelos planteados para cada una de las secuencias propuestas, estos modelos se pueden visualizar en la Tabla 7. Sin embargo, se observó que, en algunos casos, como en las secuencias DGPFER y DGPFYR, solo fue posible obtener dos modelos. De manera similar, las secuencias que contenían histidina generaron únicamente tres modelos. Por lo que en general, fueron pocas las secuencias que lograron desarrollar los cinco modelos estructurales. Esta limitación se atribuye al reducido

número de aminoácidos en las secuencias seleccionadas (menos de ocho), lo que disminuye la diversidad de conformaciones posibles.

Tabla 7

Estructuras moleculares de las secuencias peptídicas planteadas

Secuencia	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
DGPFHR					
DHGPFHR					
DGPHFHR					
DHGPHFHR					
DGPFER					
DEGPFER					
DGPFEFER					
DEGPFEFER					
DGPFFR					
DFGPFFR					

Secuencia	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
DGPFFFR					
DFGPFFR				/	
DPGFWR				/	
DWGPFWR					
DGPWFWR					
DWGPWFR				/	
DGPFYR			/		
DYGPFYR					
DGPYFYR					
DYGPYFYR					/

Nota: Los círculos demarcados en cada secuencia indican el grupo funcional de la cadena lateral.

Además de proporcionar la estructura molecular de las secuencias, la herramienta también entrega información sobre la energía sOPEP, un valor que indica la estabilidad de la estructura

peptídica predicha; a menor valor de energía, mayor estabilidad estructural. No obstante, en esta etapa del análisis no se descartó ninguno de los modelos generados, por lo que se continuó trabajando con todas las estructuras propuestas.

5.2.2 *Desviación cuadrática media en secuencias peptídicas*

Partiendo de la secuencia DGPFHR, formada por seis aminoácidos, se realizaron modificaciones sustituyendo la histidina (H) por otros aminoácidos como ácido glutámico (E), fenilalanina (F), triptófano (W) y tirosina (Y), generando así las secuencias DGPFER, DGPFFR, DGPFWR y DGPFYR. Estas variantes se utilizaron como secuencias de referencia para calcular la desviación cuadrática media (RMSD) en comparación con las demás modificaciones propuestas (Tabla 6). En este caso, se seleccionó el primer modelo estructural de cada una de las secuencias de referencia, ya que presentaba la mayor estabilidad según la energía sOPEP. Cada uno de estos modelos fue comparado con los modelos generados para las demás secuencias modificadas. Los valores de RMSD obtenidos mediante el software PyMOL se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

Desviación cuadrática media de las posiciones atómicas

Referencia	Modificación	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
DGPFHR	DHGPFHR	0,544 Å	0,423 Å	0,579 Å		
	DGPHFHR	1,669 Å	2,345 Å	3,287 Å		
	DHGPHFHR	2,777 Å	1,962 Å	2,658 Å	1,772 Å	1,916 Å
DGPFER	DEGPFER	0,364 Å	1,025 Å	0,351 Å		
	DGPEFER	3,742 Å	2,371 Å	2,168 Å	2,697 Å	2,982 Å
	DEGPEFER	3,560 Å	3,374 Å	3,332 Å	3,305 Å	3,220 Å
DGPFFR	DFGPFFR	4,893 Å	1,334 Å	3,833 Å	2,982 Å	
	DGPFFFR	3,999 Å	1,607 Å	1,710 Å	1,710 Å	1,717 Å
	DFGPFFFR	3,441 Å	3,355 Å	3,435 Å		
DGPFWR	DWGPFWR	2,924 Å	1,259 Å	2,039 Å	1,204 Å	2,168 Å
	DGPWFWR	3,968 Å	2,743 Å	2,662 Å	1,028 Å	3,049 Å

Referencia	Modificación	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
	DWGPWFWR	3,391 Å	3,400 Å	3,200 Å		
	DYGPFYR	3,505 Å	4,071 Å	1,940 Å	4,980 Å	2,429 Å
DGPFYR	DGPYFYR	3,229 Å	1,946 Å	3,695 Å	1,900 Å	2,743 Å
	DYGPYFYR	4,465 Å	3,362 Å	3,695 Å	3,778 Å	

Adicionalmente, el análisis estructural mostró que la estructura adoptada por cada modelo, favorece distintos tipos de interacciones intramoleculares que influyen directamente en su estabilidad. En las variantes con residuos aromáticos, resultó habitual la presencia de interacciones π - π , puentes de hidrógeno y en algunos casos, interacciones covalentes. En particular, la secuencia de referencia DGPFER y sus modificaciones, formaron principalmente interacciones de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, mientras que la secuencia aromática DGPFYR y sus modificaciones presentaron interacciones π - π catiónicas. Conocer la naturaleza y la intensidad de estas interacciones constituye un indicador clave de la estabilidad molecular, ya que cada tipo de interacción aporta un grado diferente de resistencia a la desnaturalización.

Calcular la desviación cuadrática media (RMSD) permitió seleccionar la secuencia peptídica modificada más favorable al reconocimiento de iones Hg^{2+} , manteniendo en gran medida las características estructurales de la secuencia de referencia. De acuerdo con lo reportado por Che, X. *et al.* (2023), por convención, un valor de RMSD menor a 2 Å se considera un excelente resultado de reacoplamiento, y valores inferiores a 4 Å se consideran aceptables. Con base en este criterio, solo cuatro modelos generados presentaron desviaciones que no se considerarían aceptables. No obstante, con el fin de reducir la carga computacional, se seleccionó, de cada conjunto de modelos generados por modificación, aquel con el menor valor de RMSD (valores sombreados en la Tabla 8). En los casos donde se obtuvieron valores inferiores a 1 Å, se

seleccionaron los dos modelos con menor desviación, debido a su alta similitud estructural con la secuencia de referencia.

5.2.3 Selección de la estructura peptídica

Se llevó a cabo el acoplamiento molecular (docking) entre los iones Hg^{2+} y los modelos de las secuencias peptídicas indicadas en el Apéndice A (página 99), seleccionados a partir del análisis de los valores de RMSD. La comparación y posterior selección de la secuencia más adecuada se basó en la energía de enlace, la cual refleja la afinidad entre el péptido y el ligando (Hg^{2+}). Los valores obtenidos pueden consultarse en la Tabla 9.

Tabla 9

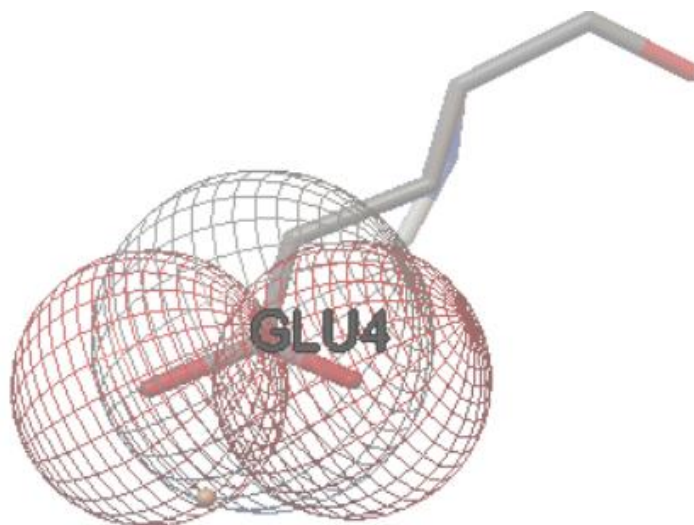
Energía de enlace resultante del acoplamiento molecular

Secuencia de referencia	Energía de enlace (kcal/mol)	Secuencia modificada	Energía de enlace (kcal/mol)
DGPFHR	-4,21	DHGPFHR_modificación1	-3,84
		DHGPFHR_modificación2	-3,47
		DGPHFHR_modificación1	-3,99
		DHGPHFHR_modificación4	-3,89
DGPFER	-4,65	DEGPFER_modificación1	-4,88
		DEGPFER_modificación3	-4,90
		DGPEFER_modificación3	-5,08
		DEGPEFER_modificación5	-4,99
DGPFFR	-4,49	DFGPFRR_modificación2	-4,47
		DGPFFRR_modificación2	-4,40
		DFGPFFRR_modificación2	-4,57
DGPFWR	-4,61	DWGPFWR_modificación4	-4,56
		DGPFWR_modificación4	-4,49
		DWGPFWR_modificación3	-4,44
DGPFYR	-4,28	DYGPFYR_modificación3	-4,53
		DGPYFYR_modificación4	-4,58
		DYGPYFYR_modificación2	-4,47

Dado que cada una de las secuencias propuestas es relativamente corta, al momento de definir el *grid box*, es decir, el área en la que se llevaría a cabo el acoplamiento molecular, se optó por una caja que abarcara toda la secuencia peptídica. Esto permitió que el ion Hg^{2+} pudiera interactuar con cualquier aminoácido de la cadena y, encontrar la región de unión más favorable en términos energéticos. La energía de unión representa la afinidad entre el ligando y la secuencia, por lo que valores más negativos indican una mayor afinidad y estabilidad del complejo formado, lo que implica una interacción fuerte.

Figura 5

Resultado del docking molecular con el software AutoDock



Con base en los resultados presentados en la Tabla 9, la secuencia que mostró la mayor energía de unión fue DGPEFER, con un valor de $-5,08$ kcal/mol, lo que indica una mejor afinidad que la secuencia DGPFHR ($-4,21$ kcal/mol) previamente reportada por Li, Z. *et al.*, 2021. Esta diferencia podría atribuirse a la presencia del ácido glutámico (E), cuya carga negativa favorece la formación de interacciones iónicas, además de interacciones por puentes de hidrógeno entre los aminoácidos. La figura 5 representa el docking molecular del ligando, el cual interactúa con el

ácido glutámico ubicado en la posición 4. A partir de esta información, se enviaron a sintetizar las secuencias DGPEFER y DGPFHR con el objetivo de comprobar experimentalmente si la secuencia propuesta en esta investigación puede alcanzar un mayor reconocimiento de los iones de mercurio (II).

5.2.4 Conclusiones parciales

La bioinformática estructural se consolidó como una herramienta clave en el diseño del elemento de reconocimiento biológico, al permitir predecir interacciones moleculares con alta precisión y optimizar la selección de secuencias peptídicas sin necesidad de recurrir inicialmente a ensayos experimentales. Su aplicación permitió reducir tiempos y recursos en la etapa de diseño, consolidando su relevancia dentro de la química computacional aplicada.

Los análisis de desviación cuadrática media (RMSD) mostraron que, en su mayoría, las secuencias peptídicas modificadas conservaron una conformación estructural aceptable respecto a sus secuencias de referencia. Sin embargo, se observaron desviaciones más altas en las secuencias que contenían triptófano (W) y tirosina (Y), posiblemente debido a los grupos funcionales indol y fenol, respectivamente, los cuales no favorecieron interacciones intramoleculares estables.

En cuanto al análisis de acoplamiento molecular, la secuencia DGPEFER presentó la mayor afinidad por los iones Hg^{2+} , con una energía de unión de $-5,08$ kcal/mol, superior a la secuencia de referencia DGPFHR. Este resultado puede atribuirse a la presencia del ácido glutámico (E), cuyo grupo carboxilo de la cadena lateral proporciona una carga negativa que favorece interacciones iónicas con el ion metálico. En conjunto, estos resultados permitieron seleccionar la secuencia DGPEFER como la más adecuada para su incorporación en el biosensor electroquímico.

6. CAPÍTULO 2: CONSTRUCCIÓN DEL BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO

El segundo capítulo de esta investigación se enfoca en los protocolos y procedimientos desarrollados para la construcción del biosensor electroquímico. En primer lugar, se evaluó electroquímicamente, el funcionamiento de los electrodos serigrafiados, utilizando cloruro de potasio (KCl) como electrolito soporte a lo largo de todo el estudio. Posteriormente, se preparó una suspensión de nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT), la cual fue depositada sobre la superficie del electrodo de trabajo mediante la técnica de drop-casting. Esta modificación dio lugar al sistema SPE/MWCNT, que fue analizado mediante voltametría cíclica (CV), comparando su respuesta con la de un electrodo serigrafiado sin modificar.

A continuación, se reconstituyeron las secuencias peptídicas DGPFHR y DGPEFER, las cuales fueron inmovilizadas sobre los MWCNT a través de interacciones electrostáticas, entre los grupos carboxilo de los nanotubos y los grupos amino de los péptidos. Una vez completada la inmovilización, se procedió al ensamblaje del sistema SPE/MWCNT/PÉPTIDO, dando lugar al biosensor electroquímico. La morfología del biosensor se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), comparándola con la del electrodo sin modificar. Además, se analizaron los complejos SPE/MWCNT y SPE/MWCNT/DGPEFER mediante espectroscopía infrarroja (FTIR), y se realizaron pruebas de voltametría cíclica en soluciones de ferricianuro de potasio y cloruro de mercurio (HgCl_2).

6.1 Metodología

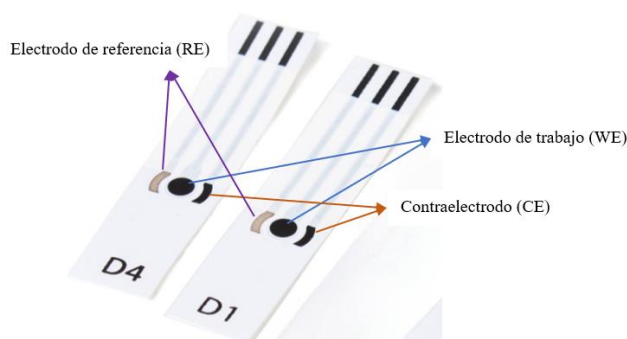
6.1.1 Caracterización del electrodo serigrafiado (SPE)

Se adquirieron comercialmente electrodos serigrafiados de carbono de la marca PalmSens, referencia Italsens IS-C como se muestra en la Figura 6. Los electrodos serigrafiados están

conformados por un electrodo de trabajo de carbono (WE) con un diámetro de 3 mm, un contraelectrodo también de carbono (CE) y un electrodo de pseudorreferencia de plata (Ag) con impregnaciones de cloro, por recomendación del fabricante se selecciona como electrolito soporte una solución con iones de cloruro.

Figura 6

Electrodo serigrafado (SPE) marca Italsens IS-C



Para verificar la funcionalidad de los electrodos serigrafados, se realizaron pruebas de voltametría cíclica utilizando un potenciostato Autolab modelo PGSTAT302N, operado mediante el software Nova 2.1. Todas las soluciones empleadas en los ensayos fueron preparadas con agua tipo 1. Se evaluó el comportamiento electroquímico de la solución de ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) 0,5 mM, así como soluciones de cloruro de mercurio ($HgCl_2$) 5 mM, a distintas velocidades de barrido. Se seleccionó como electrolito soporte una solución de cloruro de potasio (KCl) 0,1 M con el fin de evitar inestabilidades en el potencial del electrodo de referencia Ag/AgCl, garantizando así una concentración constante de iones cloruro (Cl^-) en su entorno.

6.1.2 Nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT's)

Los nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) se han utilizado ampliamente para mejorar el rendimiento de detección de los electrodos serigrafados, ya que aportan

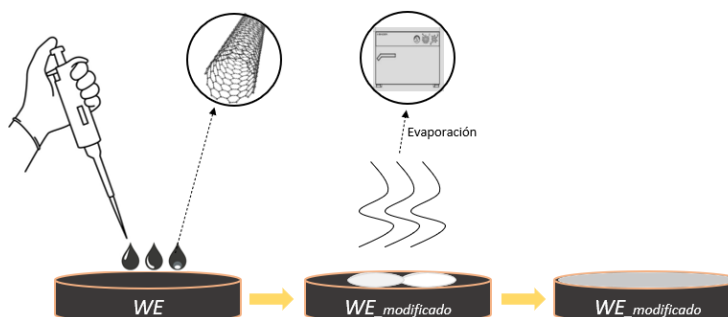
propiedades beneficiosas como un mayor potencial de trabajo, una mayor área de superficie electroactiva, y una mejor conductividad y estabilidad a largo plazo (Manikandan *et al.*, 2023). Para esta investigación, se adquirieron MWCNT funcionalizados con grupos carboxílicos (marca Sigma-Aldrich, referencia 755125). Debido a su naturaleza apolar, fue necesario emplear una sonda de ultrasonido (marca Sonics, modelo VCX 750) para dispersarlos en agua. Para ello, se realizaron tres ciclos de sonicación de 10 minutos cada uno, con intervalos de reposo de 5 minutos entre ellos, con el fin de evitar el sobrecalentamiento de la suspensión. Las sonicaciones se realizaron a una amplitud del 40 %, preparando soluciones a concentraciones de 800 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ y 7,5 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT.

6.1.2.1 Deposición de MWCNT's al electrodo serigrafiado

La modificación del electrodo de trabajo (WE) con nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT), se llevó a cabo mediante la técnica de *drop-casting*. Esta metodología consiste en el autoensamblaje de los MWCNT sobre la superficie del WE por adsorción física, como se muestra en la Figura 7. Para ello, se depositó una alícuota de 5 μL de las suspensiones preparadas a las concentraciones previamente descritas, directamente sobre la superficie del electrodo de trabajo. Posteriormente, los electrodos serigrafiados fueron secados en una estufa (marca Memmert, modelo S831243) a una temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas.

Figura 7

Técnica de drop-casting



6.1.2.2 Caracterización SPE/MWCNT

Para confirmar la deposición de los MWCNT sobre el electrodo serigrafiado (SPE/MWCNT), se llevaron a cabo pruebas de voltametría cíclica para evaluar el efecto de los MWCNT en la conductividad eléctrica del electrodo, utilizando soluciones de ferricianuro de potasio y cloruro de mercurio a las distintas concentraciones previamente mencionadas.

6.1.3 Preparación del ensamblado del biosensor electroquímico

6.1.3.1 Preparación de la secuencia peptídica

Las secuencias peptídicas DGPFHR y DGPEFER fueron sintetizadas por la compañía Biomatik® (Wilmington, EE. UU.). Posteriormente, se reconstituyeron 5 mg de cada péptido en agua tipo 1, utilizando tubos Eppendorf de 2 mL, los cuales fueron almacenados en un ultracongelador a -80 °C. De esta manera, se obtuvieron soluciones con concentraciones de 14 μM y 12 μM , respectivamente. Para las pruebas realizadas con los electrodos serigrafiados, estas soluciones fueron diluidas hasta alcanzar concentraciones finales de 0,1 μM , 0,5 μM , 1,0 μM , 5,0 μM y 10,0 μM .

6.1.3.2 Preparación de los nanotubos de carbono para inmovilización al péptido

Se llevó a cabo la activación del grupo carboxilo presente en los nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) con el fin de facilitar posteriormente la inmovilización del péptido mediante la reacción con su grupo amino. Para esta etapa, se siguió el protocolo propuesto por Roperó *et al.* (2020). En un tubo Eppendorf de 2 mL se añadieron 44,9 mg de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) y 24,2 μL de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA). A continuación, se añadió 1 mL de la suspensión de MWCNT a una única concentración

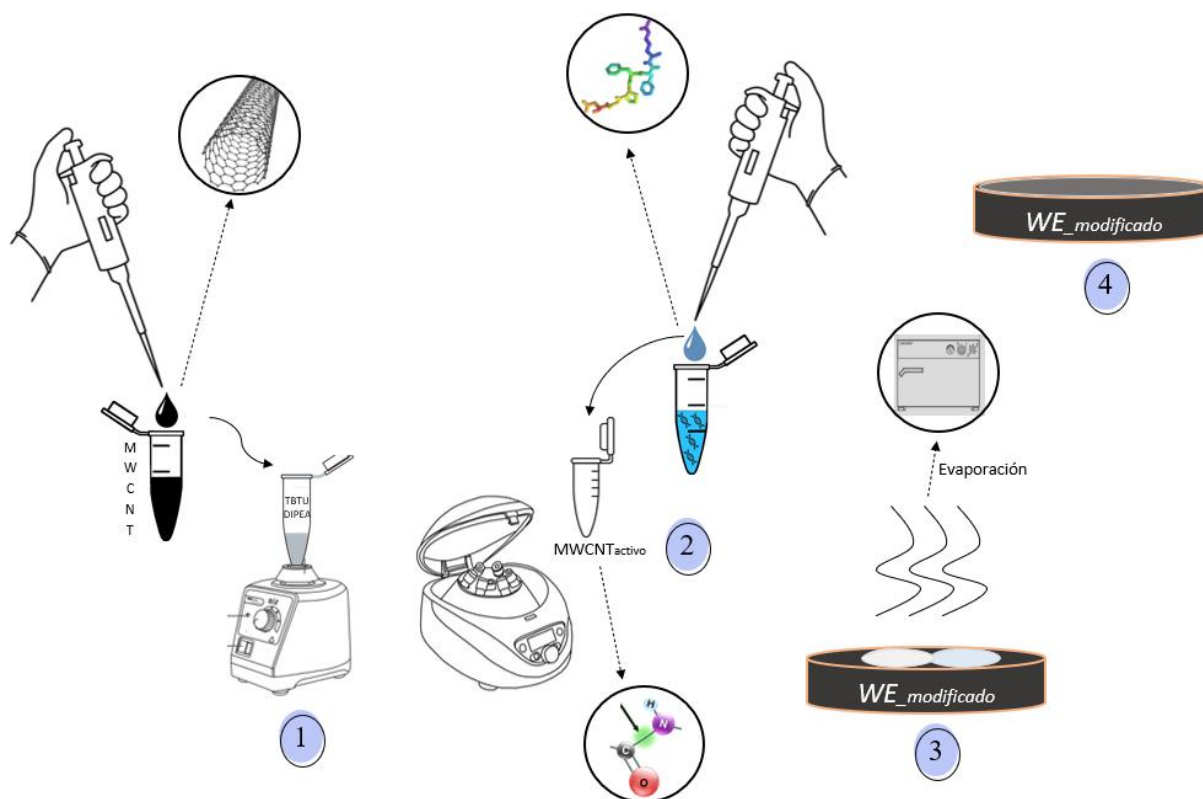
seleccionada con base en los resultados de caracterización SPE/MWCNT. La mezcla se agitó en vortex a velocidad media durante 20 minutos.

6.1.3.3 Inmovilización de MWCNT a la secuencia peptídica

La Figura 8 esquematiza el proceso de inmovilización de los péptidos. Se prepararon diluciones de las secuencias peptídicas DGPFHR y DGPEFER a diferentes concentraciones. De cada una de estas soluciones se tomaron 500 μ L, los cuales se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía los MWCNT previamente activados. La mezcla MWCNT/DGPFHR y MWCNT/DGPEFER fue sometida a ultracentrifugación durante 90 minutos a 1500 rpm. La unión entre los MWCNT y los péptidos se dio mediante la interacción entre el grupo carboxilo de los nanotubos y el grupo amino de las secuencias peptídicas.

Figura 8

Inmovilización SPE/MWCNT/PÉPTIDO



Para verificar la inmovilización de los péptidos en los MWCNT, se determinó el porcentaje de inmovilización de las secuencias peptídicas mediante el método de Bradford. Este procedimiento consistió en mezclar 1 mL de la solución peptídica con 1 mL del reactivo de Bradford, y posteriormente medir la absorbancia de la mezcla en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, modelo Genesys 10S), en un rango de longitud de onda de 800–400 nm, registrando específicamente la absorbancia a 595 nm. A continuación, las soluciones MWCNT/PÉPTIDO fueron sometidas nuevamente a ultracentrifugación durante 60 min a 15000 rpm, con el objetivo de sedimentar los MWCNT que no se unieron a las secuencias peptídicas. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se repitió el procedimiento de Bradford para cuantificar la cantidad de péptido no inmovilizado, a partir de lo cual se calculó el porcentaje de inmovilización utilizando la siguiente fórmula

$$\% \text{ Inmovilización} = \frac{Abs_{595 \text{ nm péptido}} - Abs_{595 \text{ nm sobrenadante}}}{Abs_{595 \text{ nm péptido}}} \times 100$$

6.1.3.4 Deposición SPE/MWCNT/PÉPTIDO

Finalmente, para la construcción del biosensor electroquímico, se modificó nuevamente el electrodo de trabajo (WE) mediante la técnica de *drop-casting*. Se depositó una alícuota de 5 μL de la suspensión MWCNT/PÉPTIDO directamente sobre la superficie del WE. Posteriormente, los electrodos serigrafiados se secaron en una estufa a 40 °C durante 2 horas.

Como medida adicional, para confirmar la inmovilización MWCNT/PÉPTIDO sobre el electrodo serigrafiado, se realizaron análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), utilizando la técnica de reflexión total atenuada (ATR) en los complejos SPE/MWCNT/PÉPTIDO y SPE/MWCNT.

6.1.4 Caracterización electroquímica del biosensor

En esta sección, se realizó la caracterización electroquímica a la secuencia peptídica diseñada en esta investigación (DGPEFER). Con el biosensor ya construido, se realizó una caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM), comparando un electrodo serigrafiado sin modificar (SPE) con el biosensor electroquímico modificado con MWCNT/DGPEFER. Para esta caracterización se emplearon concentraciones previamente seleccionadas mediante pruebas electroquímicas, con el objetivo de evaluar la morfología de la superficie del electrodo de trabajo (WE).

Los cambios en las propiedades electroquímicas del electrodo de trabajo (WE) se evaluaron mediante voltametría cíclica (CV), comparando tres configuraciones: el electrodo serigrafiado sin modificar (SPE), el electrodo modificado con nanotubos de carbono (SPE/MWCNT) y el biosensor final (SPE/MWCNT/DGPEFER).

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Caracterización preliminar SPE

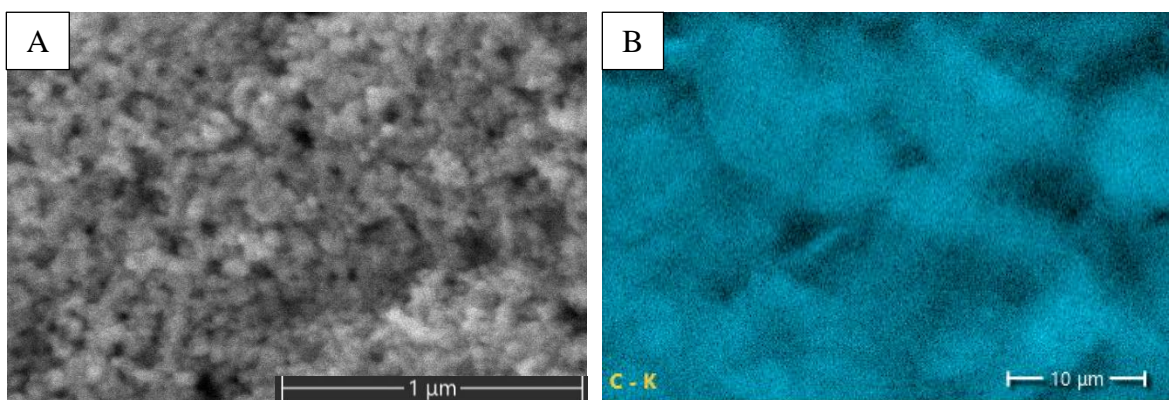
6.2.1.1 Caracterización y composición morfológica

La caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), mostrada en la Figura 9A, revela que el electrodo serigrafiado presenta una morfología rugosa y mayormente homogénea, distribuida a lo largo de una matriz carbonosa. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por autores como Cardoso *et al.* (2024) y Sopaj *et al.* (2023), quienes analizaron la morfología de electrodos serigrafiados antes de su modificación con nanomateriales de carbono. Adicionalmente, la Figura 9B presenta el mapeo elemental correspondiente al carbono (C), donde se observa una distribución uniforme del elemento sobre la

superficie analizada, con una proporción del 98,8 % en peso, lo cual confirma la predominancia del material carbonoso en el electrodo.

Figura 9

Micrografías SEM con aumento de 100000x y escala de 1 μm para (A) morfología y (B) mapeo elemental de carbono (C) del SPE



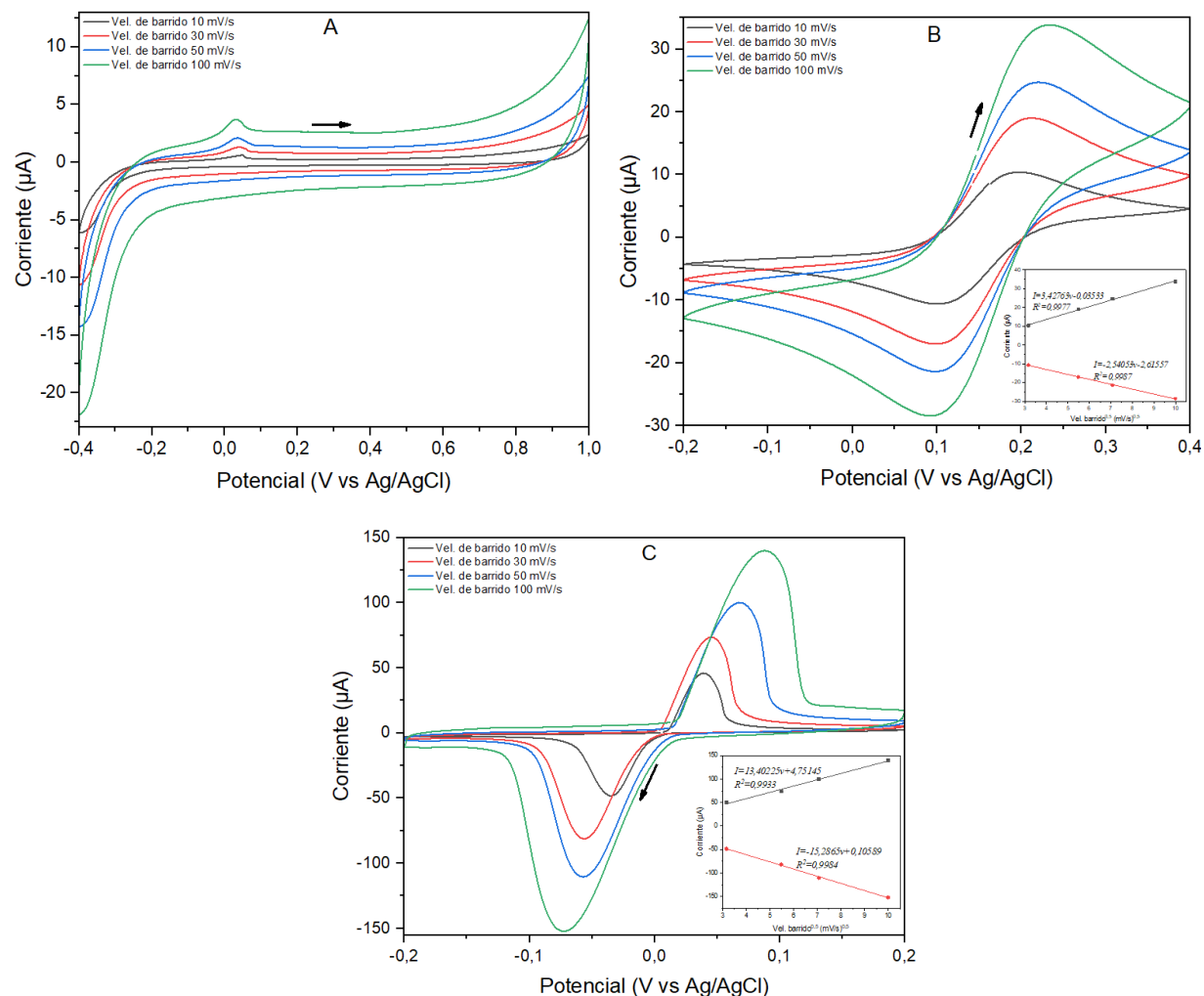
6.2.1.2 Voltametrías cíclicas

La caracterización electroquímica de los electrodos serigrafiados se realizó a partir de voltametrías cíclicas, como se muestra en la Figura 10. Las velocidades de barrido usadas fueron de 10 mV/s, 30 mV/s, 50 mV/s y 100 mV/s, en soluciones de cloruro de potasio, ferricianuro de potasio y cloruro de mercurio.

En las voltametrías realizadas con el electrolito soporte (Figura 10A), se observa que, al aumentar la velocidad de barrido, comienza a aparecer un pequeño pico de oxidación en un potencial cercano a 0–0,1 V. Este pico puede atribuirse a impurezas asociadas al material de impresión del electrodo serigrafiado, y se consideró de poca relevancia, ya que no volvió a presentarse durante las pruebas electroquímicas con otras sustancias.

Figura 10

Voltametrías cíclicas del electrodo serigrafiado sin modificar en concentraciones de (A) KCl 0,1 M, (B) $K_3Fe(CN)_6$ 0,005 M y (C) $HgCl_2$ 0,005 M (1352 ppm)



Por otro lado, en las Figuras 10B y 10C se evaluó la reversibilidad del sistema a cada velocidad de barrido, utilizando como criterio de reversibilidad la relación $I_{p_oxidación}/I_{p_reducción}=1$, tal como se detalla en la Tabla 10. A partir de los valores obtenidos, se puede inferir que los procesos estudiados fueron cuasi reversibles. Cabe destacar que, se observaron mejores resultados a velocidades de 10 mV/s y 30 mV/s, lo que sugiere una mejor difusión de las especies electroactivas y un comportamiento controlado por difusión.

Tabla 10

Corrientes pico de oxidorreducción para el sistema $K_3Fe(CN)_6$ y $HgCl_2$

Velocidad de barrido (mV/s)	$K_3Fe(CN)_6$			$HgCl_2$		
	I_p oxidación (μA)	I_p reducción (μA)	$I_{p\ ox}/I_{p\ red}$	I_p oxidación (μA)	I_p reducción (μA)	$I_{p\ ox}/I_{p\ red}$
10	10,39	-10,60	0,98	49,90	-48,32	1,03
30	19,02	-16,97	1,12	73,61	-81,92	0,92
50	24,71	-21,37	1,16	100,10	-110,41	0,91
100	33,85	-28,47	1,19	139,98	-151,95	0,90

6.2.1.3 Determinación del área electroactiva del SPE

En los procesos de transferencia de electrones electroquímicamente reversibles que involucran especies redox, la ecuación de Randles-Sevcik puede dar indicaciones sobre si un analito se está difundiendo libremente en solución.

$$I_p = 0,446nFAC^0 \left(\frac{nFvD_0}{RT} \right)^{1/2}$$

Si tenemos una solución a 25 °C, la ecuación puede ser simplificada en la siguiente forma:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} AC \sqrt{D_0} \sqrt{v}$$

La ecuación de Randles-Sevcik describe cómo la corriente máxima, I_p (A), aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, v (V/s), donde n es el número de electrones transferidos en el evento redox, A (cm²) es el área de la superficie activa del electrodo, D_0 (cm²/s) es el coeficiente de difusión del analito oxidado, y C (mol/cm³) es la concentración del analito (Elgrishi, N., *et al.*, 2018).

En las Figuras 10B y 10C también se observan las corrientes anódicas y catódicas correspondientes a los picos característicos (I_p), las cuales presentan una relación lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, como se espera para un proceso controlado por difusión. Se obtuvieron coeficientes de correlación (R^2) elevados para las corrientes de oxidación: 0,997 para ferricianuro de potasio (Figura 9B) y 0,993 para cloruro de mercurio (II) (Figura 9C), lo que confirma esta dependencia lineal. Además, utilizando la ecuación de la recta correspondiente al ferricianuro de potasio (calculada en las unidades establecidas por la ecuación de Randles-Sevcik), se determinó el área electroactiva del electrodo serigrafiado de la siguiente manera.

$$I(A) = mv \pm b \quad \text{oxidación} \rightarrow I(A) = 0,0001v - 4 \times 10^{-8}$$

$$I(A) = mv \pm b \quad \text{reducción} \rightarrow I(A) = -0,08008v - 3 \times 10^{-6}$$

$$m = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} AC \sqrt{D_0}$$

Dónde: $n = 1$ para $Fe^{2+/3+}$, $C = 0,005 \text{ mol/L} = 5 \times 10^{-6} \text{ mol/cm}^3$,

$D_0 = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ para $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$

$$A = \frac{m}{2,69 \times 10^5 n^{3/2} C \sqrt{D_0}} = \frac{0,0001}{2,69 \times 10^5 (1)^{3/2} (5 \times 10^{-6}) (\sqrt{7,6 \times 10^{-6}})} = 0,0269 \text{ cm}^2$$

$$A = \frac{m}{2,69 \times 10^5 n^{3/2} C \sqrt{D_0}} = \frac{0,00008}{2,69 \times 10^5 (1)^{3/2} (5 \times 10^{-6}) (\sqrt{7,6 \times 10^{-6}})} = 0,0216 \text{ cm}^2$$

En consecuencia, el área electroactiva del electrodo serigrafiado fue de $2,69 \text{ mm}^2$ para el proceso de oxidación y de $2,16 \text{ mm}^2$ para el de reducción. El valor promedio entre ambos corresponde a un área electroactiva de $2,43 \text{ mm}^2$.

6.2.2 Caracterización SPE/MWCNT

6.2.2.1 Dispersión de los nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT)

La Figura 11 muestra el procedimiento utilizado para la dispersión de los MWCNT. Se prepararon suspensiones en agua tipo 1 con concentraciones de 50, 100 y 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, debido a la naturaleza apolar de los MWCNT, estos no pueden dispersarse adecuadamente mediante agitación mecánica convencional; por ello, fue necesario emplear un sonicador para lograr una dispersión efectiva.

Figura 11

Montaje para la dispersión de los MWCNT en agua



En cuanto a la estabilidad en el tiempo de estas disoluciones, se observó que, a concentraciones elevadas de MWCNT (100–800 $\mu\text{g}/\text{mL}$), los nanotubos comenzaban a precipitar y aglomerarse nuevamente después de aproximadamente 2 a 3 semanas. Además, al ser sometidas a un nuevo proceso de sonicación, las disoluciones no recuperaban completamente su estado de dispersión, como se muestra en la Figura 12, por lo que era necesario prepararlas nuevamente. En contraste, las disoluciones a bajas concentraciones mostraron una mayor estabilidad,

manteniéndose dispersas durante aproximadamente 6 semanas, siempre que se almacenaran en frascos cubiertos con papel aluminio y protegidos de la luz.

Figura 12

Dispersión de 800 µg/mL de MWCNT en agua después de 2 semanas de preparación



6.2.2.2 Voltametrías cíclicas MWCNT/SPE

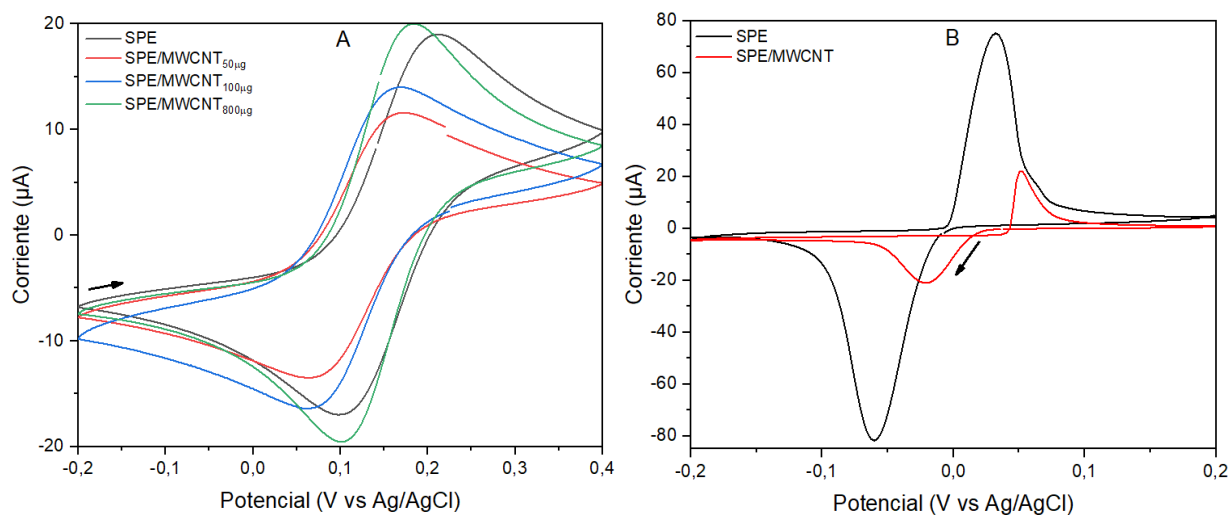
La modificación del electrodo serigrafiado con nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) se realizó mediante la técnica de *drop-casting*. La caracterización electroquímica del sistema SPE/MWCNT se llevó a cabo por voltametría cíclica, como se muestra en la Figura 13, utilizando una velocidad de barrido de 30 mV/s. Esta velocidad fue seleccionada con base en resultados anteriormente descritos, en los que se observó una adecuada difusión de las especies redox en el rango de 10–30 mV/s.

En la Figura 13A, se comparan las curvas voltamétricas del electrodo serigrafiado sin modificar con aquellas obtenidas tras la modificación con nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) a concentraciones de 50, 100 y 800 µg/mL. Se observó una disminución en las corrientes pico para las concentraciones de 50 y 100 µg/mL, mientras que a 800 µg/mL se registró un leve aumento, considerado poco significativo para la concentración que se manejó. Sin

embargo, estos resultados pueden atribuirse al uso de altas concentraciones de MWCNT, aunque se haya usado una sonda de ultrasonido para dispersar los nanotubos, favorece la formación de agregados durante la dispersión en agua, por esta razón Qu, C., *et al.*, (2016) propone agregar agentes dispersantes como PVP en soluciones acuosas y así evitar que se generen capas sobre la superficie del electrodo que dificulten la difusión del analito. No se consideró el uso de agentes dispersantes en las disoluciones, ya que estos podrían interferir posteriormente con la inmovilización del elemento de reconocimiento biológico. Además, los resultados obtenidos también reflejan una disminución en el área electroactiva del electrodo, lo que concuerda con la disminución de las señales de corriente.

Figura 13

Voltametrías cíclicas a velocidad de barrido de 30 mV/s y electrolito KCl 0,1 M en configuración MWCNT/SPE de (A) $K_3Fe(CN)_6$ 0,005 M y (B) $HgCl_2$ 0,005 M

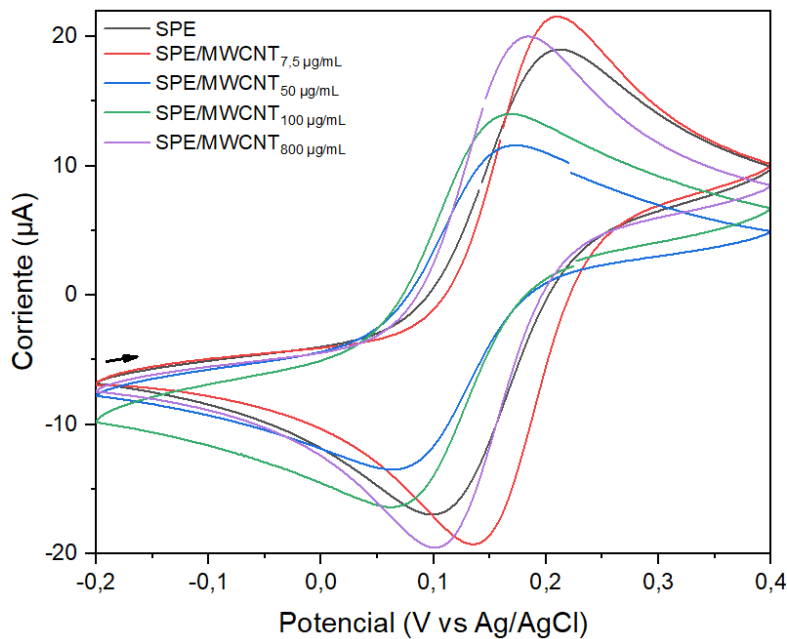


Adicionalmente, en la Figura 13B se comparan las respuestas voltamperométricas del electrodo serigrafado sin modificar y del electrodo modificado con MWCNT en una solución de cloruro de mercurio (II) 0,005 M (1352 ppm). Se observa una disminución significativa en las

corrientes pico del Hg^{2+} cuando se emplea el electrodo modificado, lo que sugiere una afectación en el proceso de difusión del analito hacia la superficie activa. Este comportamiento respalda la hipótesis de que el uso de concentraciones elevadas de MWCNT dificulta el transporte del analito. Como resultado, se repitieron las pruebas electroquímicas utilizando concentraciones más bajas de MWCNT, encontrándose una mejor respuesta electroquímica a una concentración de $7,5 \mu\text{g/mL}$ como se puede evidenciar en la Figura 14.

Figura 14

Voltametría cíclica a velocidad de barrido de 30 mV/s usando como electrolito KCl 0,1 M en configuración MWCNT $_{7,5\mu\text{g/mL}}$ /SPE de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,005 M



6.2.3 Caracterización SPE/MWCNT/PÉPTIDO

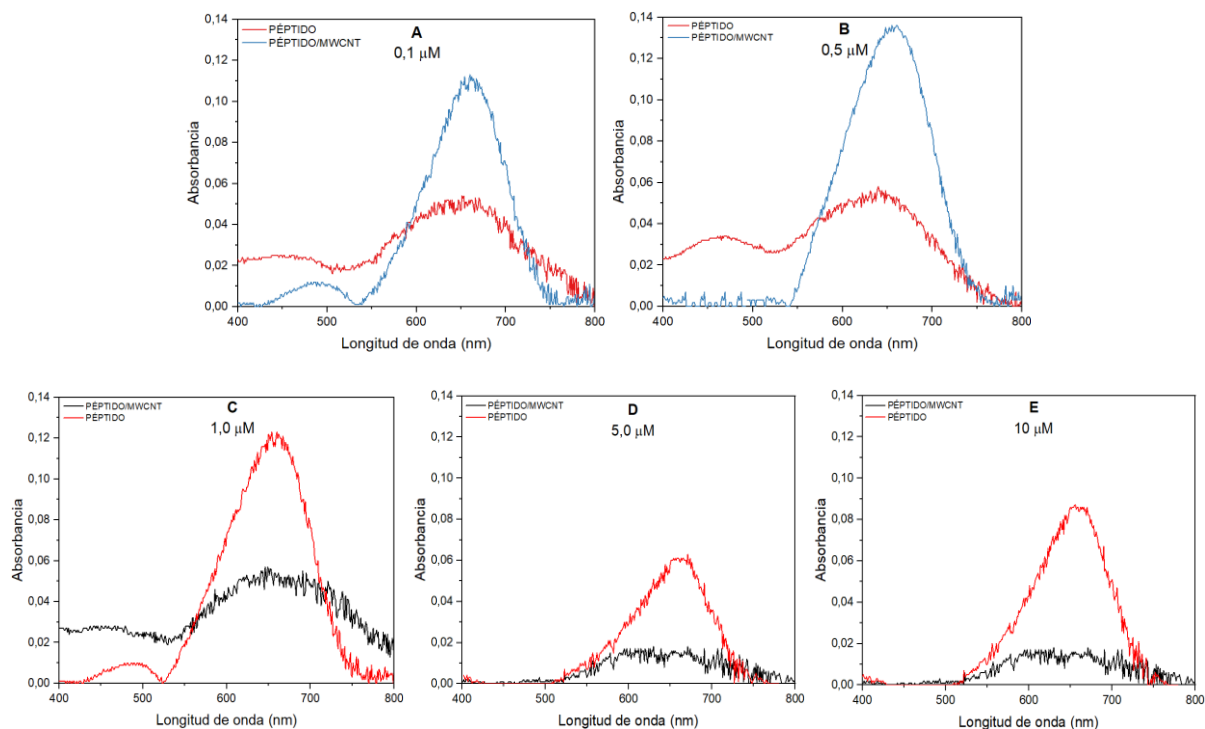
6.2.3.1 Porcentaje de inmovilización

Se realizaron diluciones de la secuencia DGPFHR a distintas concentraciones para realizar lecturas mediante espectrofotometría UV-Vis, y posteriormente se analizó el sobrenadante tras la

inmovilización de DGPFHR sobre MWCNT. Los espectros resultantes se pueden ver en la Figura 15. Las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 595 nm y se calculó el porcentaje de inmovilización, como se muestra en la Tabla 11.

Figura 15

Espectros UV-VIS del método de Bradford para la secuencia DGPFHR y DGPFHR/MWCNT_{7,5μg/mL} en concentraciones peptídicas de: (A) 0,1 μM, (B) 0,5 μM, (C) 1,0 μM, (D) 5,0 μM y (E) 10,0 μM



En la Figura 15A y 15B se observa un comportamiento particular, ya que el pico de absorbancia del péptido es menor que el de la solución correspondiente al sobrenadante tras la inmovilización MWCNT/PÉPTIDO. Esta inversión en los valores de absorbancia genera porcentajes de inmovilización negativos, como se muestra en la Tabla 11. Por otra parte, en la investigación realizada por Ernst y Zor (2010) se concluyó que el método de Bradford muestra una

buena sensibilidad para concentraciones en el rango de 2 a 40 $\mu\text{g/mL}$. Esto implica que los porcentajes de inmovilización calculados a concentraciones de 0,1 μM (0,07 $\mu\text{g/mL}$) y 0,5 μM (0,36 $\mu\text{g/mL}$) reflejan la limitante del método para cuantificar con precisión cantidades tan bajas de péptido, más que un fenómeno real de desorción o liberación del péptido.

Tabla 11

% de inmovilización de la secuencia peptídica a los nanotubos de carbono

Concentración de péptido (μM)	Abs PÉPTIDO	Abs PÉPTIDO/MWCNT	% Inmovilización
0,1	0,040	0,042	-5,0 %
0,5	0,047	0,068	-44,6 %
1,0	0,065	0,040	38,5 %
5,0	0,030	0,017	43,3%
10	0,038	0,017	55,3 %

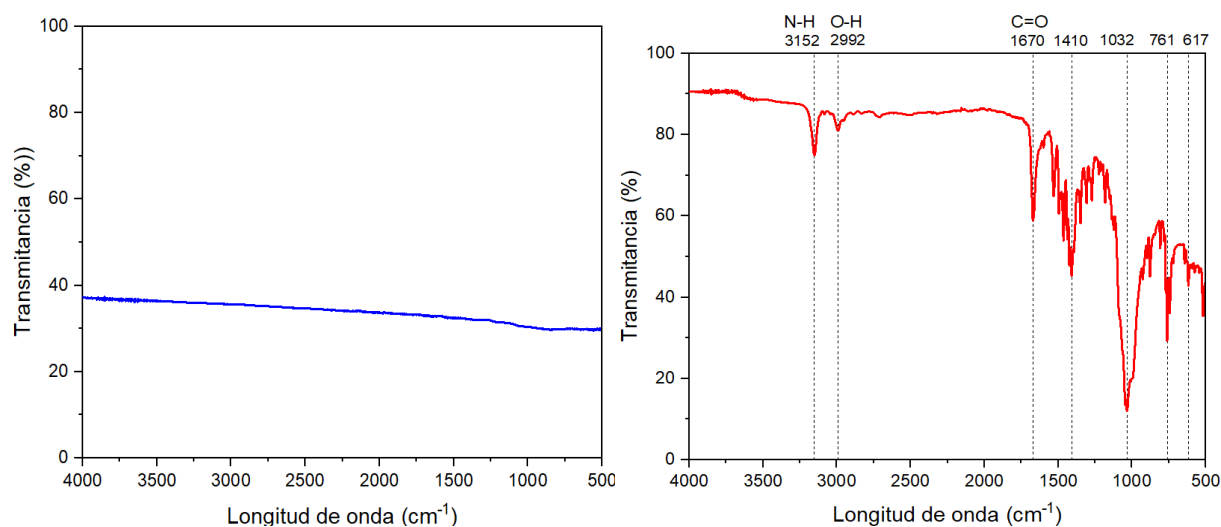
Por el contrario, a concentraciones más altas de la secuencia peptídica, el pico de absorbancia del péptido se sitúa por encima del de la muestra inmovilizada, lo cual concuerda con lo esperado. Este comportamiento indica que el espectro inicial representa la secuencia peptídica libre en solución, mientras que el espectro posterior refleja únicamente la fracción del péptido que no fue inmovilizada sobre los nanotubos de carbono.

6.2.3.2 Análisis de FTIR

Para confirmar la inmovilización del péptido sobre MWCNT a bajas concentraciones, se realizaron análisis por espectroscopía infrarroja por reflectancia total atenuada con transformada de Fourier (FTIR-ATR). El objetivo fue caracterizar la química superficial tras la modificación MWCNT/DGPEFER, mediante la identificación de los enlaces correspondientes a los grupos funcionales orgánicos presentes en la secuencia peptídica, como se muestra en la Figura 16.

Figura 16

Espectro FTIR-ATR de la configuración SPE/MWCNT y SPE/MWCNT/DGPEFER, correspondiente a una concentración de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT y 0,1 μM de DGPEFER.



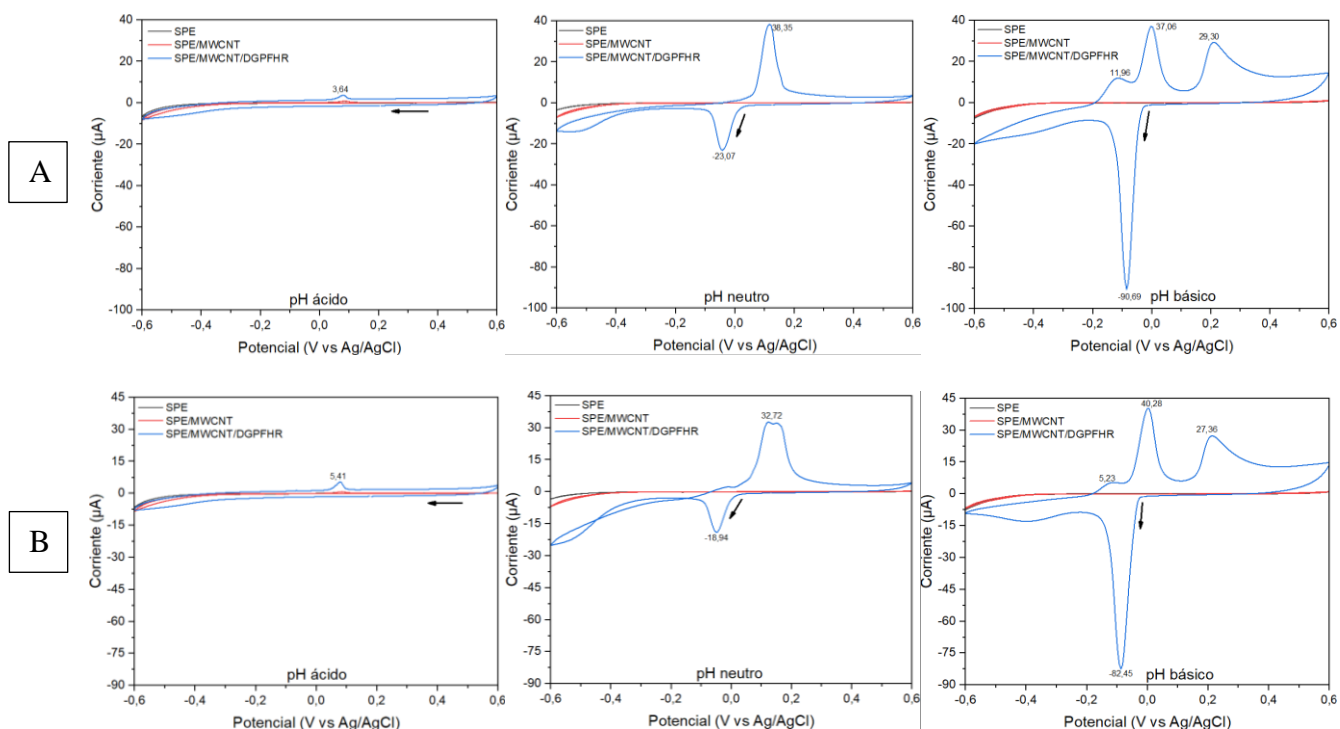
El espectro azul representa a los nanotubos de carbono (SPE/MWCNT), los cuales no muestran una señal debido a que los nanotubos no son visibles por esta técnica, mientras que, el espectro rojo (SPE/MWCNT/DGPEFER) representa las bandas características comunes a cualquier aminoácido presente en la secuencia, incluyen la banda de absorción del grupo carboxilo (C=O) alrededor de 1670 cm^{-1} , la del grupo amino (N-H) en 3152 cm^{-1} y la vibración del enlace O-H del grupo carboxilo en 2992 cm^{-1} . Estas señales concuerdan con los rangos reportados en la literatura (Ghafuri *et al.*, 2021). Además, se identificaron bandas alrededor de 700 cm^{-1} que podrían corresponder a la deformación fuera del plano del grupo NH_2 en la glicina, así como vibraciones en el rango de 1000–1500 cm^{-1} atribuibles a enlaces C-N y C-C, posiblemente asociados con la presencia de ácido aspártico, glicina y fenilalanina. En conclusión, los resultados obtenidos permiten demostrar de forma cualitativa que, incluso a bajas concentraciones de péptido, se logra su inmovilización sobre los nanotubos de carbono de paredes múltiples.

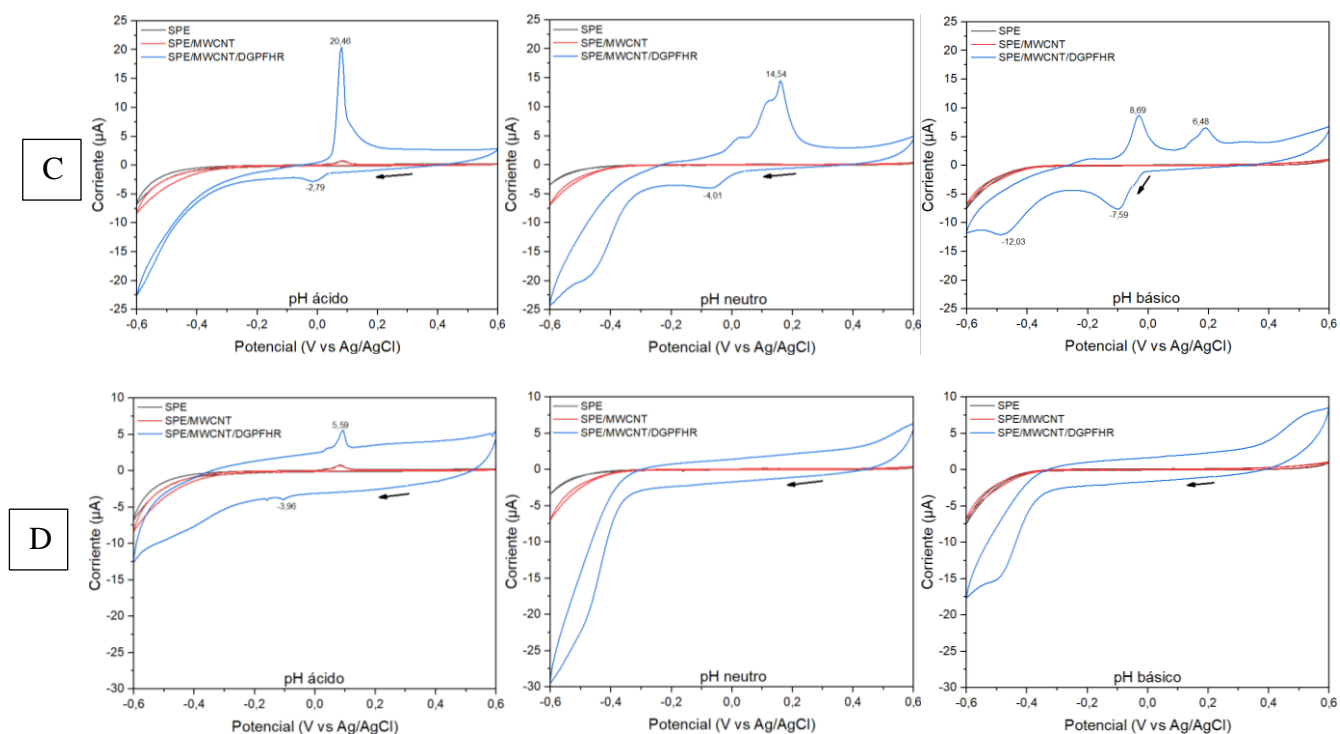
6.2.3.3 Selección de la concentración de péptido

Para definir la concentración óptima de péptido para los ensayos posteriores, se evaluaron distintas concentraciones de las secuencias DGPfHR y DGPEFER (0,1, 0,5, 1,0, y 5,0 μM), utilizando una concentración constante de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT. Tras la construcción del biosensor, se realizaron voltametrías cíclicas en presencia de 1 ppm de HgCl_2 , empleando como electrolito soporte una solución de KCl, y se evaluó el comportamiento electroquímico en condiciones de pH ácido, neutro y básico. Los resultados obtenidos para la secuencia DGPfHR se presentan en la Figura 17, y los correspondientes a DGPEFER en la Figura 18.

Figura 17

Voltametrías cíclicas registradas a una velocidad de barrido de 30 mV/s en presencia de 1 ppm de HgCl_2 , utilizando como electrolito una solución de KCl 0,1 M y la configuración DGPfHR/MWCNT/SPE. Se evaluaron tres condiciones de pH: 2,25, 6,88 y 11,89, para las siguientes concentraciones de DGPfHR: (A) 0,1 μM , (B) 0,5 μM , (C) 1,0 μM y (D) 5,0 μM

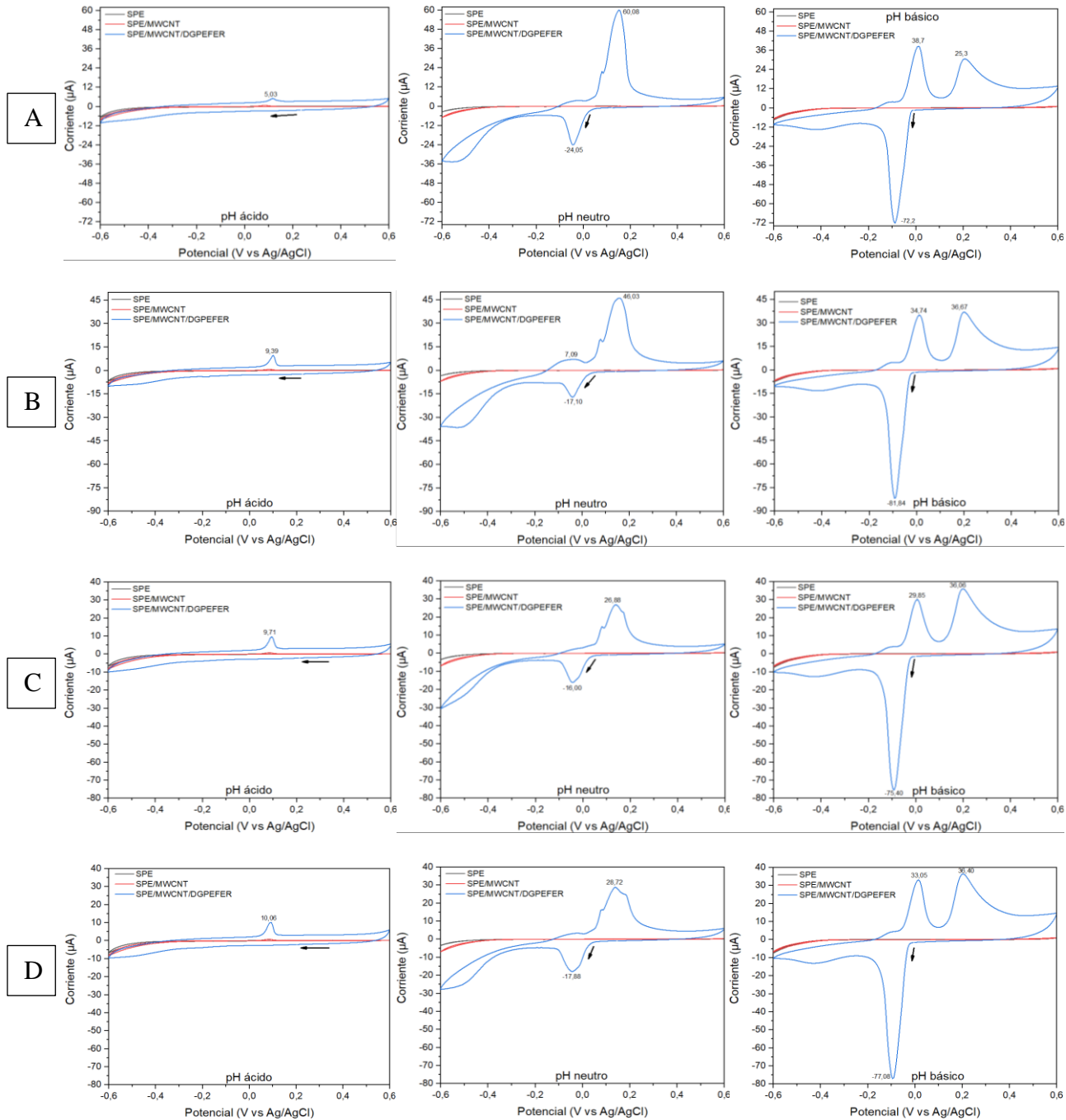




En general, los resultados obtenidos en la Figura 17 para la secuencia DGPfHR muestran que, a medida que aumenta la concentración del péptido, se reducen significativamente las corrientes de oxidación y reducción. Este efecto es particularmente evidente en la Figura 17D, donde no se observan cambios notorios en las regiones anódica y catódica a pH neutro y básico. En el caso de la secuencia DGPEFER (Figura 18), se obtuvo una mejor respuesta electroquímica en el mismo rango de concentraciones. No obstante, en ambos casos, las respuestas más favorables se observaron a bajas concentraciones de péptido (0,1 y 0,5 μM). Este comportamiento puede atribuirse a la pasivación del electrodo de trabajo del biosensor, provocada por una cobertura excesiva del péptido que limita la transferencia electrónica de los iones Hg^{2+} . Además, la aparición de picos redox secundarios en algunas curvas voltamétricas sugiere la formación de complejos electroactivos, aspecto que se abordará más adelante.

Figura 18

Voltametrías cíclicas (30 mV/s) en configuración SPE/MWCNT/DGPEFER con 1 ppm de $HgCl_2$ y KCl 0,1 M como electrolito, evaluadas a pH 2,25, 6,88 y 11,89 para distintas concentraciones de DGPEFER: (A) 0,1 μM , (B) 0,5 μM , (C) 1,0 μM , y (D) 5,0 μM .



Adicionalmente, las curvas obtenidas a pH ácido, para ambas secuencias peptídicas, mostraron las menores respuestas amperométricas, por lo que se descartó trabajar en este rango de pH. En consecuencia, se estableció como condición óptima una concentración de 0,1 μM para ambas secuencias, evaluadas en soluciones de cloruro de mercurio (II) a pH neutro y básico, ya que en estas condiciones se obtuvieron respuestas ligeramente superiores.

6.2.3.4 Diagrama de Pourbaix

A partir de los voltamperogramas mostrados en la Figuras 17A y 18A, se evidencia la formación de especies o complejos de mercurio en solución para medio básico. Para identificar las especies predominantes de Hg^{2+} , se construyó un diagrama de Pourbaix, presentado en la Figura 19. Estos diagramas son representaciones gráficas que muestran las fases estables de un elemento en función del pH y el potencial electroquímico, permitiendo predecir las especies químicas predominantes según las condiciones del entorno. Las soluciones utilizadas contenían cloruro de mercurio (II) y cloruro de potasio, por lo que las especies formadas surgen de las posibles reacciones redox entre los iones Hg^{2+} , Cl^- y H^+ .

Para la construcción del diagrama se utilizó el software de acceso libre Hydra–Medusa, considerando los iones mencionados como componentes del sistema. A partir de ellos, el programa generó los complejos y fases relevantes del sistema $\text{Hg}^{2+}\text{--Cl}^-\text{--H}_2\text{O}$.

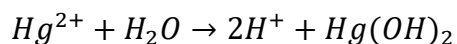
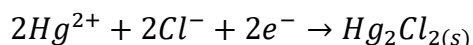
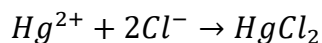
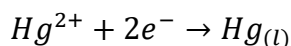
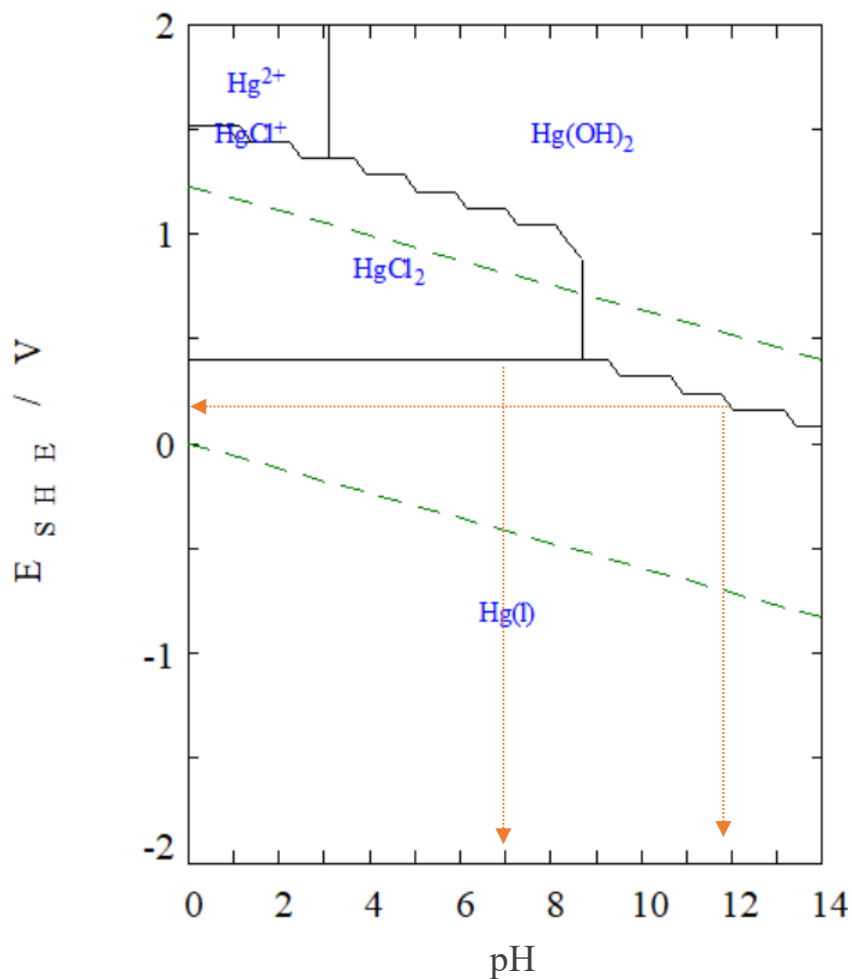


Figura 19

Diagrama de equilibrio potencial-pH a 25°C para el sistema $\text{Hg}^{2+}-\text{Cl}^{-}-\text{H}_2\text{O}$ a partir de una solución de HgCl_2 $3,68 \times 10^{-6} \text{ M}$ (1 ppm) y KCl 0,1 M



Con el fin de comparar los resultados experimentales con el diagrama, fue necesario ajustar los valores de potencial obtenidos en las voltametrías (Figuras 17A y 18A) a la escala de potencial del electrodo estándar de hidrógeno (E_{SHE}), a partir de la siguiente ecuación.

$$E_{\text{SHE}} = E_{\text{Ag/AgCl}} + 0,197 \text{ V} \quad (T = 25 \text{ }^\circ\text{C})$$

$$\text{Para pH neutro} \rightarrow E_{\text{SHE}} = 0,18 \text{ V} + 0,197 \text{ V} = 0,38 \text{ V}$$

$$\text{Para pH básico} \rightarrow E_{\text{SHE}} = 0,0 \text{ V} + 0,197 \text{ V} = 0,20 \text{ V}$$

En condiciones de pH neutro, se observó un pico de oxidación alrededor de 0,18 V vs Ag/AgCl, que al ajustarse corresponde aproximadamente a 0,38 V vs SHE. Este valor concuerda con el inicio de la región de estabilidad del cloruro de mercurio (II) (HgCl_2), según el diagrama de Pourbaix. A pH básico (alrededor de 12), se registró un pico de oxidación cercano a 0,0 V vs Ag/AgCl, equivalente a 0,20 V vs SHE. Este potencial se encuentra al inicio de la región de predominancia del hidróxido de mercurio (II) ($\text{Hg}(\text{OH})_2$), lo cual indica una buena correspondencia entre los resultados experimentales y el diagrama.

Sin embargo, la voltametría realizada involucra procesos dinámicos, y a pH básico se observan dos picos adicionales que no pueden atribuirse con certeza a especies específicas. Esto se debe a que los diagramas de Pourbaix reflejan únicamente el equilibrio termodinámico del sistema, sin contemplar efectos cinéticos, fenómenos de adsorción superficial ni transiciones rápidas entre especies. A pesar de estas limitaciones, el diagrama generado con Hydra–Medusa representa adecuadamente las regiones de estabilidad de las especies mayoritarias, y muestra una buena concordancia con los potenciales observados en los voltamperogramas.

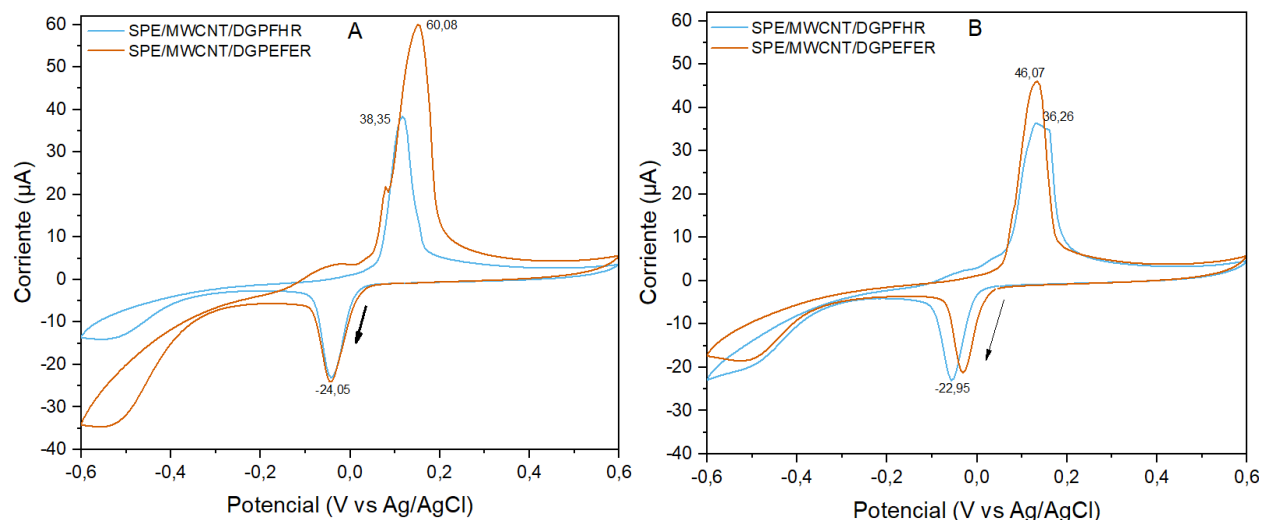
6.2.3.5 Comparación de secuencias DGPFHR y DGPEFER

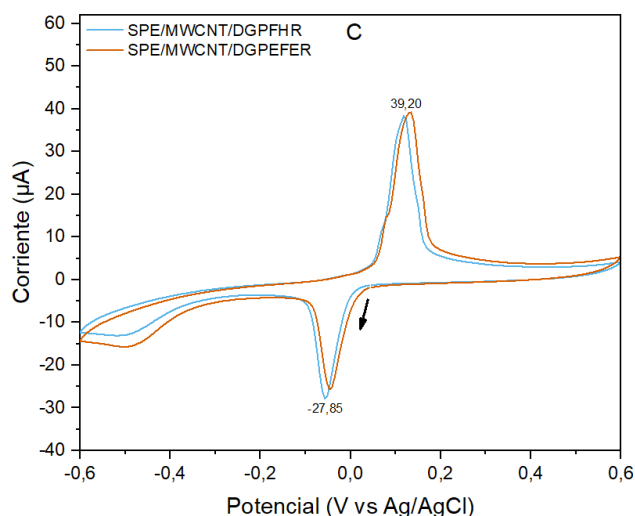
De acuerdo con el capítulo anterior, se concluyó que la secuencia DGPEFER sería seleccionada para su síntesis, ya que mostró una mejor interacción con los iones Hg^{2+} en comparación con las demás propuestas, incluida la secuencia sugerida por Li *et al.* (DGPFHR). Para evaluar la respuesta electroquímica de ambas secuencias, se realizaron voltametrías cíclicas en presencia de cloruro de mercurio (II) a distintas concentraciones. Los resultados obtenidos a pH neutro se resumen en la Figura 20, mientras que los correspondientes a pH básico se incluyen en el Apéndice B (página 100).

Como se puede apreciar, los picos redox correspondientes a la secuencia DGPFR en concentraciones de 1, 10 y 100 ppm de HgCl_2 son muy similares entre sí, lo que sugiere una baja sensibilidad del sistema en ese rango. En cambio, para la secuencia DGPEFER, se observa un aumento progresivo en la corriente del pico anódico a medida que se disminuye la concentración (60,08, 46,07 y 39,20 mV). En conjunto, estos resultados indican que la secuencia DGPEFER, propuesta en esta investigación, presenta una mejor respuesta electroquímica, especialmente en la región anódica. Este hallazgo representa un avance significativo en el desarrollo de biosensores electroquímicos, ya que se trata de una secuencia peptídica no reportada previamente para la detección de iones mercurio (II), lo cual abre nuevas posibilidades para el diseño de sistemas de detección biológica más selectivos.

Figura 20

Voltametrías cíclicas registradas a una velocidad de barrido de 30 mV/s, utilizando como electrolito una solución de KCl 0,1 M a pH 6,88, MWCNT (7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DGPFR y DGPEFER (0,1 μM) para la configuración SPE/MWCNT/PÉPTIDO en las siguientes concentraciones de HgCl_2 , (A) 1 ppm (B) 10 ppm (C) 100 ppm.





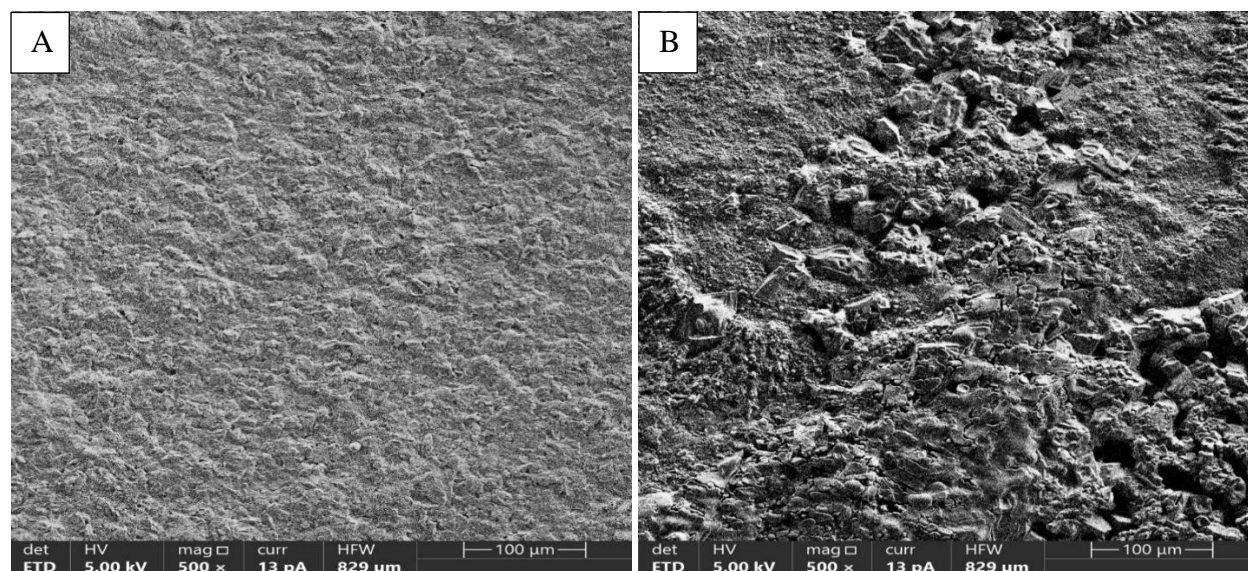
6.2.3.6 Caracterización morfológica

A partir de las micrografías SEM, mostradas en la Figura 21, se evaluó la calidad de la deposición comparando la morfología del electrodo serigrafiado sin modificar (SPE) de la Figura 20A y del biosensor modificado (SPE/MWCNT/DGPEFER) de la Figura 21B, ambas tomadas con un aumento de 500x. Como se mencionó anteriormente, la imagen del electrodo SPE presenta una superficie relativamente lisa y homogénea, característica de los electrodos comerciales. En comparación, la imagen del electrodo modificado revela una superficie notablemente más rugosa y heterogénea, con acumulaciones irregulares que corresponden a la deposición del nanocompuesto MWCNT/PÉPTIDO.

Este cambio morfológico sugiere una modificación efectiva, aunque parcialmente homogénea, ya que pueden observarse zonas con densidades de recubrimiento variables. La presencia de estructuras porosas y agregados de la Figura 21B también indica una posible mejora del área superficial activa del electrodo, lo que es favorable para procesos de adsorción o interacción con el analito.

Figura 21

Micrografías SEM con detector ETD (100 µm) y aumento de 500x para (A) SPE y (B) SPE/MWCNT/DGPEFER.

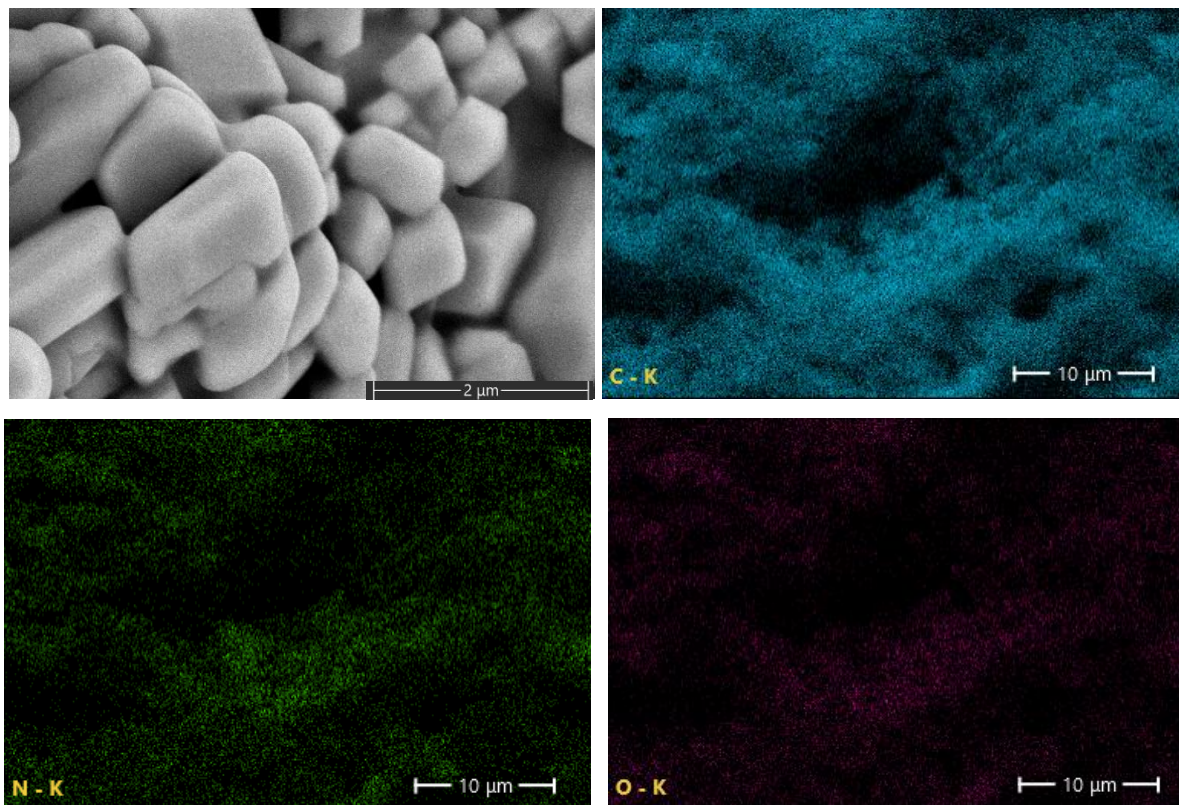


Por otra parte, se realizó un análisis elemental del biosensor (SPE/MWCNT/DGPEFER), representado en la Figura 22. Los resultados mostraron porcentajes en peso de 57,3 % de carbono (C), 29,7% de nitrógeno (N) y 13,0 % de oxígeno (O). Esta composición es coherente con los materiales depositados sobre el electrodo, ya que refleja la presencia de los nanotubos de carbono (fuente principal de C) y del péptido, el cual contribuye principalmente con los elementos N y O.

La presencia significativa de nitrógeno y oxígeno en la superficie modificada respalda la incorporación efectiva del péptido DGPEFER, ya que estos elementos no están presentes en los MWCNT en cantidades apreciables. En particular, el nitrógeno está asociado a los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos, mientras que el oxígeno puede provenir tanto de grupos carboxilo residuales de los MWCNT como de enlaces peptídicos.

Figura 22

Micrografías SEM con aumento de 50000x y escala de 2 μm para la configuración SPE/MWCNT/DGPEFER en (A) morfología y (B) mapeo elemental de carbono (C) mapeo elemental de nitrógeno y (D) mapeo elemental de oxígeno.



Estos resultados, en conjunto con el predominio del carbono, confirman una modificación superficial exitosa y coherente con la composición esperada del nanomaterial y del elemento de reconocimiento biológico depositado.

6.2.4 Conclusiones parciales

La concentración óptima para la deposición de nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) sobre el electrodo serigrafado fue de 7,5 $\mu\text{g/mL}$, ya que a este valor se obtuvo una

buena estabilidad de la dispersión en el tiempo, sin formación de precipitados, y una mejor respuesta electroquímica en comparación con concentraciones más elevadas.

En cuanto a las secuencias peptídicas, las mejores respuestas voltamperométricas se observaron a una concentración de $0,1 \mu\text{M}$ para ambas secuencias estudiadas (DGPFHR y DGPEFER). A concentraciones superiores, se evidenció una disminución en la corriente, atribuida a la pasivación del electrodo provocada por una cobertura en exceso del péptido.

La inmovilización del péptido sobre los MWCNT pudo confirmarse cuantitativamente mediante el método de Bradford solo a concentraciones mayores a $1,0 \mu\text{M}$. Para concentraciones más bajas, la confirmación fue cualitativa mediante análisis FTIR, que mostró bandas características de los grupos funcionales presentes en la secuencia peptídica y en los nanotubos funcionalizados. Adicionalmente, el análisis morfológico mediante SEM confirmó una modificación superficial efectiva tras la inmovilización del sistema MWCNT/DGPEFER sobre el electrodo.

El diagrama de Pourbaix generado para el sistema $\text{Hg}^{2+}\text{-Cl}^-\text{-H}_2\text{O}$ permitió predecir las especies predominantes de mercurio en solución. Los potenciales registrados experimentalmente en voltametrías cíclicas coincidieron con las regiones de estabilidad de HgCl_2 (a pH neutro) y $\text{Hg}(\text{OH})_2$ (a pH básico), lo que sugiere una buena concordancia entre los datos experimentales y las condiciones termodinámicas del sistema.

Finalmente, la comparación entre las secuencias DGPFHR y DGPEFER demostró que la secuencia propuesta en esta investigación (DGPEFER) presenta una mejor interacción con los iones Hg^{2+} , reflejada en corrientes pico más altas, especialmente en la región anódica. Estos resultados validan su selección como elemento de reconocimiento para la construcción del biosensor electroquímico.

7. CAPÍTULO 3: PARÁMETROS DE DETECCIÓN DEL BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO

En el capítulo final de esta investigación se aborda la capacidad electroquímica del biosensor diseñado para la detección de iones de mercurio (Hg^{2+}). La caracterización del sistema se llevó a cabo mediante la construcción de curvas de calibración, a partir de las cuales se analizó la intensidad de corriente generada frente a concentraciones conocidas de cloruro de mercurio (II). Asimismo, se evaluaron parámetros fundamentales como la sensibilidad, límites de detección y cuantificación, estabilidad, reproducibilidad y selectividad con el objetivo de validar el desempeño del biosensor en matrices acuosas bajo condiciones controladas. El desarrollo de esta investigación representó el primer esfuerzo dentro del grupo de investigación en la construcción de plataformas biosensoras para metales pesados, y establece las bases para el diseño futuro de un prototipo funcional capaz de realizar mediciones electroquímicas en tiempo real.

7.1 Metodología

7.1.1 *Condiciones de la técnica electroquímica*

La voltametría de redisolución anódica (ASV) se considera una técnica electroanalítica potente, versátil y de bajo costo. Su principal característica reside en la preconcentración del analito en el electrodo, seguida de un barrido de potencial para disolver las especies de interés preconcentradas (Borrill, *et al.*, 2019). Para esta etapa, el barrido de potencial se analizó mediante voltametría de pulso diferencial (DPV) ya que esta técnica es ampliamente usada para detección de iones metálicos por su sensibilidad y la formación de picos nítidos, lo que permitiría cuantificar con un límite de detección bajo. Inicialmente se realizaron pruebas a concentración constante de cloruro de mercurio en la solución, mientras se evaluaron diferentes parámetros experimentales,

como el tiempo de preconcentración (30, 60 y 90 s) y el potencial de preconcentración (-0,30, -0,50 y -0,60 V).

7.1.2 Curva de calibración

Una vez definidas las condiciones electroquímicas, se procedió a realizar las mediciones correspondientes a la calibración del biosensor. Para ello, se prepararon seis soluciones de cloruro de mercurio (II) con concentraciones de 0,01; 0,50; 2,50; 5,00; 7,50 y 10,0 ppm, respectivamente. El estudio se llevó a cabo en condiciones de pH neutro y básico, utilizando un biosensor independiente para cada concentración. Cada medición fue realizada por triplicado con el fin de garantizar la reproducibilidad de los resultados. Posteriormente, se registraron las corrientes pico obtenidas para cada concentración, con el objetivo de establecer una relación lineal entre la concentración del analito (variable independiente) y la respuesta electroquímica del sistema (variable dependiente).

7.1.3 Estabilidad y reproducibilidad

Para evaluar la estabilidad (repetibilidad) del biosensor electroquímico, se registraron durante tres días consecutivos las respuestas de corriente obtenidas por voltametría de pulso diferencial (DP-ASV) utilizando un mismo biosensor, a una concentración de 5,00 ppm. Por otro lado, con el fin de determinar la reproducibilidad, se fabricaron tres electrodos diferentes, los cuales fueron evaluados bajo la misma concentración (2,50 ppm), registrando los respectivos picos de corriente. En ambos casos, se calcularon la desviación estándar y el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) entre las mediciones, con el objetivo de cuantificar la dispersión y consistencia de las respuestas obtenidas.

7.1.4 Selectividad

Para evaluar la selectividad del biosensor electroquímico, se prepararon soluciones de sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) y se diluyeron hasta tener una concentración de 5,0 ppm. Se analizó la respuesta electroquímica del biosensor a partir de voltametría de pulso diferencial (DP-ASV) para cada solución por separado y posteriormente se evaluó una solución mixta que contenía iones de Pb^{2+} , Mn^{2+} y Hg^{2+} en un tercer biosensor.

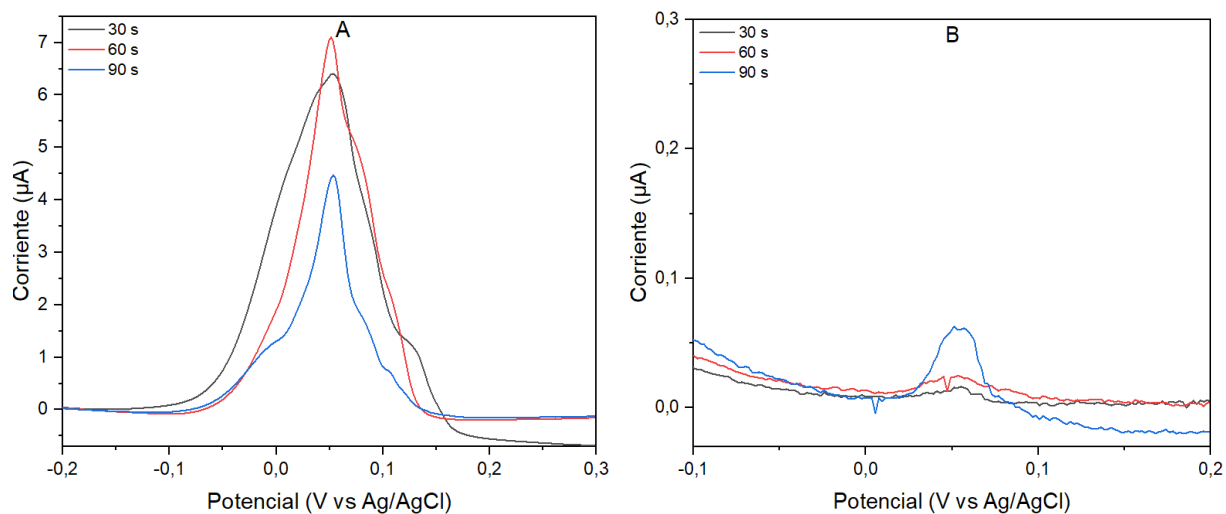
7.2 Resultados y discusión

7.2.1 Selección de variables de trabajo

Con el fin de establecer las condiciones de operación para las pruebas electroquímicas, se realizaron ensayos preliminares que permitieron identificar los parámetros más adecuados para la técnica utilizada. Las condiciones de trabajo empleadas fueron una amplitud de 40 mV, un paso de potencial de 2 mV y un tiempo modular de 0,05 s, ya que estos valores ofrecieron una mayor intensidad de señal. Con base en dichos parámetros, se llevaron a cabo los barridos voltamétricos presentados en la Figura 23, con el propósito de evaluar la respuesta del biosensor frente a diferentes tiempos de preconcentración.

Figura 23

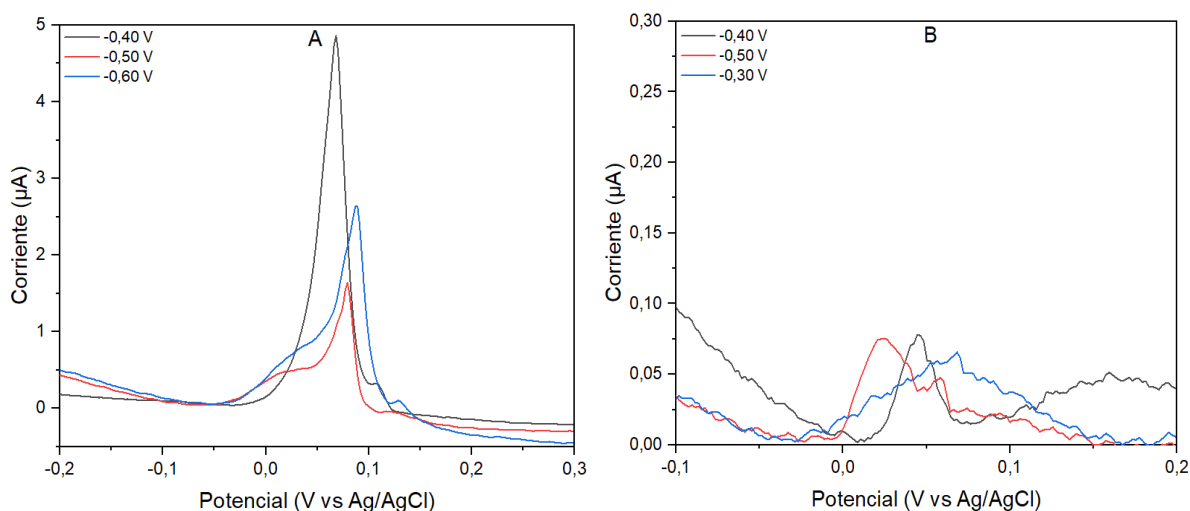
Voltametrías de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} $\mu\text{g}/\text{mL}$ /DGPEFER_{0,1} μM a 10 ppm de HgCl_2 y KCl 0,1 M como electrolito soporte para distintos tiempos de preconcentración para: (A) pH neutro y (B) pH básico, a un potencial de preconcentración de -0,5 V



De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 23, se observó que la respuesta electroquímica más favorable en condiciones de pH neutro se obtuvo con tiempos de preconcentración entre 30 y 60 segundos. Esto sugiere que dicho intervalo es suficiente para permitir la reducción eficiente de iones Hg^{2+} a Hg^0 sobre la superficie del electrodo. Considerando la similitud en la intensidad de corriente registrada para ambos tiempos, se seleccionó un tiempo de preconcentración de 30 segundos, optimizando así el tiempo de análisis sin comprometer la sensibilidad del sistema. En contraste, bajo condiciones de pH básico, el tiempo de preconcentración óptimo fue de 90 segundos; sin embargo, las señales de corriente obtenidas fueron considerablemente más bajas en comparación con las registradas a pH neutro. Para corroborar estos resultados y profundizar en el análisis del cambio abrupto en la intensidad de corriente asociado al pH del medio, se realizaron pruebas adicionales modificando el potencial de preconcentración, como se muestra en la Figura 24.

Figura 24

Voltametrías de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} $\mu\text{g/mL}$ /DGPEFER_{0,1} μM a 10 ppm de HgCl_2 y KCl 0,1 M como electrolito para distintos voltajes de preconcentración para: (A) pH neutro ($t_{\text{preconcentración}}$ 60 s) y (B) pH básico ($t_{\text{preconcentración}}$ 90 s)



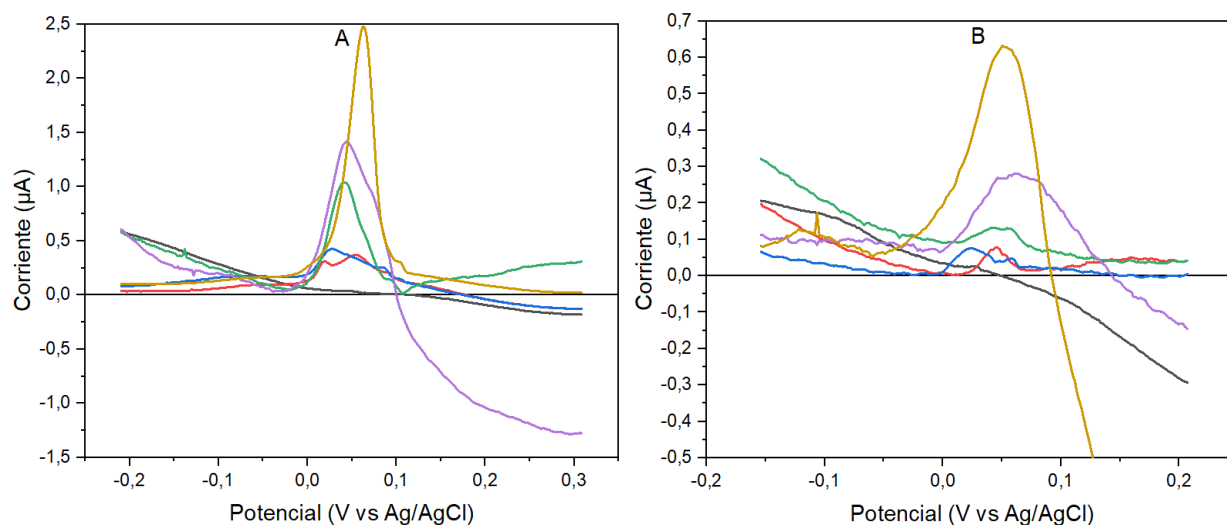
Según los resultados mostrados en las Figuras 23A y 24A, el biosensor electroquímico presenta un comportamiento óptimo bajo condiciones de preconcentración de $-0,40$ V y 30 segundos, evidenciado por una mayor intensidad de corriente en pH neutro. Sin embargo, al modificar el medio a pH básico, se observa una disminución considerable en la señal voltamétrica (Figura 24B). Este comportamiento puede explicarse a partir del diagrama de Pourbaix previamente analizado, el cual indica que en condiciones básicas y dentro del intervalo de potenciales evaluado, el ion Hg^{2+} tiende a formar especies insolubles, principalmente hidróxido de mercurio ($\text{Hg}(\text{OH})_2$). La precipitación de esta especie, favorecida por la alta concentración de iones hidroxilo (OH^-), disminuye la cantidad de mercurio disponible en solución para ser reducido a Hg^0 sobre la superficie del electrodo, lo que justifica la menor respuesta en corriente registrada bajo estas condiciones.

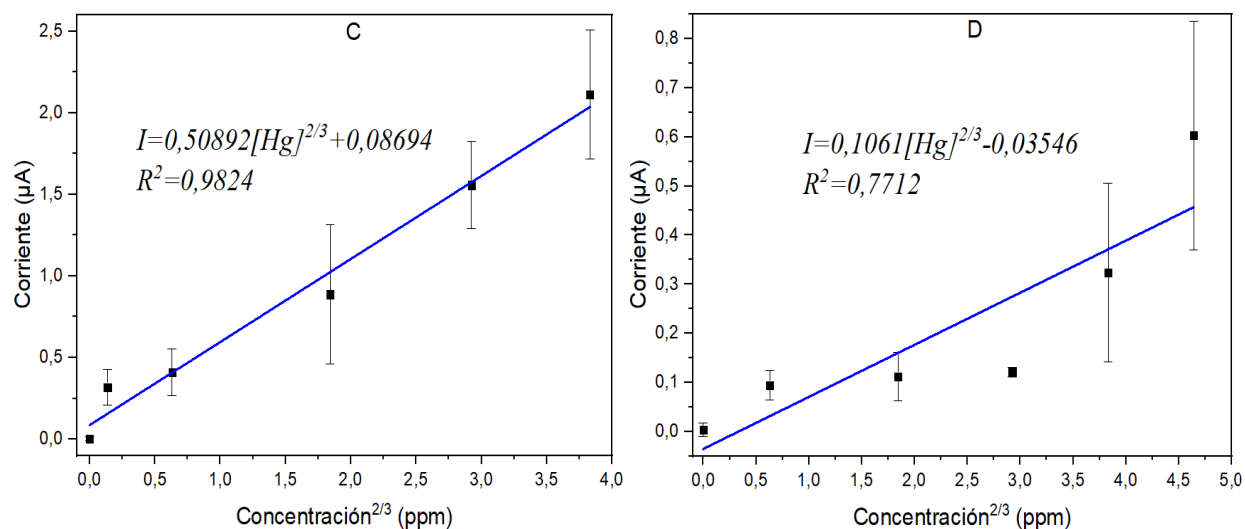
7.2.2 Calibración del biosensor electroquímico

El biosensor electroquímico desarrollado fue evaluado frente a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio. Las condiciones de preconcentración o disolución anódica fueron de 30 segundos a $-0,4$ V para pH neutro, y de 90 segundos a $-0,4$ V para pH básico. Por su parte, los parámetros del barrido de pulso diferencial se establecieron en una amplitud de 40 mV y un paso de potencial de 2 mV. La Figura 25 muestra la respuesta electroquímica obtenida mediante la técnica DP-ASV al variar el pH del medio entre condiciones neutras y básicas. A partir de la señal registrada para cada concentración, se construyeron las curvas de calibración correspondientes para cada condición del biosensor (Figuras 25C y 25D).

Figura 25

Voltametrías de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} $\mu\text{g/mL}$ /DGPEFER_{0,1} μM , utilizando KCl 0,1 M como electrolito, frente a distintas concentraciones de cloruro de mercurio (II) (0, 0,01; 0,50; 2,50; 5,00; 7,50 y 10,0 ppm) en: (A) pH neutro, (B) pH básico, (C) curva de calibración a pH neutro y (D) curva de calibración a pH básico.





El ajuste de la linealización se realizó utilizando la concentración elevada a la potencia 2/3, lo que sugiere que el proceso electroquímico está dominado por un mecanismo mixto que involucra procesos de difusión y adsorción. La adsorción se atribuye a la interacción de iones Hg^{2+} con los sitios activos creados por la modificación SPE/MWCNT/DGPEFER, mientras que la difusión controla el transporte de las especies de cloruro de mercurio II ($HgCl_2$) desde la solución hacia la superficie del electrodo.

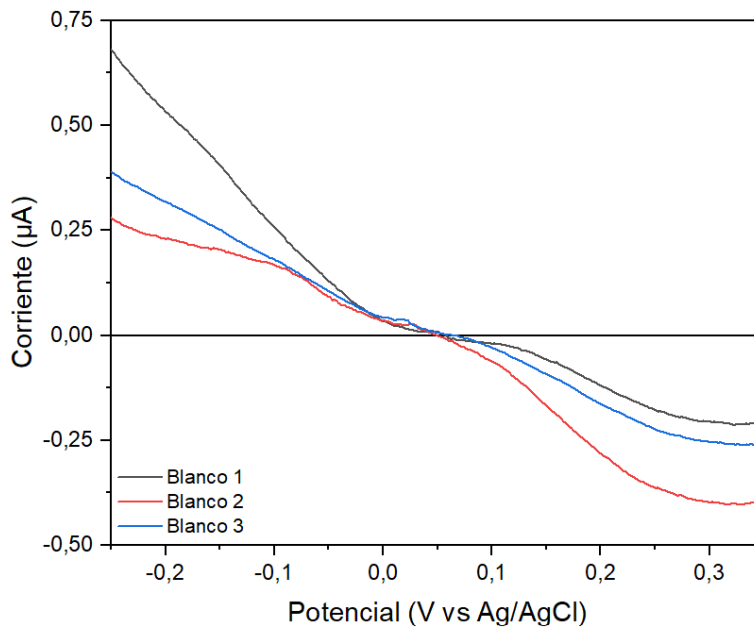
Los resultados de calibración obtenidos en un rango de 0,01 ppm – 10 ppm para medio básico no muestran un ajuste lineal adecuado, reflejado en un coeficiente de correlación relativamente bajo ($R^2 = 0,771$) y una desviación estándar considerablemente alta para concentraciones superiores a 7 ppm. Este comportamiento era previsible, ya que, como se mencionó anteriormente, en condiciones de pH básico la disponibilidad de iones Hg^{2+} se ve limitada por la formación de especies hidroxiladas o precipitados como $Hg(OH)_2$, lo que dificulta su cuantificación electroquímica. En contraste, la curva de calibración obtenida a pH neutro presenta un mejor desempeño ($R^2 = 0,982$), con una respuesta más lineal y reproducible del biosensor frente al aumento en la concentración de $HgCl_2$. Si bien aún hay margen de mejora,

especialmente en la optimización de la configuración MWCNT/DGPEFER, estos resultados representan un punto de partida prometedor para el desarrollo de sensores electroquímicos más sensibles y selectivos en medios acuosos.

Ahora bien, la sensibilidad analítica de un instrumento se define como su capacidad para detectar pequeñas variaciones en la concentración del analito con un grado adecuado de precisión. Esta se expresa mediante la relación entre la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar del blanco (Ospina V., 2008). La Figura 26 muestra la voltametría obtenida para las mediciones realizadas por triplicado del blanco.

Figura 26

Voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/ MWCNT_{7,5} $\mu\text{g}/\text{mL}$ /DGPEFER_{0,1 \mu\text{M}}, utilizando KCl 0,1 M como electrolito soporte (blanco)}



En la Figura 26 se observa la respuesta voltamétrica obtenida para el blanco, analizado por triplicado. Ninguno de los voltamogramas muestra señales características para iones de Hg^{2+} lo que indica una alta selectividad del biosensor frente al analito objetivo. Además, las tres

voltametrías presentan barridos similares, lo que evidencia buena reproducibilidad y estabilidad en la línea base. La corriente residual observada se mantiene dentro de valores bajos ($\leq 0,75 \mu\text{A}$), lo que sugiere un nivel mínimo de ruido electroquímico. Por otra parte, la sensibilidad analítica estimada del biosensor en medio neutro fue de $40,4 \text{ ppm}^{-1}$. Este valor de sensibilidad analítica indica que pequeños cambios en la concentración del analito pueden generar variaciones significativas en la señal electroquímica. Entonces, los resultados obtenidos representan un punto de partida prometedor para el desarrollo de sensores electroquímicos más sensibles y selectivos en medios acuosos.

7.2.3 *Límite de detección y límite de cuantificación*

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) son parámetros fundamentales que definen las limitaciones de un método analítico. De acuerdo con la IUPAC, el LOD, expresado como la concentración, se deriva de la medida más pequeña, que puede detectarse para un procedimiento analítico determinado y el LOQ hace referencia a la detección más pequeña con precisión y exactitud aceptables (Sánchez, J., 2018). Para su estimación a pH neutro, se realizaron mediciones del blanco por triplicado (Figura 26) con el fin de calcular la desviación estándar, la cual se dividió entre la pendiente de la regresión lineal, aplicando las fórmulas correspondientes para obtener los valores de LOD y LOQ.

$$LOD = \frac{3\sigma_{Blanco}}{m} = \frac{3 \times (0,0126)}{0,50892} = 0,074 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma_{Blanco}}{m} = \frac{10 \times (0,0126)}{0,50892} = 0,247 \text{ ppm}$$

Los cálculos realizados indican que el biosensor electroquímico propuesto alcanzó un límite de detección de $0,074 \text{ ppm}$. No obstante, las mediciones electroquímicas se consideran confiables a partir de $0,25 \text{ ppm}$, según el límite de cuantificación. Al comparar estos resultados

con los reportados en la literatura (Tabla 4), se observó que el biosensor desarrollado en este trabajo presentó límites de detección inferiores a los reportados por Tortolini *et al.*, 2015, Santacruz, P., 2018 y Hu *et al.*, 2024. Por otro lado, los dispositivos propuestos por Bala *et al.*, 2017, Cai *et al.*, 2017 y Li *et al.*, 2021 lograron límites de detección más bajos que el obtenido en esta investigación.

7.2.4 Estabilidad y reproducibilidad

La evaluación de la estabilidad del biosensor electroquímico se relacionó con su capacidad de ser reutilizado durante un periodo de tiempo determinado. En este caso, la Tabla 12 presenta un resumen de las mediciones realizadas durante tres días consecutivos utilizando el mismo biosensor, expuesto a una concentración de 5 ppm de cloruro de mercurio (II).

Tabla 12

Estabilidad del biosensor electroquímico a pH neutro a una concentración de HgCl₂ de 5,0 ppm.

Biosensor	Concentración (ppm)	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	Desviación	% RSD
		Corriente (µA)	Corriente (µA)	Corriente (µA)			
1	5,00	1,293919	2,168547	2,478088	1,9802	0,61	31,0
2	5,00	1,206399	1,411590	1,23667	1,2849	0,11	8,62

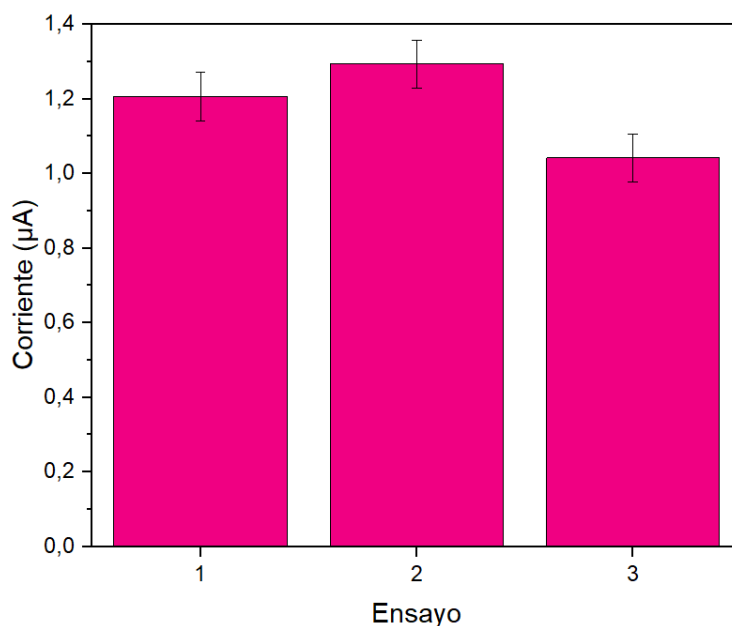
En el caso del biosensor 1, se observó un aumento progresivo en la intensidad de corriente a lo largo de los días. Este fenómeno se puede atribuir a la ausencia de lavados intermedios después de cada medición con cloruro de mercurio (II), lo cual pudo haber provocado la acumulación de residuos de mercurio sobre la superficie del electrodo, generando así una señal creciente en los días posteriores. Por el contrario, en las pruebas realizadas con el biosensor 2 se implementaron lavados utilizando la solución electrolítica mediante voltimetría cíclica (cinco ciclos a 30 mV/s) al finalizar cada lectura, así como antes de iniciar una nueva al día siguiente. Esta estrategia permitió evidenciar la importancia de realizar lavados entre pruebas como parte de las buenas

prácticas en el uso de biosensores, ya que se observó una disminución en la desviación estándar relativa, lo que refleja una menor dispersión en los datos obtenidos.

Además de la estabilidad, se evaluó la reproducibilidad del biosensor electroquímico mediante la preparación de tres electrodos independientes, los cuales fueron sometidos a mediciones por triplicado en una solución de cloruro de mercurio (II) a una concentración de 2,50 ppm. Los resultados obtenidos mostraron una desviación estándar relativa (RSD) del 10%, lo cual evidencia una variabilidad moderada entre dispositivos. Estos datos se presentan en la Figura 27.

Figura 27

Reproducibilidad del biosensor electroquímico en pH neutro (concentración: 2,50 ppm HgCl₂)



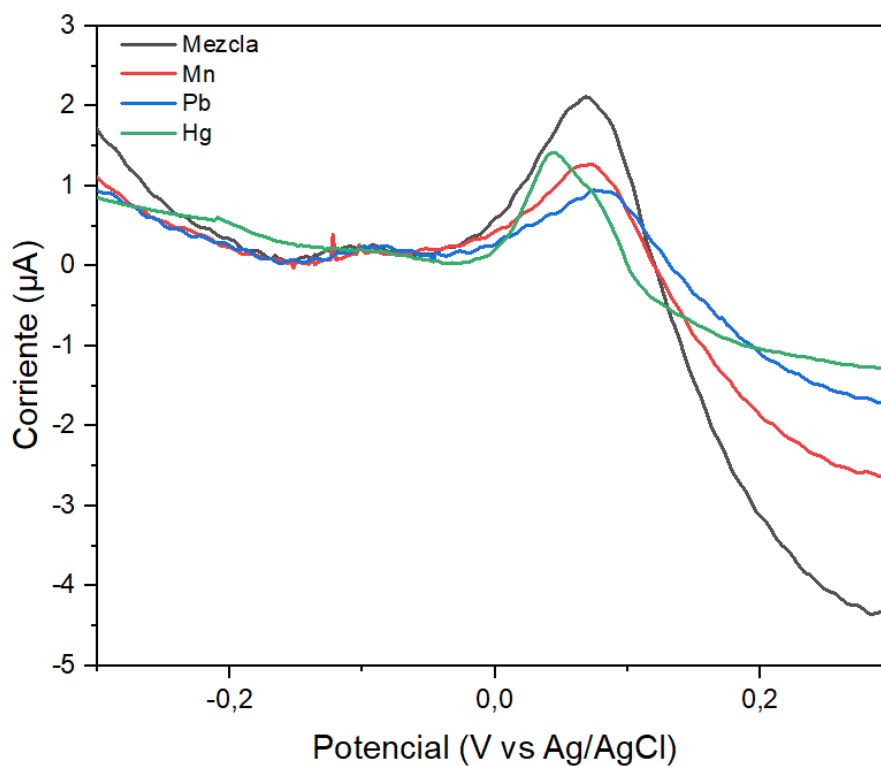
7.2.5 Selectividad

La selectividad es la capacidad del método analítico para medir inequívocamente y diferenciar un analito en presencia de componentes que se espera que estén presentes en el medio (De Bievre, *et al.*, 2004). En este estudio, se evaluó la selectividad del biosensor frente a iones comúnmente presentes en efluentes mineros, como Pb²⁺ y Mn²⁺. Para ello, se prepararon soluciones

de sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) a una concentración de 5,0 ppm. Cada ion fue analizado por separado utilizando biosensores distintos, y posteriormente se evaluó una solución mixta que contenía iones de Pb^{2+} , Mn^{2+} y Hg^{2+} en un tercer biosensor. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 28.

Figura 28

Voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial para la configuración SPE/MWCNT_{7,5} $\mu\text{g}/\text{mL}$ /DGPEFER_{0,1} μM , utilizando KCl 0,1 M como electrolito a pH neutro, frente a concentraciones 5 ppm de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y HgCl_2



En la Figura 28 se observa que el biosensor presenta un pico de oxidación bien definido para la mezcla con una intensidad de corriente cercana a 2,0 μA , sin embargo, el pico de oxidación para el Hg^{2+} es significativamente menor al de la mezcla, lo que indica que en la mezcla se detectaron señales obtenidas para Mn^{2+} y Pb^{2+} . Estos resultados indican que el biosensor

desarrollado no presenta selectividad relativa hacia Hg^{2+} y, que en presencia de otros iones potencialmente interferentes como Mn^{2+} y Pb^{2+} , comunes en matrices asociadas a actividades mineras se presenta interferencia de estos metales.

7.2.6 Conclusiones parciales

Se desarrolló un biosensor electroquímico para la detección de iones de mercurio, el cual presentó un ajuste lineal de 0,982 en condiciones de pH neutro. Sin embargo, al modificar el medio a pH básico, el biosensor perdió reproducibilidad, lo cual se atribuye a la formación de especies complejas como $\text{Hg}(\text{OH})_2$, que reducen la disponibilidad de Hg^{2+} libre en solución, limitando así su reducción a Hg^0 y, por ende, la respuesta del sensor.

Se estableció un límite de detección de 0,074 ppm y un rango de trabajo comprendido entre 0,25 ppm y 7,5 ppm. Al comparar este valor con los reportados en la literatura, se evidenció que el biosensor desarrollado alcanza límites de detección inferiores a los reportados por algunos autores, lo que indica un desempeño competitivo en términos de sensibilidad.

Se evidenció que el biosensor presenta una estabilidad moderada en el tiempo, siempre que se implementen protocolos de lavado entre mediciones. Asimismo, las pruebas de reproducibilidad indicaron un comportamiento consistente entre diferentes electrodos fabricados bajo las mismas condiciones.

El biosensor electroquímico, diseñado a partir de la secuencia peptídica DGPEFER e inmovilizado con nanotubos de carbono (MWCNT), no demostró una selectividad considerable hacia iones Hg^{2+} cuando hay presencia de iones como Mn^{2+} y Pb^{2+} , presentes comúnmente en matrices acuosas asociadas a actividades mineras.

Conclusiones

La aplicación de métodos de modelado molecular y acoplamiento estructural permitió seleccionar la secuencia DGPEFER como el péptido con mayor afinidad por Hg^{2+} , validando el enfoque computacional como una herramienta eficaz para el diseño inicial del biosensor. Posteriormente, se establecieron las condiciones óptimas para la modificación del electrodo, determinando que una concentración de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ de MWCNT y 0,1 μM de péptido proporcionaban la mejor respuesta electroquímica sin generar pasivación de la superficie. La caracterización físico-química y morfológica confirmó una inmovilización efectiva del sistema.

El biosensor ensamblado demostró un comportamiento lineal en un rango de trabajo entre 0,25–7,50 ppm, con un límite de detección de 0,074 ppm y un coeficiente de correlación de 0,982 en condiciones de pH neutro, resultados que lo posicionan como una alternativa competitiva frente a otros sensores reportados en la literatura. Sin embargo, se evidenció una pérdida de reproducibilidad bajo condiciones de pH básico, atribuida a la formación de especies como $\text{Hg}(\text{OH})_2$, que disminuyen la disponibilidad de mercurio libre en solución.

Adicionalmente, se comprobó que la estabilidad del biosensor puede mantenerse a lo largo del tiempo si se implementan protocolos de lavado adecuados, y que su respuesta es reproducible entre distintos electrodos fabricados bajo las mismas condiciones. Finalmente, el biosensor no exhibió una selectividad notable hacia iones de Hg^{2+} en presencia de otros metales como Pb^{2+} y Mn^{2+} , característicos de matrices contaminadas por actividad minera.

En conjunto, estos resultados constituyen un avance significativo para el grupo de investigación en el diseño de plataformas electroquímicas basadas en péptidos, estableciendo una base sólida para futuras optimizaciones orientadas hacia la construcción de prototipos funcionales para la detección de mercurio en campo.

Recomendaciones

Incorporar simulaciones cinéticas o estudios complementarios de especiación química que permitan confirmar la identidad de los complejos de Hg^{2+} formados, los cuales no pudieron ser determinados únicamente a partir del diagrama de Pourbaix.

Evaluar el efecto de los agentes dispersantes en la dispersión de los nanotubos de carbono (MWCNTs), analizando si influyen en la inmovilización del péptido y en la respuesta electroquímica del biosensor. Asimismo, se recomienda explorar otros métodos de deposición sobre el electrodo de trabajo que permitan una mayor homogenización de la superficie activa.

Optimizar el coeficiente de correlación de la curva de calibración utilizando dispersiones de nanotubos de carbono recién preparadas o con menos de una semana de almacenamiento. Aunque se observó una estabilidad aceptable por seis semanas, es posible que ocurran aglomeraciones no visibles a simple vista, que afecten la uniformidad del recubrimiento y la respuesta del sensor.

Ampliar el estudio de selectividad mediante la inclusión de otros iones metálicos relevantes presentes en efluentes mineros, así como del ion cianuro (CN^-), el cual es común en procesos de extracción de oro. Además, se sugiere realizar pruebas de estabilidad y reproducibilidad en un rango más amplio de concentraciones para evaluar el comportamiento del biosensor bajo condiciones más diversas.

Validar el desempeño del biosensor en muestras reales o simuladas más complejas, que incluyan interferentes orgánicos y otras matrices presentes en aguas residuales de minería, a fin de evaluar la robustez del sistema fuera de condiciones controladas de laboratorio.

Referencias Bibliográficas

- Acueducto Metropolitano de Bucaramanga (AMB). (2021). Plantas de tratamiento. <https://www.amb.com.co/amb/conoce-amb/nuestros-procesos/procesos-operativos/plantas-de-tratamiento/>.
- Alanoca, L. (2016). The biogeochemical cycle of Hg in the high altitude and tropical hydrosystem of Lake Uru-Uru, Bolivian Altiplano. *Earth Sciences. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*.
- Andrade Guel, M. L., López López, L. I., & Sáenz Galindo, A. (2012). Nanotubos de carbono: funcionalización y aplicaciones biológicas. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(3), 9–18. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300002
- Bala, A., & Górski, Ł. (2018). Peptide nucleic acid as a selective recognition element for electrochemical determination of Hg²⁺. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 119, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.09.008>
- Bindu, A., Bhadra, S., Nayak, S., Khan, R., Prabhu, A. A., & Sevda, S. (2024). Bioelectrochemical biosensors for water quality assessment and wastewater monitoring. *Open Life Sciences*, 19(1), 20220933. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0933>
- Binette, V., Mousseau, N., & Tuffery, P. (2022). A generalized attraction-repulsion potential and revisited fragment library improves PEP-FOLD peptide structure prediction. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 18(4), 2720–2736. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c01293>

- Borrill, A. J., Reily, N. E., & Macpherson, J. V. (2019). Addressing the practicalities of anodic stripping voltammetry for heavy metal detection: a tutorial review. *The Analyst*, 144(23), 6834–6849. <https://doi.org/10.1039/c9an01437c>
- Cai, Xie, S., Zhang, J., Tang, D., & Tang, Y. (2017). An electrochemical impedance biosensor for Hg^{sup.2+} detection based on DNA hydrogel by coupling with DNAzyme-assisted target recycling and hybridization chain reaction. *Biosensors & Bioelectronics*, 98, 466–. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.025>.
- Calvo, A. (2014). Desarrollo y aplicación de sensores y biosensores electroquímicos para la determinación de contaminantes medioambientales y agroalimentarios. Universidad de burgos. <https://riubu.ubu.es/handle/10259/3692>.
- Cardoso Gomes-Junior, P., Dias Nascimento, E., Kenlder de Lima Augusto, K., Patelli Longatto, G., Censi Faria, R., Piccin, E., & Fatibello-Filho, O. (2024). Voltammetric determination of uric acid using a miniaturized platform based on screen-printed electrodes modified with platinum nanoparticles. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 207(111931), 111931. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111931>
- Castillo, M. (2009). El mercurio como metal pesado proveniente de la minería en Colombia, un pasivo ambiental y un problema de salud pública subregistrado. <https://repositorio.uniandes.edu.co/entities/publication/2495f22d-2fd3-4611-90a0-3d04e30cfec1>
- Corporación compromiso. (2020). El agua y el territorio de Santander están en peligro. <https://corporacioncompromiso.org/apc-aa->

files/6a67676b753637373837753635793679/los-conflictos-y-las-luchas-ambientales-en-santander-2020-ok-2.pdf

Cortes, C. (2017). Determinación de mercurio orgánico e inorgánico en muestras ambientales. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/61022>.

Che, X., Liu, Q., & Zhang, L. (2023). An accurate and universal protein-small molecule batch docking solution using Autodock Vina. *Results in Engineering*, 19(101335), 101335. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2023.101335>

Creighton, T. E. (1985). The problem of how and why proteins adopt folded conformations. *The Journal of Physical Chemistry*, 89(12), 2452–2459. <https://doi.org/10.1021/j100258a006>.

De Bievre, P., & Gunzler, H. (Eds.). (2004). *Validation in Chemical Measurement* (2005a ed.). Springer.

Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M. A., & Arcos-Martínez, M. J. (2013). Determination of metals based on electrochemical biosensors. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(10), 1042–1073. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.627034>.

Drusin, S. (2018). Estudio bioinformático estructural del reconocimiento de ARN en el procesamiento de miARNs en plantas. Universidad Nacional del Rosario. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/84381>.

Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>

- El-Hachem, N., Haibe-Kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H., & Nemer, G. (2017). AutoDock and AutoDockTools for protein-ligand docking: Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1(BACE1) as a case study. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1598, 391–403. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4_20
- Environmental Protection Agency (EPA) (2000). *Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Third Edition* <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/volume2.pdf>.
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 38. <https://doi.org/10.3791/1918>
- European Commission (2019). Evaluation of Methyl-mercury production and decomposition by using Hg-197 radiotracer produced out of mercury enriched in Hg-196 isotope. *CORDIS Publication Office/CORDIS*. <https://cordis.europa.eu/project/id/221724>
- Gao, C., & Huang, X.-J. (2013). Voltammetric determination of mercury(II). *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 51, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.010>
- Ghafuri, H., Tajik, Z., Ghanbari, N., & Hanifehnejad, P. (2021). Preparation and characterization of graphitic carbon nitride-supported L-arginine as a highly efficient and recyclable catalyst for the one-pot synthesis of condensation reactions. *Scientific Reports*, 11(1), 19792. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97360-x>
- Ghanaati, S., Webber, M. J., Unger, R. E., Orth, C., Hulvat, J. F., Kiehna, S. E., Barbeck, M., Rasic, A., Stupp, S. I., & Kirkpatrick, C. J. (2009). Dynamic in vivo biocompatibility of angiogenic peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*, 30(31), 6202–6212. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.063>

- Guarin-Guio, P. A., Cano-Calle, H. de J., & Castillo-León, J. J. (2019). Detección electroquímica de peróxido de hidrógeno usando peroxidasa de pasto Guinea (*Panicum maximum*) inmovilizada sobre electrodos serigrafiados de puntos cuánticos. *Revista Ion Investigación Optimización y Nuevos procesos en Ingeniería*, 32(2), 67–76. <https://doi.org/10.18273/revion.v32n2-2019007>
- Hosseini, M. S., Padhye, R., Wang, X., & Houshyar, S. (2025). Advances in nanoparticle-enhanced paper sensor for detecting toxic metals in water. *Talanta*, 293(128146), 128146. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128146>
- Hu, L., Cui, J., Lu, T., Wang, Y., & Jia, J. (2024). Triple signal amplification electrochemical sensing platform for Hg^{2+} in water without direct modification of the working electrode. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 18(7). <https://doi.org/10.1007/s11783-024-1850-1>
- Jimenez, C., y León, D. (2009). Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Revista de la facultad de química farmacéutica. Universidad de Antioquia*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100017.
- Leija, L. (2009). *Métodos de procesamiento avanzado e inteligencia artificial en sistemas sensores y biosensores*. Editorial Reverte. <https://www-digitaliapublishing-com.bibliotecavirtual.uis.edu.co/a/103269>.
- Li, M., Chen, M., Sun, Y., Shi, L., Guo, X., Chen, S., Chen, L., Xiong, G., Sun, W., Gao, R., Ke, L., Wang, L., & Wu, W. (2025). Novel computational approaches in the discovery and identification of bioactive peptides: A bioinformatics perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 73(22), 13212–13228. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c03037>

- Li, Zhang, M.-M., Zhou, X.-D., & Hu, J.-M. (2021). A functional peptide-mediated colorimetric assay for mercury ion based on dual-modified gold nanoparticles. *Analytical Biochemistry*, 631, 114369–114369. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114369>.
- Lopez, M. J., & Mohiuddin, S. S. (2025). Biochemistry, essential amino acids. En StatPearls. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
- Manikandan, R., Yoon, J.-H., & Chang, S.-C. (2023). Emerging Trends in nanostructured materials-coated screen printed electrodes for the electrochemical detection of hazardous heavy metals in environmental matrices. *Chemosphere*, 344(140231), 140231. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140231>
- McKee T, & McKee J.R.(Eds.), (2020). Bioquímica. Las bases moleculares de la vida, 7e. McGraw Hill. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida, 7e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical (mhmedical.com).
- Meneau, R., Borrego, K., Liva, M., y Fariñas, T. (2021). Inmovilización una mirada a los métodos, soportes y retos. *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, vol. 52, núm. 1, pp. 059-078. <https://www.redalyc.org/journal/1812/181268228007/html/>.
- Merino, M. Á. Á., Carrasco, F., & Hódar, F. J. M. (2014). Desarrollo y aplicaciones de materiales avanzados de carbón.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2018). “Evaluación del grado de contaminación por mercurio y otras sustancias tóxicas, y su afectación en la salud humana en las poblaciones de la cuenca del río Atrato, como consecuencia de las actividades de minería”. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/lists/bibliotecadigital/ride/vs/pp/sa/protocolo-sentencia-t622-vcolciencias.pdf>

- Moran, K. L. M., Fitzgerald, J., McPartlin, D. A., Loftus, J. H., & O’Kennedy, R. (2016). Biosensor-based technologies for the detection of pathogens and toxins. En V. Scognamiglio, G. Rea, F. Arduini, & G. Palleschi (Eds.), *Biosensors for Sustainable Food - New Opportunities and Technical Challenges* (Vol. 74, pp. 93–120). Elsevier.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nasirpour, F. (2017). Una visión general de la electroquímica. En: *electrodeposición de materiales nanoestructurados*. Serie Springer en Ciencias de la Superficie, vol 62. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44920-3_2
- Olivares-Quiroz, L., & García-Colín Scherer, L. (2004). Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1), 95–105. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932004000100014
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Exposición al mercurio: un asunto importante para la salud pública: prevención de enfermedades a través de ambientes saludables*, 2a ed. (8 de abril de 2021). Who.int; World Health Organization. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789240023567>
- Ospina Valencia, M. (2008). *Montaje de curvas de calibración para análisis de gomas, fosfatos, sílice, azúcar y sulfitos por espectrofotometría UV - Visible en el laboratorio de Aseguramiento de Calidad del Ingenio Pichichi S.A.* Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11059/1106>

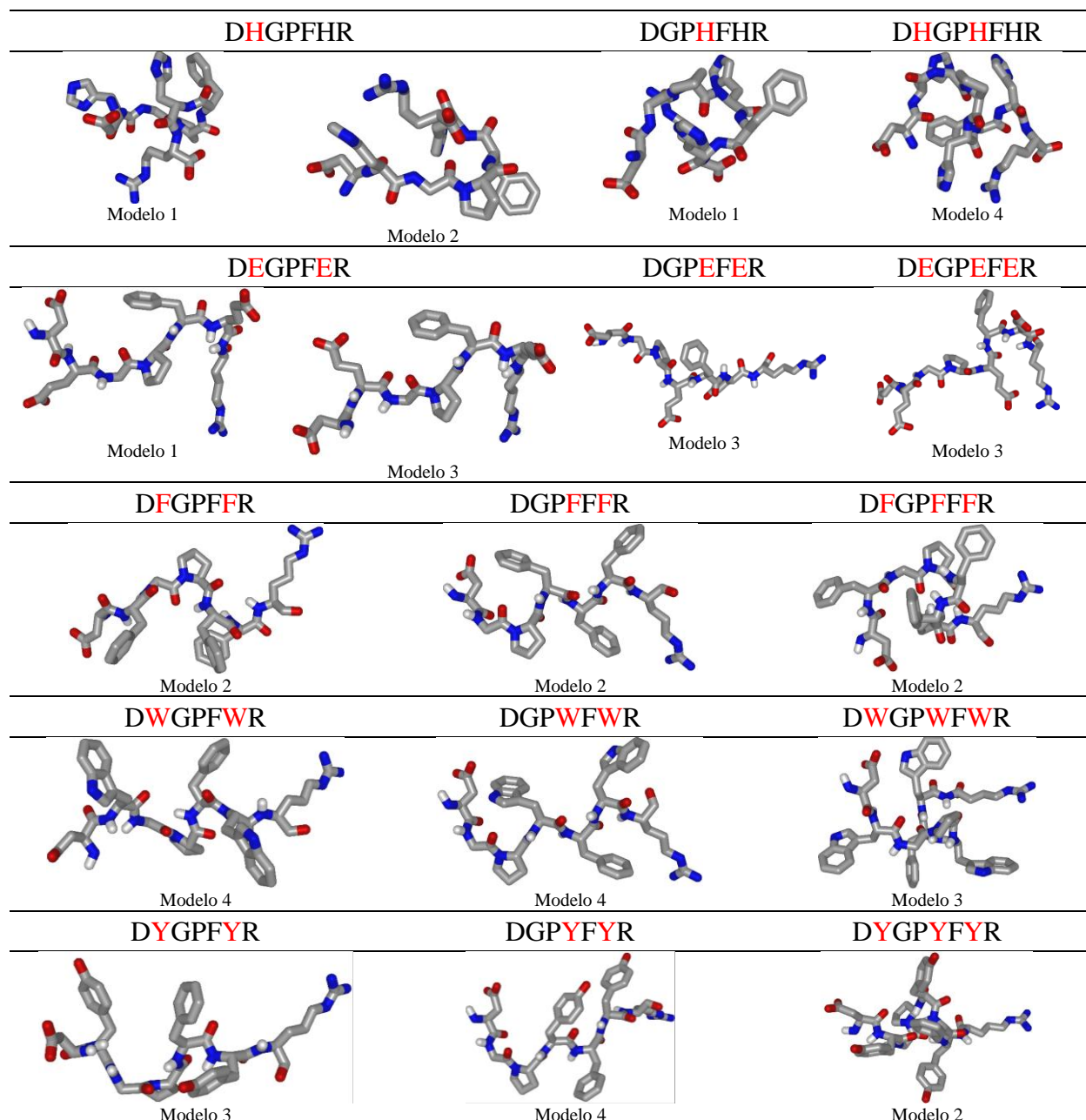
- Panduro, G., Rengifo, G. C., Barreto, J. L., Arbaiza-Peña, K., Iannacone, J., Alvariño, L., & Crnobrna, B. (2020). Bioacumulación por mercurio en peces y riesgo por ingesta en una comunidad nativa en la amazonia peruana. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 31(3), e18177. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18177>
- Prada, Y., (2021). Desarrollo de un biosensor óptico a partir de sistemas metálicos nanoestructurados para la detección in vitro de leishmaniasis. <https://noesis.uis.edu.co/items/8ef9abc3-f9e4-4943-b416-6641e191189d>.
- Qu, C., Cheng, F., Su, H., & Zhao, Y. (2016). Dispergation and modification of multi-walled carbon nanotubes in aqueous solution. *Russian Journal Of Physical Chemistry A*, 90(11), 2230-2236. <https://doi.org/10.1134/s0036024416110066>
- Redondo Ortega, J. (2021). Evaluación de Péptidos Análogos a la Proteína Tir Como Moléculas de Reconocimiento en Biosensores Electroquímicos para la Detección de Escherichia Coli O157:H7 en Matrices Acuosas. Universidad de Santander. <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/5551>
- Rey, J., Murail, S., de Vries, S., Derreumaux, P., & Tuffery, P. (2023). PEP-FOLD4: a pH-dependent force field for peptide structure prediction in aqueous solution. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W432–W437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad376>
- Revista Semana. (2022). Por presencia de mercurio en río Suratá, Santander, Procuraduría pide a las autoridades presentar ‘plan de choque. <https://www.semana.com/nacion/bucaramanga/articulo/por-presencia-de-mercurio-en-río-surata-santander-procuraduria-pide-a-las-autoridades-presentar-plan-de-choque/202224/>).

- Rodríguez, R. (2020). Biosensores basados en cisteína y análogos. Aplicaciones en la detección de metales pesados en fluidos biológicos. Universidad de Cádiz. <https://rodin.uca.es/handle/10498/23557>.
- Ropero-Vega, J. L., Ardila-Rosas, N., Hernández, I. P., & Flórez-Castillo, J. M. (2020). Immobilization of Ib-M2 peptide on core@shell nanostructures based on SPION nanoparticles and their antibacterial activity against Escherichia coli O157:H7. *Applied Surface Science*, 515(146045), 146045. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146045>.
- Rosignoli, S., & Paiardini, A. (2022). Boosting the full potential of PyMOL with structural biology plugins. *Biomolecules*, 12(12), 1764. <https://doi.org/10.3390/biom12121764>
- Sanchez, J. M. (2018). Estimating detection limits in chromatography from calibration data: Ordinary least squares regression vs. Weighted least squares. *Separations*, 5(4), 49. <https://doi.org/10.3390/separations5040049>
- Sánchez, J., & Cameselle, C. (2017). Biosorción de mercurio (Hg^{2+}) usando materiales solidos residuales como adsorbentes. *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 74(577). <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320727>
- Santacruz, P. (2018). Construcción del biosensor para detectar mercurio en agua por aplicación tecnológica de la PUCE-SI. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra. <http://dspace.pucesi.edu.ec/handle/11010/174?mode=full>.
- Sopaj, F., Loshaj, F., Contini, A., Mehmeti, E., & Veseli, A. (2023). Preparation of an efficient and selective voltammetric sensor based on screen printed carbon ink electrode modified with TiO₂ nanoparticles for Azithromycin quantification. *Results in Chemistry*, 6(101123), 101123. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101123>

- Stortini, A. M., Baldo, M. A., Moro, G., Polo, F., & Moretto, L. M. (2020). Bio- and Biomimetic Receptors for Electrochemical Sensing of Heavy Metal Ions. *Sensors*, 20(23), 6800. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/s20236800>.
- Tortolini, C., Bollella, P., Antonelli, M., Antiochia, R., Mazzei, F., & Favero, G. (2015) DNA-based biosensors for Hg²⁺ determination by polythymine–methylene blue modified electrodes, Volume 67, Pages 524-531. ISSN 0956-5663, Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.031>.
- Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry: Wang/Analytical Electrochemistry, Third Edition (3a ed.)*. John Wiley & Sons.
- Yuan, L., & Liu, L. (2021). Peptide-based electrochemical biosensing. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 344(130232), 130232. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130232>
- Yuan, S., Chan, H. C. S., & Hu, Z. (2017). Using PyMOL as a platform for computational drug design: PyMOL: platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Computational Molecular Science*, 7(2), e1298. <https://doi.org/10.1002/wcms.1298>
- Zhao, Y., Wang, H., Jia, G., & Li, Z. (2018). Application of Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Pathogenic *Escherichia coli*. 1–16. <https://doi.org/10.3390/s18082518>.

Apéndices

Apéndice A. Estructuras moleculares seleccionadas para el acoplamiento con iones de Hg^{2+}



Apéndice B. Voltametrías cíclicas registradas a una velocidad de barrido de 30 mV/s, utilizando como electrolito una solución de KCl 0,1 M a pH básico de 11,89, MWCNT (7,5 µg/mL), DGPfHR y DGPEFER (0,1 µM) para la configuración PÉPTIDO/MWCNT/SPE en las siguientes concentraciones de HgCl₂, (A) 1 ppm (B) 10 ppm (C) 100 ppm

