

**ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE GRAFENO MODIFICADOS CON
PEROXIDASA DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*) PARA LA
DETECCIÓN ENZIMÁTICA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

XUXAN SOLANO CONTRERAS

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

2016

**ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE GRAFENO MODIFICADOS CON
PEROXIDASA DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*) PARA LA
DETECCIÓN ENZIMÁTICA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

XUXAN SOLANO CONTRERAS

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

Director

JOHN JAIRO CASTILLO LEÓN

Doctor en Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

*A mi pasado, presente y futuro
Por construir mi mejor versión.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien me dio fuerzas para continuar después de la tormenta, a él por llenar mi alma de bondad y mi vida de bendiciones.

A mis queridos padres Ilda Contreras y Pablo Contreras por su amor profundo y apoyo incondicional. Ellos siempre han sido mi mayor motivación y orgullo, de quienes aprendí que sin sacrificio no hay recompensa.

A mi hermano quien me enseñó que nunca es suficiente y a quien amo con toda el alma.

A Marcelo Meza, mi mejor amigo y gran amor; por su comprensión y humildad para enseñarme lo que en los libros de ciencia no se escribe, por ser mi mejor sonrisa y llenar mis días de felicidad.

A John Castillo, director de este proyecto de grado; a quien le extiendo mi más profundo agradecimiento por su dedicación y orientación.

A Todos mis amigos de GIBIM por su cariño y conocimiento compartido, en especial a Chucho, Erika, Diana, Marlon y Jennifer con quienes compartí la mayor parte de mi tiempo en el laboratorio.

A mis profesores, quienes influyeron con sus lecciones y experiencias en mi preparación para los retos de la vida, en especial a Ángela Carreño, Fernando Martínez, Mauricio Urquiza y Rodrigo Torres.

Al laboratorio de espectroscopia atómica y molecular por la toma de espectros Raman y por la gentil donación de los electrodos de grafeno.

Y finalmente al profesor Ángel Meléndez por su grano de arena para la conformación de la asociación colombiana de electroquímica, cuyos integrantes compartimos la alegría de trabajar en equipo para el constante desarrollo e innovación.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO DE REFERENCIA.....	21
1.1 ESTUDIOS SOBRE PEROXIDASAS	21
1.2 ESTUDIOS SOBRE BIOSENSORES	24
2. MARCO TEORICO	27
2.1 BIOSENSORES.....	27
2.1.1 Biosensores catalíticos.	29
2.1.2 Biosensores amperométricos.....	30
2.2 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS.....	30
2.3 GRAFENO	31
2.4 ENZIMAS	32
2.4.1 Oxidorreductasas.....	34
2.4.2 Peroxidasas	34
2.5 PASTO GUINEA	35
2.6 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE DIFERENTES ELECTRODOS	36
2.7 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS PARA CARACTERIZACIÓN DE ELECTRODOS.	38
2.7.1 Voltamperometría cíclica.....	38
2.7.2 Cronoamperometría.	42
2.7.3 Espectroscopia de Impedancia.	43
3. METODOLOGÍA	44
3.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS	44
3.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE PPG.....	44
3.2.1 Extracción.	44
3.2.2 Eliminación de pigmentos.	45

3.2.3 Cromatografía por permeación en gel.	46
3.2.4 Concentración del extracto enzimático.	46
3.2.5 Determinación de proteínas mediante el método de Bradford.	47
3.2.6 Determinación de Actividad Enzimática.	47
3.3 MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS	48
3.4 CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	49
3.4.1 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferricianuro de potasio como electrolito.	50
3.4.2 Reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno.	50
3.4.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del H ₂ O ₂	51
3.4.4 Influencia del pH.	51
3.5 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	52
3.5.1 Cronoamperometría.	52
3.5.2 Determinación del rango lineal.....	52
3.5.3 Sensibilidad.....	53
3.5.4 Límite de detección.....	53
3.6 IMPEDANCIA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS Y SIN MODIFICAR .	53
3.7 SELECTIVIDAD DEL ELECTRODO MODIFICADO EN PRESENCIA DE SUSTANCIAS INTERFERENTES	54
4. ANÁLISIS Y RESULTADOS	55
4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PEROXIDASA DE PASTO GUINEA.	55
4.2 MODIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.....	56
4.3 REDUCCIÓN BIOELECTROCATALITICA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	59
4.4 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO SOBRE LA RESPUESTA BIOELECTROCATALÍTICA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	62

4.5 INFLUENCIA DE pH	63
4.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	64
4.7 IMPEDANCIA DE ELECTRODOS MODIFICADOS.....	67
4.8 SELECTIVIDAD DEL ELECTRODO MODIFICADO EN PRESENCIA DE SUSTANCIAS INTERFERENTES	68
5. CONCLUSIONES	72
6. RECOMENDACIONES.....	74
REFERENCIAS	75
BIBLIOGRAFIA.....	81
ANEXOS.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de un biosensor.	27
Figura 2. Clasificación de biosensores según naturaleza del bio-receptor y transductor.	29
Figura 3. Esquema biosensor catalítico	29
Figura 4. Electrodo serigrafado ²³	31
Figura 5. Conformación bidimensional del grafeno.	32
Figura 6. Reducción de la energía de activación en reacciones catalizadas por enzimas.	33
Figura 7. Reacción catalizada por peroxidasa.	35
Figura 8. Fotografía de pasto guinea.	36
Figura 9. Barrido potencial para voltamperometría a 0,08 Vs ⁻¹ ³⁶	39
Figura 10. Voltamperometría cíclica de una disolución 0.5 mM Ferroceno en acetonitrilo. Área del electrodo = 2.54 mm ² . Velocidad de barrido= 100 mVs ⁻¹ ³⁶	39
Figura 11. Oxidación Ferroceno.	40
Figura 12. Reducción del Ferricinio.	40
Figura 13. Curva i-t resultante de la aplicación de la onda potencial ³⁶	42
Figura 14. Respuesta medición impedancia superficies electródicas. ³⁷	43
Figura 15. Pasto guinea (<i>Panicum maximum</i>) triturado en molino eléctrico.	45
Figura 16. Metodología para la determinación de la actividad enzimática.	47
Figura 17. Electrodo DRP- 110GPH DropSens.	48
Figura 18. Montaje experimental, equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT.	49
Figura 19. Celda de acrílica empleada en los ensayos experimentales.	50
Figura 20. Metodología de extracción y purificación parcial de la peroxidasa de pasto guinea (PPG).	55

Figura 21.	Comportamiento electroquímico de una solución $K_3Fe(CN)_6$ 10 mM en KCl 0.1 M en agua, electrodo sin modificar (negro) electrodo modificado con PPG (rojo). (velocidad de barrido 100 mV s^{-1}).	57
Figura 22.	VCs electrodo sin modificar (negro) y electrodo modificado con PPG (rojo). Solución 10 mM PBS pH 8.0 KCl 0.1 M (velocidad de barrido 100 mV s^{-1}).	59
Figura 23.	VC electrodo modificado con PPG en 10 mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M en ausencia (rojo) y presencia (negro) de 3 mM H_2O_2 (velocidad de barrido 100 mV s^{-1}).	60
Figura 24.	Posible mecanismo para la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 por la PPG para el electrodo modificado con PPG.	61
Figura 25.	VC de electrodo modificado con PPG en 10 mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M y 4 mM H_2O_2 (velocidad de barrido 100 mV s^{-1}) Número de ciclos 10.....	61
Figura 26.	A) VC de electrodo modificado con PPG en solución 10mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M, 1 mM H_2O_2 a diferentes velocidades de barrido lineal, desde 50 hasta 600 mV s^{-1} . B) Relación lineal entre corrientes anódicas (rojo) y catódicas (negro) contra raíz cuadrada de velocidad de barrido lineal.	62
Figura 27.	Dependencia de la corriente relativa (%) contra el pH.....	64
Figura 28.	Respuesta corriente (mA) contra tiempo (s) para la adición de H_2O_2 a un potencial de -1.0 V, electrodo sin modificar (negro) y electrodo modificado con PPG (rojo).	65
Figura 29.	Curva de calibración obtenida con los datos de los ensayos de cronoamperometría.....	66
Figura 30.	Espectroscopia de impedancia electrodos sin modificar (negro) y modificados con PPG (rojo).	68
Figura 31.	Perfil amperométrico (corriente contra tiempo) del electrodo modificado con PPG en solución 10 mM PBS (pH 8.0) 0.1 M KCl, respuesta en presencia de H_2O_2 , glucosa, ácido cítrico y etanol.	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Actividad de la peroxidasa extraídas de plantas tropicales ¹¹	22
Tabla 2. Clasificación de las enzimas.	33
Tabla 3. Métodos de inmovilización.	37
Tabla 4. Etapas de purificación de la peroxidasa de pasto guinea.	56
Tabla 5. Diferencia de potencial y relación de corriente entre los picos de oxidación y reducción para los electrodos estudiados.	58
Tabla 6. Diferentes tipos de biosensores de peróxido de hidrógeno.	70

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS DRP-110GPH.	87
ANEXO B. EFECTO DEL OXÍGENO PRESENTE EN EL SISTEMA.	90
ANEXO C. EFECTO KCL	92

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
Ag	Plata
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
BSA	Albumina de suero bovino
ΔE	Diferencia de potencial
ET	Transferencia electrónica
POD	Peroxidasa
HRP	Peroxidasa de rábano picante
SBP	Peroxidasa de soya
PPG	Peroxidasa de pasto guinea (<i>Panicum maximum</i>)
I	Corriente
VC	Voltamperometría cíclica
mA	Miliamperios
μl	Microlitros
mV	Milivoltios
p/v	Peso/Volumen
que	Electrodo de oro
CNT	Nanotubos de carbono
GCE	Electrodo de carbón vítreo
LD	Limite de detección
SCE	Electrodo saturado calomel
CPE	Electrodo de pasta de carbono

RESUMEN

TITULO: ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE GRAFENO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PASTO GUINEA (*Panicum maximum*) PARA LA DETECCIÓN ENZIMATICA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.*

AUTOR: XUXAN SOLANO CONTRERAS**

PALABRAS CLAVES: pasto guinea, peroxidasa, biosensor, grafeno.

DESCRIPCION

La construcción de nuevos dispositivos de detección es una de las tendencias más marcadas en cuanto a química analítica moderna se refiere. El objetivo de este trabajo de grado fue la modificación de electrodos serigrafados de grafeno con peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) para la detección enzimática de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Para tal fin, el trabajo se desarrolló en tres etapas, la primera etapa consistió en la extracción y purificación parcial de la enzima, la enzima se obtuvo con una actividad específica de 724,7 U/mg. La segunda etapa consistió en la inmovilización por adsorción física del extracto enzimático sobre electrodos serigrafados de grafeno y finalmente la etapa de caracterización mediante técnicas electroquímicas tales como voltamperometría, cronoamperometría y espectroscopia de impedancia electroquímica.

La reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno se observó a un potencial de -1,0 V vs Ag/AgCl/KCl_(sat). Este fue un proceso controlado en la superficie del electrodo en un rango de velocidad de barrido lineal de 50- 600 mVs⁻¹. Posteriormente se estudió la dependencia de la respuesta del electrodo modificado SPE/PPG frente a diferentes valores de pH, obteniéndose un pH óptimo de 8.0.

El rango lineal exhibido fue 100- 3500 μ M con un límite de detección de 100 μ M, Estos parámetros analíticos se dedujeron de los resultados obtenidos en cronoamperometría.

Parte de estos resultados fueron presentados en el II Congreso Colombiano de Electroquímica y 2° Simposio en Nanociencia y Nanotecnología en modalidad poster.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias; Escuela de química; Director: Castillo León John Jairo, Doctor en Química

ABSTRACT

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

AUTHOR: XUXAN SOLANO CONTRERAS**

KEYWORDS: Peroxidase, Biosensor, Graphene oxide.

DESCRIPTION

The main objective of this work was the modification of Graphene screen-printed electrodes with peroxidase of guinea grass (*Panicum maximum*) for the enzymatic detection of hydrogen peroxide. This work was development in three stages; first the enzyme was extracted and partially purified. The enzyme was obtained with a purification degree of 1,19, a specific activity of 724.7 U/mg with a yield of 24.3%. The second stage involved the immobilization of the enzyme over graphite screen-printed electrodes. And finally, the modified electrode was characterized through electrochemical techniques such as cyclic voltammetry, chronoamperometry and spectroscopy impedance.

The bioelectrocatalytic reduction of hydrogen peroxidase was estimated to a redox potential of 1-10 V Ag/AgCl/KCl(sat). This process was diffusionally controlled over the surface of the electrode.

Subsequently the biosensor response was studied under the influence of pH, obtaining a wide range of work since pH 5 until pH 10 and optimum work pH of 8.0. The displayed linear range was 100- 3500 μ M with a detection limit of 100 μ M, these analytical settings were obtained from the results of chronoamperometry studies and calibration curves and This results were presented at the II Colombian Congress of Electrochemistry and 2nd Symposium on Nanoscience and Nanotechnology in poster mode.

* Grade Project

** Faculty of Science; School of Chemistry; Manager: Castillo León John Jairo, Doctor in Chemistry

INTRODUCCIÓN

La construcción de nuevos dispositivos de detección es una de las tendencias más marcadas en cuanto a química analítica moderna se refiere. En esto, las técnicas electroquímicas han demostrado una gran versatilidad y ventaja frente a otras técnicas, porque permiten mediante el uso de electrodos químicamente modificados (EQM) aplicaciones analíticas en tiempo real, sensibles y selectivas con instrumentación de bajo costo. La mayor parte de estos métodos, como es bien conocido, se basan en la medida de la corriente que fluye a través de una superficie conductora (electrodo), después de una perturbación del potencial; así, una superficie electródica en sí misma actúa como un “reactivo” para dar (reducir) y/o retirar (oxidar) electrones de especies en solución o sobre la superficie del electrodo.

La sensibilidad y selectividad de los EQM, puede obtenerse mediante la modificación de la superficie conductora con materiales de interés, formando así propiedades electrocatalíticas deseadas. De esta manera, el material usado para modificar el electrodo juega un papel fundamental en los procesos de transferencia de electrón, capaz de mediar reacciones que son lentas, o incluso imposibles, sobre superficies sin modificar.

Cuando la superficie modificada hace uso de un sistema de detección biológico o es capaz de analizar sustancias y recopilar información sobre los sistemas vivos, el EQM se llama biosensor. Los biosensores emplean elementos de reconocimiento biológico para la detección de especies específicas. Por tanto, pueden incluir, por ejemplo, enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos o microorganismos como elemento de sensado. De esta forma un biosensor se define como un dispositivo que consiste de un elemento de reconocimiento biológico (enzima, anticuerpo, ADN o microorganismo), que está en contacto con

un transductor como un electrodo y juntos responden de manera dependiente de la concentración a un determinado analito.

Una definición más general y ampliamente aceptada desde 2001, es la de Thévenot; donde un biosensor es definido como: un dispositivo autónomo, que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa específica usando un elemento de reconocimiento biológico soportado y en contacto directo con un elemento de transducción¹. El primer biosensor y más famoso detector bioquímico fue el desarrollado por Clark y Lyon en 1962 y utilizado como un "electrodo enzimático" para la medición de los niveles de glucosa en sangre².

Los principios básicos por los cuales operan los biosensores son los mismos que rigen a los sensores químicos y electroquímicos. Sujetos a los mismos criterios de rendimiento como: sensibilidad, exactitud, precisión, repetibilidad, tolerancia ruido, etc. Sin embargo, la naturaleza de su superficie altamente selectiva ha permitido que los biosensores encuentren gran aplicación en campos como: ingeniería de alimentos, biomedicina, química ambiental, entre otros³.

Diferentes estudios han reportado que la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) funciona como sistema de reconocimiento biológico para la detección de H_2O_2 debido a su elevada actividad enzimática, y estabilidad térmica⁴. Sin embargo, la HRP presenta limitaciones de trabajo como la inactivación y desnaturalización cuando las mediciones se hacen en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 o pHs extremos⁵. Por lo expuesto anteriormente, en este proyecto se propuso desarrollar un novedoso biosensor para la detección de H_2O_2 empleando como fuente de POD las hojas del pasto guinea, pasto considerado como mala hierba y cuyo único uso está relacionado con el forraje para el ganado. Además, la búsqueda bibliográfica en las diferentes bases de

datos como science direct no arrojó ningún resultado de reportes para electrodos modificados con esta peroxidasa.

La importancia de la detección y determinación de H_2O_2 radica en su papel como indicador de muerte celular^{6,7,8} y el uso que se le da actualmente a este reactivo en diferentes industrias como biomedicina, biotecnología, farmacia, análisis de alimentos. En este orden de ideas están siendo desarrollados nuevos métodos para la detección y determinación de H_2O_2 que sean rápidos, económicos y confiables. Entre los métodos actuales de detección se encuentran: volumetría, fluorometría, quimioluminiscencia, espectrofotometría, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), entre otras^{9,10}. Estas técnicas típicamente tienen influencia de especies interferentes y generalmente exigen tratamiento de las muestras tornándose así lentas. La cuantificación electroquímica de H_2O_2 utilizando técnicas basadas en EQM ha recibido alta atención debido a que estas técnicas ofrecen características ventajosas como la detección rápida con alta precisión, límites de detección bajos del orden de $0,1 \mu M$. Además de eso la utilización de electrodos modificados químicamente disminuye el efecto de las especies interferentes.

La construcción del biosensor se desarrolló en tres etapas. En la primera etapa se llevó a cabo la extracción y purificación parcial de la peroxidasa de pasto guinea. En la segunda etapa se modificaron los electrodos serigrafados de grafeno usando el extracto enzimático parcialmente purificado. Finalmente, la tercera etapa consistió en la caracterización de los electrodos modificados con el extracto enzimático. Para la caracterización, se emplearon métodos espectroscópicos y electroquímicos. Además, se llevó a cabo la determinación de los parámetros analíticos del sistema, tales como rango lineal, sensibilidad y límite de detección.

De esta manera se espera que el electrodo modificado además de detectar H_2O_2 en tiempo real y sin interferencias, lo haga idealmente para concentraciones del orden (μM) para su aplicación en sistemas biológicos.

1. MARCO DE REFERENCIA

En búsqueda de alternativas para innovar aspectos analíticos que se demandan en la actualidad, y más importante aún; seguir aprovechando recursos naturales renovables, en este proyecto se desarrolló un biosensor amperométrico basado en la modificación de electrodos de grafeno con PPG.

El interés en este trabajo de investigación se debió fundamentalmente a que hasta el momento no hay trabajos reportados sobre biosensores enzimáticos que empleen PPG, y además la necesidad de detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en tiempo real en la industria ambiental y biomédica, ya sea como reactivo en las diferentes industrias o como indicador de muerte celular respectivamente^{6,7,8}.

1.1 ESTUDIOS SOBRE PEROXIDASAS

La diversidad de plantas tropicales que crecen en Colombia es muy grande, con el fin de aprovechar estos recursos y buscando nuevas fuentes de POD para aprovechar sus diversas aplicaciones; Sakharovl. I, Bautista. G y col., 1999 evaluaron el contenido de POD en algunas plantas tropicales¹¹.

Para los análisis se seleccionaron frutos, raíces y hojas de diferentes plantas tropicales que crecen en Colombia. Se registró que la actividad de la peroxidasa varía ampliamente de una especie a otra, los datos correspondientes a las actividades de las distintas plantas se muestran en la tabla 1.

Sakharovl. I, Bautista. G y col ¹¹ encontraron que los niveles más bajos de actividad enzimática corresponden a las frutas y presentan diferentes valores de acuerdo al grado de madurez, en consecuencia, la posibilidad de obtención de un

preparado comercial de POD a partir de estas fuentes queda descartada. Así como las frutas, la mayor parte de las raíces analizadas exhibieron también baja actividad enzimática, solo se puede destacar la actividad enzimática de Batata (*Ipomoea batatas*) y Rábano silvestre (*Armoracia Lapothifolia*) con 1800 U/g y 2600 U/g respectivamente. Es importante resaltar que el Rábano silvestre (*Armoracia Lapothifolia*) posee la mayor actividad enzimática de POD que se conoce actualmente y es el extracto enzimático comercialmente disponible con mayor aplicación.

A diferencia de las frutas y raíces, las hojas de la mayor parte de las plantas presentaron en promedio los valores más altos de actividad enzimática de POD. En los registros de niveles de actividad de POD para hojas se destaca la dormidera (*Mimosa pigra*), pasto guinea (*Panicum maximum*) con 460 U/g y 980 U/mg respectivamente. Además, diferentes especies de palmas registran en promedio altos valores de actividad enzimática de POD, y según la especie evidencian un variado contenido de POD. Así, el alto contenido de actividad de POD en las hojas de plantas tropicales constituye una fuente potencial muy importante para la obtención de preparados comerciales de POD.

Tabla 1. Actividad de la peroxidasa extraídas de plantas tropicales ¹¹

PEROXIDASA DE FRUTAS DE ALGUNAS PLANTAS TROPICALES			
FUENTES DE POD	U/g	FUENTES DE POD	U/g
Almendra (<i>Terminalia catappa</i>) Semimaduro	<1.0	Café (<i>Coffea arabica</i>) Maduro Corteza	9.2 22.9
Balazos (<i>Mostera deliciosa</i>) Tierno (146 g, verde) Verde (343 g, verde) Semi-maduro (551 g, verde)	32.4 69.4 69.4	Palma de coco (<i>Cocos nucifera</i>) Semimaduro	1.2
Cacao (<i>Theobroma cacao</i>) Semimaduro Corteza Pulpa	11.6 <1.0 11.6	Tomate de árbol (<i>Cyphomandra betacca</i>) Maduro Corteza	16.2 4.0
PEROXIDASA DE RAICES EN ALGUNAS PLANTAS TROPICALES			
FUENTES DE POD	U/g	FUENTES DE POD	U/g
Apio (<i>Apium graveolens</i>)	58.0	Ñame (<i>Dioscorea alata</i>)	87.0
Arracacha (<i>Arracacia xanthorriza</i>)	<1.0	Ollucos (<i>Ullucus tuberosus</i>)	46.0

Batata (<i>Ipomoea batatas</i>)	1800	Papa criolla (<i>Solanum rybinii</i>)	24.3
Bote (<i>Colocasia esculenta</i>)	370	Rábano rojo (<i>Raphanus sativus</i>)	121.3
Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	35.0	Rábano silvestre (<i>Armoracia Lapothifolia</i>)	2600
PEROXIDASA DE HOJAS EN ALGUNAS PLANTAS TROPICALES			
FUENTES DE POD	U/g	FUENTES DE POD	U/g
Balazos (<i>Monstera delisiosa</i>)	79	Dormidera (<i>Mintosa pigra</i>)	460
Banano (<i>Musa sapientum</i>)	9.7	Pasto guinea (<i>panicum maximum</i>)	980
Bambú (<i>Bambusa guadua</i>)	1.0	Palma mararai (<i>Aiphanes Cariotifolia</i>)	1145
Caléndula (<i>Calendula oficionales</i>)	31.2	Palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>)	566
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	04	Palma de coco (<i>cocos nucifera</i>)	48.6

La actividad enzimática específica esta expresada en U/g.

En la actualidad la investigación sobre POD sigue avanzando y es por eso que en los últimos años se ha dirigido a la viabilidad del uso de enzimas para mejorar la calidad de muchos procesos. Con esto se evidencian que dichas peroxidases pueden ser una gran herramienta en biotecnología. Por ejemplo, en el año 2005, Ikehata y col., evaluaron las propiedades catalíticas de peroxidasa extracelular proveniente de dos especies de hongos *Coprinus sp*, para el tratamiento de aguas residuales fenólicas. Estos investigadores determinaron que la peroxidasa de *Coprinus sp* UAMH 10067, fue más estable a 50°C en condiciones básicas en comparación con la peroxidasa extraída de *Coprinus cinereus* UAMH 4103. Ambas enzimas evidenciaron que la eficiencia de eliminación de fenol era comparable con otras peroxidases vegetales previamente estudiadas¹².

En el 2008, Zamorano y col., publicaron el estudio termodinámico de la peroxidasa de la palma real *Roystonea regia* (PPR) y, con los resultados obtenidos, determinaron que la enzima forma dímeros, característica que la diferencia de otras peroxidases vegetales, por lo que probablemente sea más estable. Además, los autores observaron que la estabilidad estructural de la PPR era dependiente del pH. Por otro lado, realizaron un análisis térmico que indicó su alta estabilidad a temperaturas mayores de 70°C y, finalmente, concluyeron que la desnaturalización estaba acoplada a la disociación del dímero, el cual se forma en solución, dependiendo del pH y de la concentración en la que se realizó el ensayo.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, propusieron que esta enzima podría ser utilizada con fines biotecnológicos¹³.

Al año siguiente, Zamorano y col., estudiaron la estabilidad estructural de una peroxidasa, proteína dimérica extraída de hojas de palma de *Chamaerops excelsa* (CEP). La caracterización fue realizada por calorimetría diferencial de alta sensibilidad, dicroísmo circular y fluorescencia de triptófano en estado estable a un pH de 3. Como resultado, encontraron que la CEP a pH 3, comparada con otras peroxidases, es sustancialmente más estable que la peroxidasa de rábano picante isoenzima C (CPRH) y la peroxidasa aniónica de maní (*Arachis hypogaea*). Asimismo, observaron que presentaba prácticamente la misma estabilidad que la peroxidasa de la palma de aceite africana *Elaeis guineensis* (AOPTP) y la de peroxidasa de palma real *Roystonea regia* (RPP)¹⁴.

En el 2012, Cai y col., purificaron una nueva hemoperoxidasa de hojas de *Jatropha curcas*, una importante fuente de bio-diesel. La caracterización de esta peroxidasa permitió conocer que la masa molecular de esta enzima purificada fue de alrededor de 48 kDa. El análisis de filtración en gel reveló que la enzima era un monómero bajo condiciones nativas. La peroxidasa purificada tenía amplia especificidad de sustrato, gran estabilidad frente a la alta temperatura, pH extremo, disolvente orgánico y peróxido de hidrógeno, lo que sugirió que la enzima podría ser una candidata potencial para aplicaciones industriales y biomédicas¹⁵.

1.2 ESTUDIOS SOBRE BIOSENSORES

Al hacer una revisión del desarrollo de biosensores usando POD, se encuentra que la mayoría son diseñados usando HRP, como se puede notar en los estudios mostrados en esta sección. Cabe resaltar que el grupo de investigación de bioquímica y microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander; en el cual se llevó a cabo este proyecto de grado, desarrolla una continua búsqueda

de nuevas fuentes de peroxidasa para la construcción de biosensores que presenten mejor comportamiento para la detección de analitos de interés biomédico y ambiental⁵.

Para resaltar la importancia de la detección de peróxido de hidrógeno, conviene mencionar que el H_2O_2 es un reactivo químico usado ampliamente en la industria química. Algunas aplicaciones a destacar: industria del papel, industria alimenticia como desinfectante no tóxico; o aplicaciones ambientales para el tratamiento de aguas residuales, además el H_2O_2 resulta ser un indicador de muerte celular porque las especies activas, el anión superóxido y el radical hidroxil están implicados en apoptosis y necrosis; como se referencio anteriormente.

Teniendo en cuenta la utilidad de la HRP y la importancia de la detección de H_2O_2 , las siguientes investigaciones resaltan la utilidad de la HRP a la hora de desarrollar un biosensor para la detección de H_2O_2 . Wang y col. en el 2002, publicaron los resultados del diseño de un biosensor para la detección de H_2O_2 por adsorción de la HRP sobre monocapas de nanotubos de carbono. La caracterización de los electrodos se hizo mediante voltamperometría cíclica y microscopia electrónica de barrido, esta última para estudiar la morfología de los electrodos modificados. El límite de detección obtenido fue de $2,1 \cdot 10^{-13}$ M y ha sido uno de los más bajos reportados hasta ese momento¹⁶.

Liu y col. en el 2006 inmovilizaron la HRP sobre electrodos de platino modificados con oro y cisteína para la detección de H_2O_2 . Las características del biosensor fueron estudiadas con voltamperometría cíclica y cronoamperometría. Este sensor respondió a los cambios de concentración de H_2O_2 sin el uso de ningún mediador, es decir, hubo una transferencia directa de electrones entre el centro catalítico de la HRP y el electrodo¹⁷.

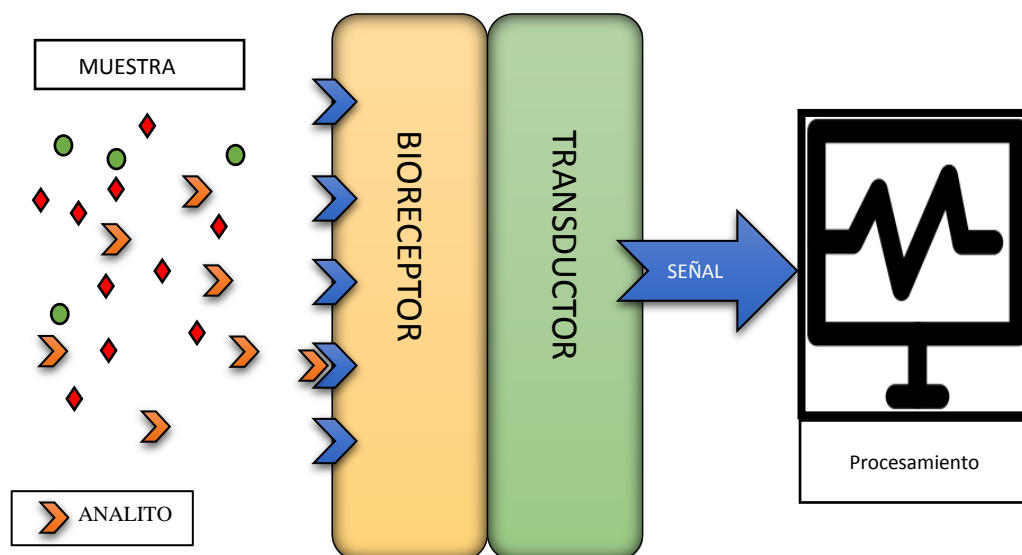
Aún más reciente, para el año 2008, Xu, Shu Xia y col, desarrollaron un biosensor de HRP. En esta ocasión, la HRP fue inmovilizada sobre nanotubos de carbono de pared múltiple. Los resultados muestran que el pH óptimo de este dispositivo fue de 7,0 el rango lineal para la detección de peróxido de hidrógeno estuvo entre 70 μM y 3000 μM . Los autores resaltan la gran utilidad de los nanomateriales para mejorar la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y el electrodo, finalizando con una rápida respuesta por parte del dispositivo¹⁸.

2. MARCO TEORICO

2.1 BIOSENSORES

La IUPAC define un biosensor como un dispositivo capaz de proporcionar una información analítica específica cuantitativa o semi-cuantitativa, utilizando un elemento de reconocimiento biológico que está en contacto directo con un elemento transductor como se observa en la figura 1.

Figura 1. Esquema de un biosensor.



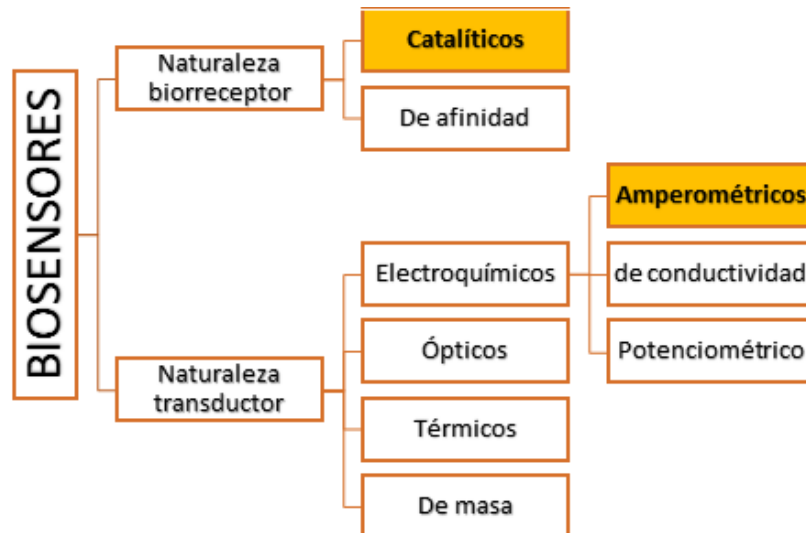
El reconocimiento de moléculas o grupos de moléculas particulares constituye un proceso fundamental en el funcionamiento de los sistemas biológicos. La naturaleza ha desarrollado un amplio conjunto de biomoléculas que muestran una gran selectividad en el reconocimiento de alguna propiedad particular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

El transductor, en el cual se encuentra inmovilizado o retenido el material biológico, debe permitir la conversión de la interacción del analito con el receptor en una respuesta eléctrica, que luego es amplificada y procesada; la cual estará relacionada con la concentración de ese analito. Dicho transductor, por tanto, determina la eficacia en el procesado de la señal del biosensor, mientras que su selectividad viene principalmente definida por la particularidad de la interacción del componente biológico con el analito. Idealmente, los dispositivos de este tipo deben responder continua y reversiblemente al analito de interés sin perturbar la muestra, eliminando así la necesidad de su pretratamiento e incluso su recolección¹⁹.

Clasificación. Los biosensores pueden ser clasificados en varios grupos, ya sea por el tipo de transductor empleado (óptico, piezoeléctrico, electroquímico, térmico) o por el tipo de elemento de bio-reconocimiento utilizado (anticuerpos, enzimas, ácidos nucleicos, y células enteras). Ambos componentes del biosensor, es decir, el elemento bio-reconocimiento y el transductor, juegan un papel importante en la construcción de un dispositivo sensible y específico para el analito de interés.

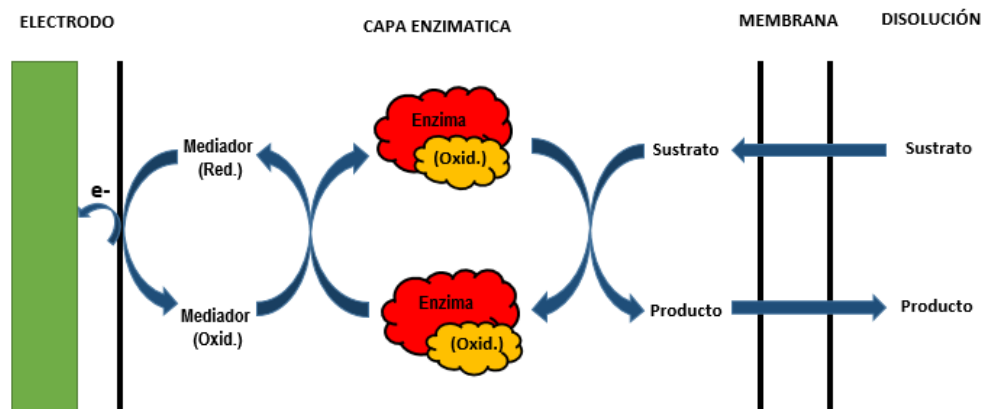
En la figura 2 se detalla la clasificación de los biosensores. Para el interés de este proyecto, se profundizará únicamente en biosensores amperométricos y biosensores catalíticos.

Figura 2. Clasificación de biosensores según naturaleza del bio-receptor y transductor.



2.1.1 Biosensores catalíticos. Los biosensores catalíticos usan enzimas como bio-receptores, la representación de un biosensor catalítico se muestra en la figura 3. La capa de enzima inmovilizada se interpone entre la superficie del electrodo y la disolución del analito, habiéndose utilizado tanto métodos físicos como químicos para preparar capas de enzimas inmovilizadas sobre diversos tipos de superficies electródicas.

Figura 3. Esquema biosensor catalítico



Autor: Modificado por el autor²⁰.

Por otra parte, algunos métodos utilizan una sustancia mediadora, cuya oxidación o reducción sobre el electrodo sirve para monitorizar la concentración de los sustratos en disolución. La finalidad de este mediador es la de acelerar la transferencia de electrones, lo que permite, en general, obtener respuestas más rápidas y mejores límites de detección. En ciertos casos, el empleo de un mediador puede servir para aplicar un potencial de medida más adecuado. Ejemplos de mediadores son: la hidroquinona, ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$, el mendola blue y compuestos con partículas de rutenio²⁰.

2.1.2 Biosensores amperométricos. Los Biosensores amperométricos, sin duda alguna; en el contexto de los biosensores electroquímicos, son los más prometedores, sobre todo en términos de sensibilidad. En su construcción generalmente se usan enzimas específicas para cada analito, aunque en algunos casos se inmoviliza un tejido vegetal que las contiene^{21,22}.

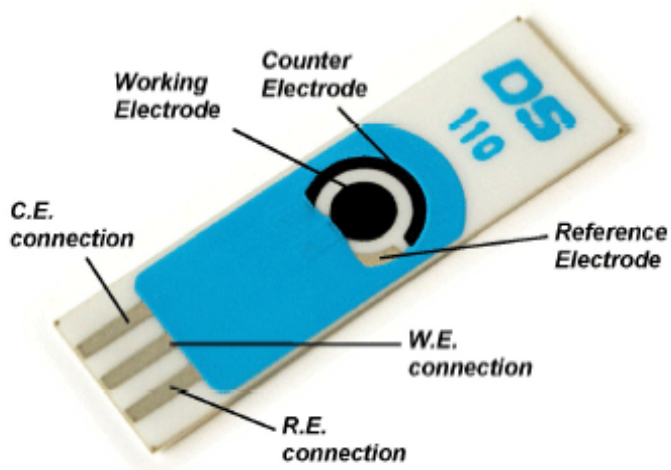
Los dispositivos amperométricos se basan en la medición de la corriente resultante de la oxidación o reducción electroquímica de una especie electroactiva. La medición se lleva a cabo mediante la aplicación de un potencial fijo sobre el electrodo de trabajo (generalmente de platino, oro o grafeno), con respecto a un electrodo de referencia, un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de casos para completar la celda electroquímica²¹. La corriente resultante se correlaciona directamente con la concentración de la especie electroactiva o su tasa de producción o el consumo dentro de la capa biocatalítica adyacente del transductor.

2.2 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

Los transductores juegan un papel importante en el desarrollo de biosensores, por tal razón a través del tiempo se han venido estudiando diferentes configuraciones y diseños de los mismo.

Útiles en áreas medioambientales y biomédicas, un electrodo serigrafiado es una pequeña tarjeta donde se encuentra un circuito eléctrico integrado como el representado en la figura 4. Los electrodos serigrafiados están fabricados de diferentes materiales como: carbono, oro, platino, plata, nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, entre otros materiales.

Figura 4. Electrodo serigrafiado²³.



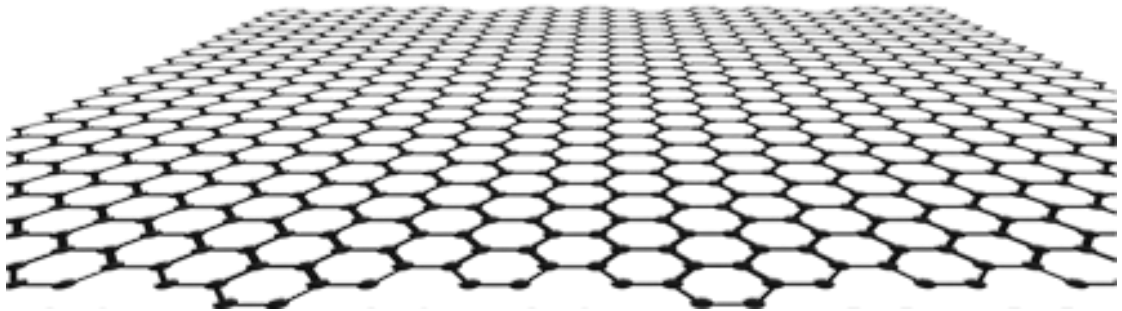
La principal ventaja de estos electrodos es su pequeño tamaño y facilidad de modificación lo que los hace idóneos para el manejo de pequeños volúmenes de muestra (μL)²⁴.

2.3 GRAFENO

Desde un punto de vista estructural, el grafeno es el material más delgado jamás obtenido, está conformado por anillos hexagonales de carbonos con hibridación sp^2 como se observa en la figura 5. Una lámina de grafeno tiene un espesor de 3.35 Å. Además, se trata de un material muy ligero: tiene una densidad de, únicamente, 0,77 mg/m^2 .

La característica más interesante del grafeno tiene que ver con la conductividad eléctrica. El grafeno conduce la electricidad tan bien como el cobre: su conductividad eléctrica es $0,96 \cdot 10^8 \text{ } (\Omega \cdot \text{m})^{-1}$, mientras que la del cobre es $0,60 \cdot 10^8 \text{ } (\Omega \cdot \text{m})^{-1}$ y la del silicio de $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ } (\Omega \cdot \text{m})^{-1}$. Debido a la disposición espacial de los átomos de carbono en el grafeno y al tipo de enlace entre los carbonos, los electrones se desplazan sobre su superficie a una velocidad sin precedentes en ningún otro material²⁵. Estas y otras propiedades de conductividad térmica, resistencia mecánica, entre otras, hacen del grafeno un material de interés para el desarrollo de nuevas aplicaciones. Además, su elevada superficie específica (aprox $2600 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) convierte al grafeno en un potencial candidato para la elaboración de sensores de gran sensibilidad²⁵.

Figura 5. Conformación bidimensional del grafeno.



2.4 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, reduciendo la energía de activación de una transformación desde reactivos a productos como se aprecia en la figura 6. En una reacción catalizada por una enzima se produce la unión del sustrato en una región concreta de la enzima denominada centro activo, el cual comprende un sitio de unión y un sitio catalítico. Una vez formados los productos, la enzima se recupera pudiendo comenzar un nuevo ciclo de reacción.

En ocasiones puede ser necesaria la presencia de cofactores para que la enzima pueda regenerarse y estar activa nuevamente.

En la tabla 2 se indica la clasificación de enzimas de acuerdo a la reacción química que catalizan. Sin embargo, entre las enzimas disponibles comercialmente, las de mayor uso son las oxidoreductasas.

Figura 6. Reducción de la energía de activación en reacciones catalizadas por enzimas.

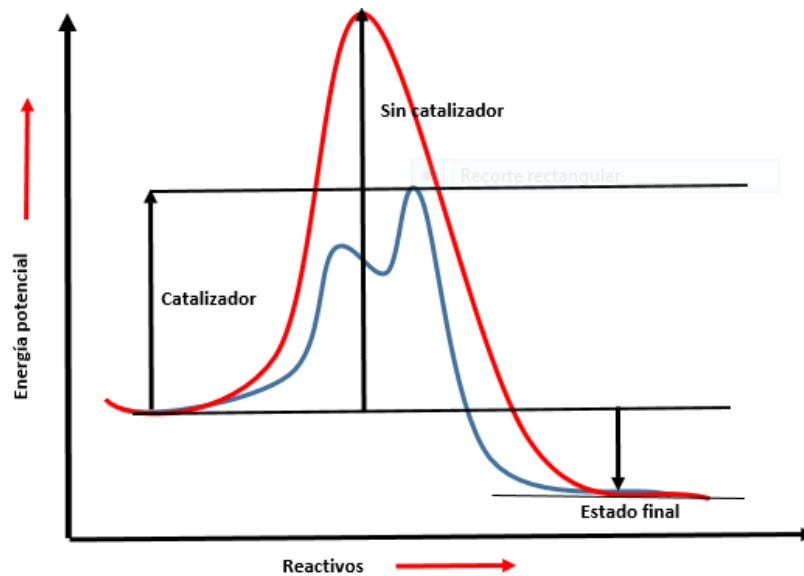


Tabla 2. Clasificación de las enzimas.

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

2.4.1 Oxidorreductasas. El fundamento de las oxidorreductasas se basa en la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de un dador (agente receptor) a un aceptor (agente oxidante) en el medio biológico de reacción, modificando así; el estado de oxidación del sustrato. Dentro de la clasificación de oxidorreductasas se encuentran las peroxidasas; enzimas ampliamente empleadas en la construcción de electrodos enzimáticos.

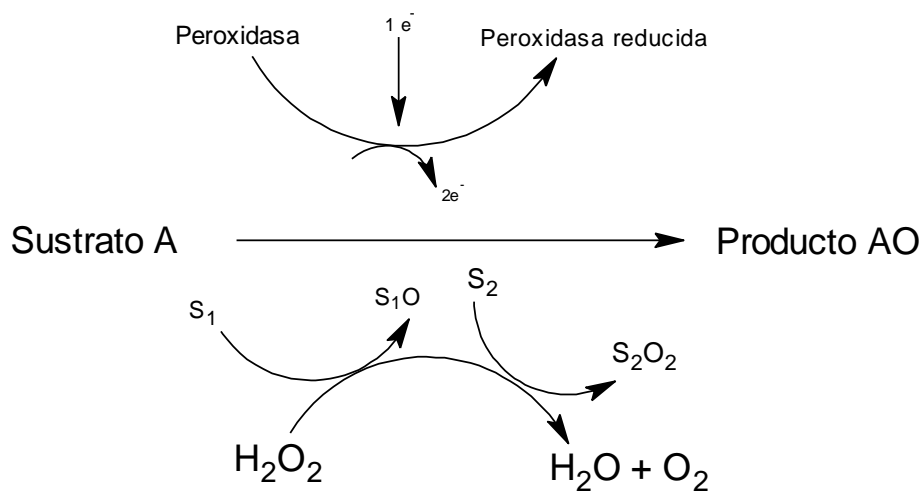
2.4.2 Peroxidasas. Las peroxidasas (POD) son glicoproteínas globulares con un peso molecular aproximado de 42000 Da, la porción proteica corresponde aproximadamente 34000 Da y el resto del peso molecular corresponde al grupo prostético (grupo hemo), dos iones calcio y algunos glicanos superficiales enlazados.

La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del H_2O_2 . Es utilizada ampliamente en bioquímica clínica. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasa como enzima acoplada. También se utiliza en inmunoensayos para la detección de virus tan conocidos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA o el herpes virus. La peroxidasa también se utiliza como biocatalizador para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes.

Como se muestra en la figura 7, en la reacción catalizada por la peroxidasa, el H_2O_2 es reducido a expensas de varias sustancias que actúan como donadores de electrones, este proceso comienza con una rápida reducción de un peróxido seguida por dos oxidaciones consecutivas de un segundo y tercer sustrato. En la reducción del peróxido la enzima pierde dos electrones, convirtiéndose en una

especie muy reactiva debido a su elevado estado de oxidación. Esta especie adquiere un electrón a partir de un segundo sustrato generando así un nuevo intermediario, el cual, a su vez, se reduce a la enzima nativa con la inevitable oxidación de otra molécula de sustrato. Todas estas transformaciones son posibles por la disposición especial del grupo hemo en el sitio activo de las peroxididasas.

Figura 7. Reacción catalizada por peroxidasa.



La afinidad de la POD por el sustrato donador depende de la fuente de la enzima y del grado de pureza de ésta. Una gran variedad de compuestos puede actuar como donadores de electrones, incluyendo fenoles (p-cresol, guayacol, resorcinol) aminas aromáticas (anilina, bencidina, o-fenildiamina, o-dianisedina) nicotinamida-adenina dinucleotida reducida y nicotinamidaadenina dinucleotida fosfato reducida.

2.5 PASTO GUINEA

Pasto guinea es la fuente del extracto enzimático usado en este proyecto para la construcción del biosensor amperométrico para la detección de H_2O_2 . Es una gramínea perenne nativa de África (ver figura 8), la inflorescencia es una espiga abierta con ramificaciones laterales. Es una especie con amplio rango de

adaptación; desde el nivel del mar hasta los 1800 (msnm), crece bajo suelos de alta fertilidad y soporta niveles moderados de sequía, mejora su comportamiento cuando es sometida a penumbra o sombra de una especie arbórea adecuada. Las hojas son largas, anchas y bien distribuidas en los tallos, la altura de la planta va desde 0.80 m hasta 3.0 m ²⁶.

Este pasto se usa eventualmente para pastoreo, aunque debido a su naturaleza agresiva se clasifica en maleza. Se encuentra en los bordes de carreteras, bordes de cerca, domina las zonas susceptibles a los incendios y es capaz de regenerarse rápidamente en comparación al pasto de pradera. Los contenidos de proteínas con base a materia seca son alrededor del 9% a los 35 días de edad y del 7% a los 45 días de edad²⁷.

Figura 8. Fotografía de pasto guinea.



2.6 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE DIFERENTES ELECTRODOS

La actividad enzimática está relacionada normalmente con el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la presencia de cofactores. Por otro lado, la estabilidad de las enzimas es un factor limitante en cuanto al tiempo de vida media de un biosensor

de tipo enzimático; por lo cual se investigan técnicas para aumentar dicha estabilidad (Inmovilización).

La inmovilización de las enzimas es una de las etapas críticas en el diseño de los biosensores ya que la enzima ha de ser retenida firmemente para que no pueda desprenderse al introducirse en la disolución o producto del proceso de difusión de las especies en ella. Por otro lado, debe permitir la suficiente movilidad que garantice la comunicación electrónica entre el centro redox de la enzima y el electrodo (Au, Ag, Pt, C).

Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por micro encapsulación, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento (crosslinking)²⁸. Dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes y, además es posible utilizar combinaciones de diferentes métodos de inmovilización como se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos de inmovilización.

MÉTODO	DETECCIÓN/TIPO DE ELECTRODO	REFERENCIA
Atrapamiento físico	Amperometría, voltamperometría cíclica. Electrodo de Carbono vitrificado+ película compósito de grafito-arcilla+3,4-dihidroxilbenzaldehído	Cosnier, S., Marks, R.S., et al. (2000) ²⁹
Entrecruzamiento con glutaraldehído y albúmina de suero bovino, deposición en el electrodo Pt-nafion	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica Electrodo de carbono vitrificado modificado con nafion	Liu, H., Ying, T., Sung, K., Li, H., Qi, D. (1997) ³⁰
Atrapamiento físico	Amperometría PD (grafito y parafina) con batata	Vieira I.C., Fatibello, O. (2000) ³¹
Enlace covalente	Voltamperometría cíclica Electrodo de oro modificado con N-succinimidil-3-tiopropionato	Darder, M., Takada, K., et al. (1999) ³²
Entrecruzamiento con glutaraldehído y quitosano.	Voltamperometría cíclica Cronoamperometría Electrodo serigrafado de grafeno	Villamizar, E.,Castillo, J ⁵
Enlace covalente con carbodiimida o entrecruzamiento con	Electrodo de disco de oro modificado con monocapas ensambladas	Campuzano, S., Gálvez, R., et al. (2002) ³³

glutaraldehído		
Enlace covalente del grupo carboxilo del poliamino-naftaleno	Cronoamperometría Voltamperometría cíclica. Electrodo de Pt modificado con poliaminonantaleño y poliaminonaftoquinona	Piro, B., Do, V.A., Le, L.A., Hedayatullah, M., Pham, M.C. (2000) ³⁴

2.7 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS PARA CARACTERIZACIÓN DE ELECTRODOS.

La determinación de los mecanismos subyacentes a un proceso de oxidación o de reducción puede realizarse mediante una gran variedad de métodos electroquímicos.

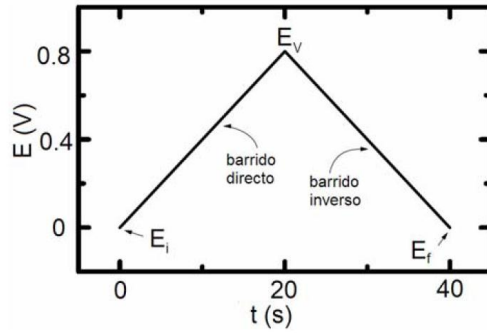
Históricamente, muchas técnicas electroanalíticas se han desarrollado, estas, pueden ser clasificadas en cuatro principales categorías: potenciometría, voltamperometría, cronoamperometría y espectroscopia de impedanciometría³⁵. Para una visión general solo referenciaremos voltamperometría, cronoamperometría y espectroscopia de impedancia.

2.7.1 Voltamperometría cíclica. Es el método más difundido y quizás el más directo de todos los demás empleados en electroquímica. La voltamperometría cíclica consiste en la aplicación de un barrido de potencial a la celda electroquímica en condiciones estacionarias, es decir, aquellas en las que, sin agitación, se varía el potencial aplicado desde un valor inicial (E_i) hasta un vértice de potencial (E_v), seguido de un barrido inverso hasta llegar a un potencial final (E_f), el cual es normalmente idéntico a la inicial (ver figura 9). La corriente resultante (I) es monitorizada en función del potencial aplicado (E) para dar la curva i - E , la cual se denomina Voltamperograma cíclico.

Los procesos voltamétricos en disolución están normalmente regidos por la difusión de las partículas hacia el electrodo. Éstos deben ser claramente

diferenciados de los procesos debidos a fenómenos superficiales ocurridos sobre el electrodo.

Figura 9. Barrido potencial para voltamperometría a $0,08 \text{ Vs}^{-1}$ ³⁶.



La figura 10 muestra un voltagrama cíclico típico, como es el caso del obtenido para el ferroceno en disolvente acuoso. En este caso, tanto las formas reducidas como oxidadas son solubles en agua. El valor del potencial inicial es 0.2 V, en el que no tiene lugar ningún proceso electroquímico ni ningún otro tipo de corriente al comenzar el ciclo³⁶. El barrido inicial se realiza hacia potenciales más positivos, de manera que el ferroceno compuesto presente en disolución sea oxidado como se observa en la figura 11.

Figura 10. Voltamperometría cíclica de una disolución 0.5 mM Ferroceno en acetonitrilo. Área del electrodo = 2.54 mm^2 . Velocidad de barrido = 100 mVs^{-1} ³⁶.

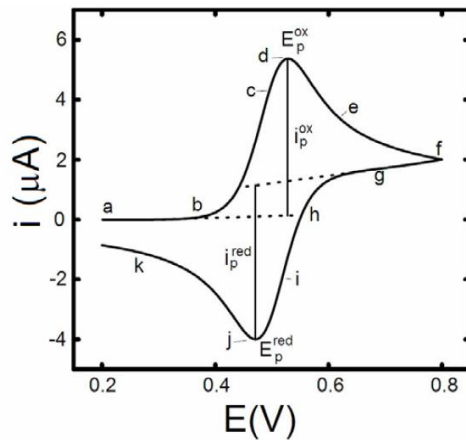
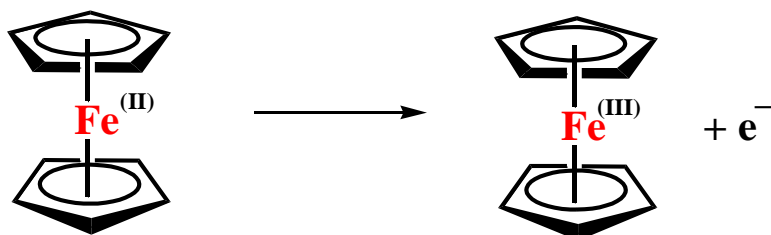
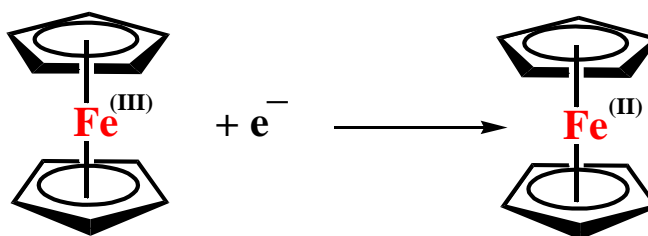


Figura 11. Oxidación Ferroceno.



La corriente de oxidación se incrementa rápidamente en el barrido anódico (b hasta d), hasta que la concentración de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ en la superficie del electrodo es significativamente menor. Este hecho da lugar a la aparición de un máximo de corriente en $E_{p \text{ ox}}$. Posteriormente, se produce una bajada (d hasta g), ya que el proceso pasa a estar controlado por la velocidad de difusión del ferroceno desde el seno de la disolución a la superficie del electrodo. Al invertir la dirección del barrido, la corriente de oxidación todavía fluye, y al llegar al potencial necesario, la especie formada en la oxidación $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]^+$, es reducida de nuevo como se observa en la reacción de la figura 12.

Figura 12. Reducción del Ferricinio.



De nuevo, la corriente se incrementa rápidamente (i hasta k) para dar un valor máximo de $E_{p \text{ red}}$ (pico de reducción). A medida que transcurre la reducción, la concentración de $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]^+$ se agota en la superficie del electrodo, y otra vez tiene lugar una caída de intensidad, debida al control difusivo del proceso (j hasta k).

Para los procesos reversibles (el equilibrio se establece en la escala de tiempos del experimento), el potencial formal de reducción E^0 tiene un valor aproximado al del valor medio de los dos potenciales de pico como se describe en la ecuación [1]³⁶

[1]

$$E^0 = \frac{E_p^{ox} + E_p^{red}}{2}$$

La separación entre los picos de potencial ($E_{p\ ox}$ y $E_{p\ red}$) está relacionada con el número de electrones (n) transferidos en la reacción electrónica como se describe en la ecuación [2]³⁶

[2]

$$\Delta E_p = E_p^{ox} - E_p^{red} = \frac{0,059}{n} \quad \text{a } 25^\circ\text{C}$$

La transferencia de electrones lenta (irreversibilidad) o la resistencia no compensada (caída óhmica), provocan que ΔE_p aumente. Los valores de $i_{p\ ox}$ y $i_{p\ red}$ deberían ser idénticos para un par reversible. La irreversibilidad química, en la que una reacción química es acoplada al proceso electroquímico, causa desviaciones de la unidad respecto a la relación $i_{p\ ox} / i_{p\ red}$, lo que puede servir como valiosa información a la hora de caracterizar un proceso electroquímico. Cuanto más irreversible se presenta un sistema, mayor es esta desviación, llegando a desaparecer el pico inverso en el proceso para los casos totalmente irreversibles.

Finalmente, para un sistema reversible, E_p es independiente de la velocidad de barrido. Sin embargo, la corriente de pico sí depende de este parámetro, a través de la ecuación de Randles- Sevcik descrita en la ecuación [3]³⁶

[3]

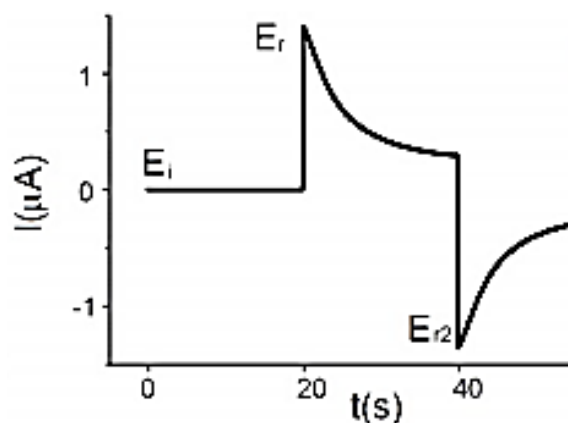
$$i_p = 2.69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c \cdot v^{1/2} \quad \text{a } 25^\circ\text{C}$$

Donde i_p es la corriente de pico, n es el número de electrones intercambiados, A es el área del electrodo (cm^2), D es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), C es la concentración (mol cm^{-3}), y v es la velocidad de barrido (Vs^{-1}). Teniendo en cuenta la ecuación de Randles-Sevcik, y realizando una adecuada calibración, puede deducirse importante información de un proceso a partir de su Voltamperograma cíclico, como el número de electrones intercambiados, coeficiente de difusión o concentración de especie electroactiva.

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

Esta técnica lleva consigo, primero, la aplicación de un potencial inicial E_i , en el que no ocurre ninguna reacción de tipo faradaico. Una vez se alcanza el equilibrio, se produce un pulso de potencial hasta un potencial final E_r , el cual provoca que se lleve a cabo la reacción redox del compuesto de interés³⁶. El potencial se mantiene durante un tiempo t_r determinado y simultáneamente se registra la intensidad generada en función del tiempo, dando lugar a una curva i - t como la que se muestra en la figura 13.

Figura 13. Curva i - t resultante de la aplicación de la onda potencial³⁶.

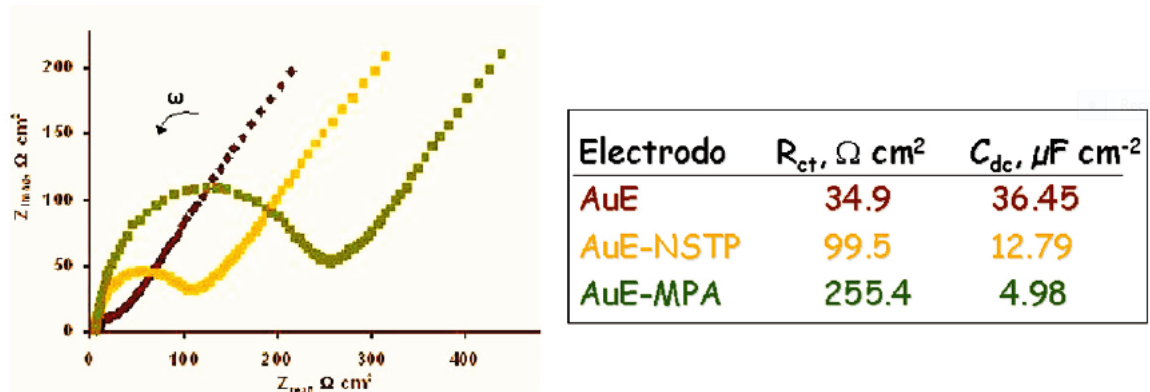


2.7.3 Espectroscopia de Impedancia. La impedancia es la relación entre los fasores de voltaje y corriente de un elemento de dos terminales. La impedancia puede ser real (resistencia), imaginaria (reactancia) o real e imaginaria (una magnitud compleja). Esta técnica se emplea para reconocer la presencia de capas no conductoras en la superficie de los electrodos, que origina un aumento de la resistencia a la transferencia de carga.

A modo de ejemplo en la figura 14 se presentan mediciones de impedancias para un electrodo sin modificar y otro modificado con una monocapa de NSTP (N-succinimidil-3-tiopropianato) y otra modificación con MPA (ácido 3-mercaptopropiónico). Sea cual sea la modificación de la superficie electródica, una mayor resistencia a la transferencia de carga y una mayor capacitancia en la configuración modificada, indicará un mayor efecto bloqueante de la reacción electródica debido a su mayor compacidad de la monocapa.

Figura 14. Respuesta medición impedancia superficies electródicas.³⁷

(AuE representa el electrodo sin modificar).



3. METODOLOGÍA

3.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Merck: peróxido de hidrógeno H_2O_2 30 % p/v, sulfato de amonio $((NH_4)_2SO_4)$ 10% p/v y polietilenglicol PEG (peso molecular 15.000-20.000); J.T. Baker: guayacol; Sigma-Aldich: glutaraldehído (50 % p/v). Los reactivos utilizados para las soluciones tampón fueron todos de grado analítico y proporcionados por J.T Baker. Ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM.

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

3.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE PPG

3.2.1 Extracción. El pasto guinea (*Panicum maximum*) recolectado se lavó con agua destilada, la nervadura central fue retirada y descartada, lo demás se cortó y trituró en un molino eléctrico el mismo día de su recolección.

Figura 15. Pasto guinea (*Panicum maximum*) triturado en molino eléctrico.



Se pesaron 70 g del triturado y se dividieron en dos porciones iguales, a una porción se le añadió 140 mL de buffer de fosfatos (30 mM, pH 8.0) y se dejó en agitación constante durante 06 horas. Terminado el tiempo de homogenización, el extracto se filtró usando tela de algodón, el precipitado se descartó y al sobrenadante se le añadió la segunda porción del triturado; con el fin de concentrar la PPG y continuar con la extracción, se repitió el proceso descrito anteriormente con la variante de agitación constante durante 12 horas.

Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 min y 4°C con el fin de eliminar los sólidos. Al finalizar la extracción, se determinó la concentración de proteínas y la actividad enzimática del extracto. El extracto enzimático se conservó a 4°C para los experimentos posteriores.

3.2.2 Eliminación de pigmentos. Se llevó a cabo la eliminación de fenoles, polifenoles y productos de oxidación de estos compuestos mediante un método de reparto bifásico descrito por J. Castillo, I. Alpeeva et al ³⁸. La eliminación de dichas

sustancias es necesaria antes de realizar las etapas de purificación ya que modifican los soportes cromatográficos y además pueden llegar a inactivar la enzima de interés tal como se reporta por D. Platis y col.

Sobre el extracto crudo obtenido, se adicionó lentamente y en constante agitación magnética, PEG 14% p/v y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% p/v hasta completa homogenización. La mezcla se dejó en reposo en un embudo de decantación a temperatura ambiente hasta que se obtuvieron dos fases (aproximadamente 1 hora) y finalmente se recogió la fase clara (inferior); la cual contenía la peroxidasa de pasto guinea. Una vez recolectada la fase de interés, se midió concentración de proteínas y actividad enzimática. El extracto enzimático se conservó a 4°C para los experimentos posteriores.

3.2.3 Cromatografía por permeación en gel. Para el desarrollo de esta cromatografía la fase estacionaria empleada fue Sephadex G-50, la columna se equilibró con buffer TRIS-básica de 3mM a pH 8.0 con un flujo de 1mL/min y la elución se desarrolló con el mismo buffer de equilibrio. Las fracciones fueron recolectadas cada ocho minutos y finalmente; se eligieron las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática, para las cuales se determinó la concentración de proteínas. Las fracciones con mayor actividad enzimática fueron mezcladas y se conservaron a 4°C para los experimentos posteriores.

3.2.4 Concentración del extracto enzimático. Para concentrar el extracto enzimático se usó la técnica de ultrafiltración empleando amicones de 10000 kDa. El extracto se dividió en dos amicones 10000 kDa, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 min a 4°C. Tanto al extracto enzimático concentrado como al filtrado se le midió la actividad enzimática y el primero se conservó a 4°C para los experimentos posteriores.

Esta fue la última etapa de purificación, la fracción concentrada fue el extracto empleado para modificar los electrodos serigrafados de grafeno.

3.2.5 Determinación de proteínas mediante el método de Bradford. La determinación de la concentración de proteínas en las diferentes etapas de purificación parcial de PPG se determinó por el método colorimétrico de Bradford³⁸, usando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón estándar.

Mediante interpolación con una curva de calibrado se halló la concentración de proteínas con la absorbancia a 595 nm, el equipo empleado fue espectrofotómetro UV-Vis de doble haz UV-1800 SHIMADZU. Cada ensayo se realizó por triplicado.

3.2.6 Determinación de Actividad Enzimática. La actividad catalítica de la peroxidasa (PPG) se cuantificó de forma continua a través de la determinación de las velocidades iniciales de reacción. Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU) y el sustrato empleado fue guayacol.

La reacción se realizó de la siguiente forma: 5 μ L de PPG (dilución 1:10 en PBS 30 mM pH 8.0) + 2.5 mL de solución buffer fosfato de potasio 30 mM (pH 8) + 5 μ L de guayacol + 4.4 mM de H_2O_2 y finalmente se cuantificó la variación de absorbancia a 470 nm. Con las pendientes de las curvas de control cinético se determinó la actividad volumétrica y se construyó una tabla de purificación.

Figura 16. Metodología para la determinación de la actividad enzimática.



Para determinar la actividad volumétrica se tuvo en cuenta la ecuación [4] que se presenta a continuación:

$$m \frac{10^3}{5200} \frac{V_t}{V_{ext}} \cdot FD = U/mL \quad [4]$$

Donde m es la pendiente obtenida en el UV-VIS a 470 nm, V_T es el volumen total de la solución, V_{ext} corresponde al volumen del extracto diluido (1:10), $5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del tetraguayacol y FD el factor de dilución. Cabe mencionar que antes de introducir la celda dentro del equipo UV-Vis, esta se agitó fuertemente durante 5 segundos.

La actividad enzimática registrada para cada muestra, se presenta en unidades (U). Una unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto. Se utiliza también en combinación con otras unidades (U/mg o U/mL) para señalar, respectivamente, la actividad enzimática específica o la concentración de actividad enzimática.

3.3 MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS

Los electrodos serigrafados de grafeno (DRP-110GPH) fueron obtenidos de DropSens (Oviedo, España).

Figura 17. Electrodos DRP- 110GPH DropSens.



Se tomaron 10 μL del extracto enzimático y se depositaron sobre la superficie del electrodo de trabajo, el electrodo modificado se dejó en incubación a 4°C durante 12 horas. Posteriormente la superficie de los electrodos fue lavada suavemente con solución tampón de fosfatos pH 8.0 para eliminar la enzima que no fue adsorbida.

3.4 CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Para el registro de las mediciones electroquímicas se utilizó el equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT, los datos se procesaron mediante el software NOVA (NOVA 1.10.1.9 software for Autolab instruments) y el montaje de medición se dispuso como se aprecia en la figura 18, el electrodo permaneció en constante contacto con la solución electrolítica mientras transcurrieron las respectivas mediciones.

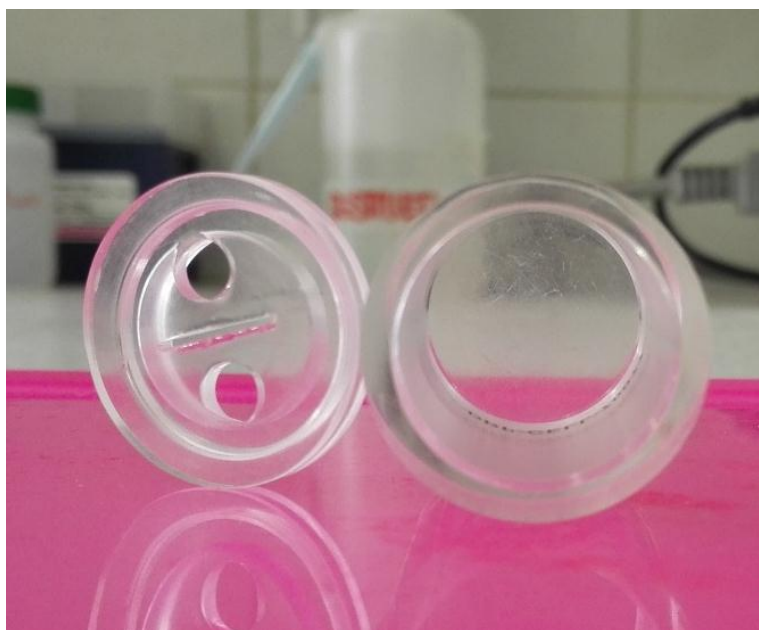
Figura 18. Montaje experimental, equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT.



3.4.1 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica usando ferricianuro de potasio como electrolito. Se utilizó Ferricianuro de potasio 10mM $K_3[Fe(CN)_6]$ con 0,1 M KCl como electrolitos en la caracterización electroquímica de los electrodos, la razón por la cual se usaron estos electrolitos es en primer lugar debido a la claridad de los voltamperogramas cíclicos (VCs) para la determinación del proceso redox del $Fe^{+2/+3}$ del ferricianuro.

Se tomaron 7,5 mL de 10mM $K_3[Fe(CN)_6]$ con 0,1 M KCl y se depositaron en la celda de reacción (celda acrílica figura 19) en la cual se sumergieron uno a uno los electrodos. Los VCs se registraron a una velocidad de 100 mVs^{-1} en un rango de potencial desde 0.6 hasta -0.6 V.

Figura 19. Celda de acrílica empleada en los ensayos experimentales.



3.4.2 Reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno. La caracterización cualitativa de la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 se hizo por VC. Para ello se tomaron VCs de electrodos previamente modificados en una solución buffer de fosfatos (PBS) 10 mM pH 8.0 con 0.1 M KCl y diferentes

concentraciones de H_2O_2 . Se utilizó una velocidad de barrido 100 mVs^{-1} y un rango de potencial desde $1,0 \text{ V}$ hasta $-1,0 \text{ V}$. La finalidad de usar esta técnica fue determinar el potencial de reducción correspondiente al H_2O_2 dentro del sistema, para lo cual se hizo un control tanto del electrodo sin modificar y el electrodo modificado a diferentes concentraciones de H_2O_2 .

El PBS empleado fue desgasificado mediante ultrasonicación de punta para eliminar gases y evitar interferencias debidas a la reducción de oxígeno molecular presente en el sistema.

3.4.3 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del H_2O_2 . Con el fin de estudiar la reversibilidad electroquímica del proceso redox que involucra la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 por la enzima PPG y los procesos de transporte de H_2O_2 a la superficie del electrodo, se registraron VCs a diferentes velocidades de barrido, en PBS 10 mM pH 8 con $0,1 \text{ M}$ KCl en presencia de 3 mM H_2O_2 en un intervalo de velocidades desde 50 mVs^{-1} hasta 600 mVs^{-1} .

3.4.4 Influencia del pH. Debido a que la actividad biológica de las peroxidasas es dependiente del pH, para determinar la dependencia de la respuesta del electrodo modificado con PPG se registraron VCs en diferentes soluciones buffer en presencia de H_2O_2 , velocidad de barrido 100 mVs^{-1} y ventana potencial desde $1,0 \text{ V}$ hasta $-1,0 \text{ V}$.

Soluciones buffer utilizadas: 10 mM ácido acético/acetato de sodio (pH $5,0$), 10 mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH $6,0$, $7,0$ y $8,0$) y 10 mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH $10,0$). Cada solución contenía H_2O_2 en concentración de $1,0 \text{ mM}$. Todas las soluciones fueron previamente desgasificadas mediante ultrasonicación de punta.

3.5 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS

3.5.1 Cronoamperometría. Los ensayos de cronoamperometría consistieron en medir la intensidad de corriente en función del tiempo a un potencial fijo seleccionado de acuerdo a los resultados de VC. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno usadas en los ensayos estaban en el rango de 0,1 – 3.5 mM, todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Para tal fin, en la celda de reacción se depositaron 7.5 mL de PBS 10 mM pH 8.0 con 0.1 M KCl, con agitación constante se adicionaron volúmenes diferentes de H₂O₂ cada 60 segundos, aumentando con cada adición 0,5 mM la concentración del analito. Antes de la primera adición de H₂O₂ se dejó estabilizar la corriente hasta alcanzar la línea base correspondiente a la concentración cero de H₂O₂, se hicieron controles de electrodo sin modificar y electrodos modificados.

A partir de los resultados de cronoamperometría, se construyeron curvas de calibración de corriente contra concentración de H₂O₂, de las cuales se determinaron los siguientes parámetros analíticos: rango lineal del método, límite de detección y sensibilidad.

3.5.2 Determinación del rango lineal. El rango lineal se refiere al intervalo de concentraciones sobre las cuales un analito puede ser determinado utilizando una curva de calibración lineal³⁹. La determinación del rango lineal para los electrodos modificados se realizó mediante la curva de respuesta de corriente contra diferentes concentraciones de H₂O₂ de los ensayos de cronoamperometría descritos en 3.5.1.

Las gráficas proporcionaron típicas ecuaciones de regresión lineal para curvas de calibración como se describe en la ecuación [5]

$$i(mA) = m * C \left(\frac{\mu mol}{L} \right) + b(\mu A) \quad [5]$$

Donde i representa la corriente respuesta en mA, m la pendiente de la gráfica; C la concentración de H_2O_2 en mM y b el intercepto con el eje y .

3.5.3 Sensibilidad. La determinación de la sensibilidad (medida de la capacidad del electrodo para diferenciar pequeñas variaciones en la concentración de H_2O_2) se determinó mediante la curva de calibración construida a partir de los resultados de cronoamperometría en 3.5.1. De acuerdo a la ecuación 7, se tomó la pendiente como valor de sensibilidad de calibrado según lo encontrado en Feng y col⁴⁰.

3.5.4 Límite de detección. La determinación de la concentración más baja de H_2O_2 que el electrodo modificado fue capaz de detectar a un cierto nivel de confianza, se determinó mediante la ecuación [6]

$$LD = \frac{k \cdot s_b}{m} \quad [6]$$

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

3.6 IMPEDANCIA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS Y SIN MODIFICAR

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

Usualmente esta técnica se usa para construir un circuito eléctrico equivalente al comportamiento electroquímico de la interfase electrodo/solución. En dicho circuito

elementos como la doble capa eléctrica, resistencia del electrolito, procesos farádicos y capacitivos, homogeneidad y alteraciones de la superficie, son representados por elementos eléctricos como resistencias, impedancias, conductancia y capacitores entre otros. En el presente trabajo no se pudo encontrar un circuito eléctrico equivalente de fácil análisis, así que se usara el diagrama de Nyquist en forma cualitativa para describir algunos de los cambios que presenta la superficie cuando se varía desde el electrodo sin modificar, al electrodo modificado con PPG.

3.7 SELECTIVIDAD DEL ELECTRODO MODIFICADO EN PRESENCIA DE SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se seleccionaron algunas especies posiblemente interferentes como: glucosa, ácido cítrico y etanol, con el fin de evaluar la selectividad del electrodo modificado con PPG.

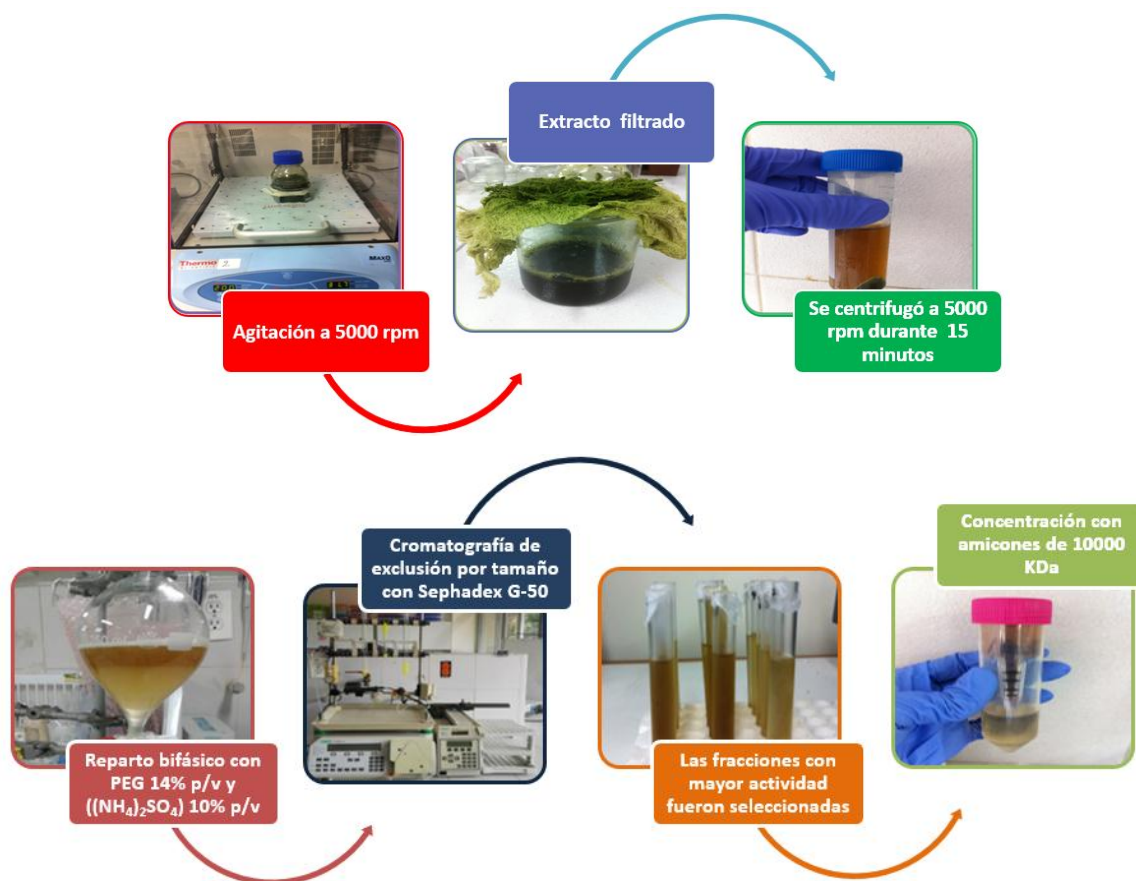
Para tal propósito, en la celda de reacción se depositaron 7.5 mL de PBS 10mM pH 8.0 con KCl 0.1M bajo agitación. Se dejó estabilizar la corriente hasta alcanzar una línea base y luego se adicionaron 280 μ L de H₂O₂ 4 mM. Una vez generada y estabilizada la señal de reducción se añadieron aproximadamente cada 80 segundos 280 μ L a una concentración de 40 mM de cada una de las posibles sustancias interferentes.

4. ANÁLISIS Y RESULTADOS

4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PEROXIDASA DE PASTO GUINEA.

Para el desarrollo de la etapa inicial de este proyecto, se realizó la recolección de pasto guinea del páramo de Berlín. Cabe resaltar que el pasto guinea recolectado fue identificado por un botánico de la Universidad Industrial de Santander. Al pasto recolectado se le realizó una extracción enzimática de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 3.2 y cuyo resumen se presenta en la figura 20.

Figura 20. Metodología de extracción y purificación parcial de la peroxidasa de pasto guinea (PPG).



Para efectos de análisis, el proceso de extracción y purificación parcial de la PPG se resume en la tabla 4. Los gramos de proteína se calcularon mediante el método de Bradford descrito en el apartado 3.2.5. La actividad volumétrica (U/mL) se calculó a partir de la pendiente de la recta correspondiente al control cinético de la reacción con guayacol como se detalla en la ecuación [6]. La actividad total (U) se calculó multiplicando la actividad volumétrica y el volumen de cada fracción, la actividad específica (U/mg) se determinó por el cociente entre la actividad total y la cantidad de proteínas de cada fracción. Finalmente, el factor de purificación se determinó por el cociente de la actividad específica de la fracción y la actividad específica inicial.

Tabla 4. Etapas de purificación de la peroxidasa de pasto guinea.

PROCEDIMIENTO	Volumen (mL)	Proteínas (mg)	Actividad volumétrica (U/m L)	Actividad total (U)	Actividad Especifica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracción	116.0	36,5	192	22269	610,5	1.00	100.0
Eliminación de pigmentos	64.0	21,6	223	14296	663,4	1,08	64.2
Cromatografía exclusión de tamaño	22.0	11,3	359	7891	698,4	1,14	35,4
Concentración amicones	10,5	7,48	516	5420	724,7	1,19	24,3

Este extracto enzimático fue utilizado para la modificación de superficies conductoras (electrodos), con el fin de desarrollar un biosensor para detección de peróxido de hidrógeno.

4.2 MODIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.

El extracto enzimático parcialmente purificado se inmovilizó por adsorción física sobre la superficie del electrodo como se describió en el apartado 3.3. La modificación de la superficie de los electrodos se verificó utilizando VC.

La figura 21 presenta el comportamiento electroquímico de una solución 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ en 0.1 M KCl para un electrodo sin modificar y otro electrodo modificado con PPG. El ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$ fue seleccionado por ser un estándar monoelectrónico reversible ampliamente estudiado debido a que intercambia reversiblemente un electrón entre sus especies y la superficie del electrodo. Los VCs de la figura 21 presentan dos picos electroquímicos, el primero a un potencial de -0.027 V vs Ag/AgCl (pico I_c), correspondiente a la reducción electroquímica del ión $Fe(CN)_6^{3-}$ (ecuación 7) y el segundo a un potencial 0.230 V vs Ag/AgCl (pico I_a), correspondiente a la oxidación del ion $Fe(CN)_6^{4-}$ atrapados en la capa de difusión. En esta misma figura puede apreciarse un aumento de la corriente para el electrodo modificado con respecto al electrodo sin modificar, lo que se traduce en que la superficie modificada facilita la transferencia de electrones entre la superficie y la especie redox en solución en este caso el par redox $Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}$ y por ende una mayor corriente.

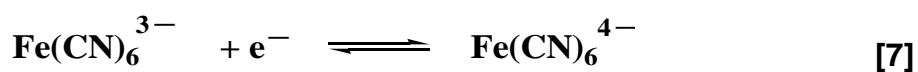
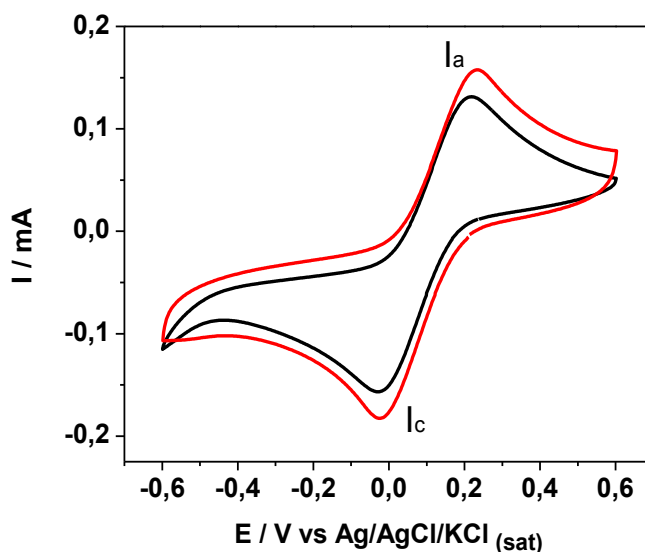


Figura 21. Comportamiento electroquímico de una solución $K_3Fe(CN)_6$ 10 mM en KCl 0.1 M en agua, electrodo sin modificar (negro) electrodo modificado con PPG (rojo). (velocidad de barrido 100 mV s^{-1}).



En la figura 21 se presentan picos bien definidos y limitados por difusión con valores de delta de potencial (ΔE) de 239 mV y 257 mV para el electrodo sin modificar y el electrodo modificado respectivamente. El valor absoluto de la relación de corriente de los picos red/ox (I_{red}/I_{ox}) fue 1.19 y 1.16 para el electrodo sin modificar y el electrodo modificado respectivamente. Este último factor indica que el número de especies reducidas fue aproximadamente igual a la cantidad de especies oxidadas sobre la superficie de los diferentes electrodos. Estos valores se registraron en la tabla 5.

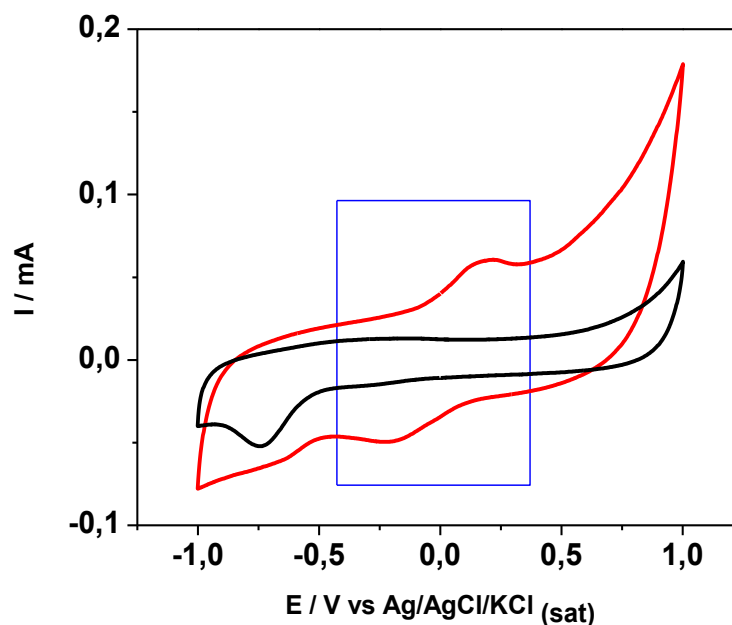
Tabla 5. Diferencia de potencial y relación de corriente entre los picos de oxidación y reducción para los electrodos estudiados.

Electrodo	I_{ox} (mA)	I_{red} (mA)	I_{red}/I_{ox}	E_{ox}	E_{red}	ΔE
Sin modificar	0.131	-0.157	1.19	214	-25	239
Modificado	0.158	-0.183	1.16	233	-24	257

El transporte de las especies reaccionantes hacia la superficie del electrodo puede efectuarse de tres modos: difusión, migración y convección. En electroanálisis, la forma de transporte de migración se considera indeseable, razón por la cual se añadió un exceso de KCl, especie no electroactiva iónica que minimiza su efecto⁴¹. Los experimentos se realizaron sin agitación, eliminando así el transporte por convección. Así, el proceso fue controlado por difusión mediante el movimiento de las especies redox bajo la influencia de un gradiente de concentración.

Una vez modificado el electrodo con PPG se tomó el VC en 10 mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M como se observa en la figura 22, lo que permitió confirmar la adsorción de la enzima sobre la superficie del electrodo. Se presenta un comportamiento redox reversible el cual se atribuye al hierro que constituye el grupo hemo de la peroxidasa, -0.206 V y 0.161 V para $Fe(CN)_6^{2-}$ (reducción) y $Fe(CN)_6^{3-}$ (oxidación) respectivamente.

Figura 22. VCs electrodo sin modificar (negro) y electrodo modificado con PPG (rojo). Solución 10 mM PBS pH 8.0 KCl 0.1 M (velocidad de barrido 100 mV s⁻¹).

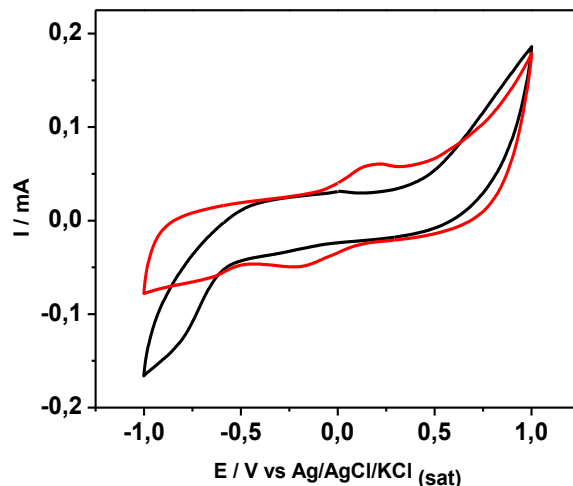


4.3 REDUCCIÓN BIOELECTROCATALITICA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

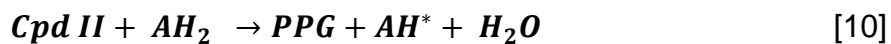
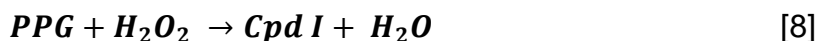
La respuesta del electrodo modificado con PPG hacia el H_2O_2 se estudió usando VC para estudiar las corrientes catódicas y confirmar la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 por la PPG. Este procedimiento se realizó en 10 mM PBS (pH 8.0) con 0.1 M KCl en ausencia y presencia de 3 mM H_2O_2 utilizando un rango potencial desde -1.0 hasta 1.0 V y velocidad de barrido 100 mV s⁻¹.

Los resultados de este análisis arrojaron una medida cualitativa de la capacidad de los electrodos hacia la detección de H_2O_2 , dando una idea del potencial al que se reduce el H_2O_2 sobre la superficie del electrodo. La figura 23 muestra los VCs del electrodo modificado en ausencia y presencia de 3 mM H_2O_2 . Se demostró que la presencia de H_2O_2 genera un aumento en la corriente catódica, específicamente un máximo de corriente en el potencial de -1.0.

Figura 23. VC electrodo modificado con PPG en 10 mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M en ausencia (rojo) y presencia (negro) de 3 mM H₂O₂ (velocidad de barrido 100 mV s⁻¹).

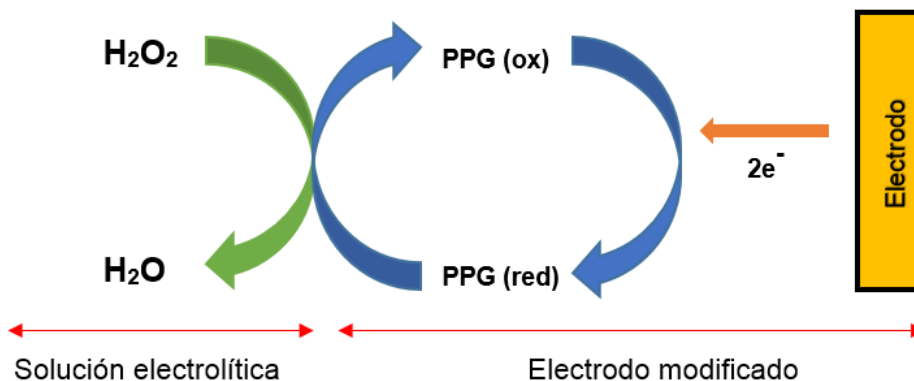


El proceso de reacción se muestra en la figura 24 y en las ecuaciones 08-10, este comportamiento ha sido observado por diferentes autores. La PPG inmovilizada sobre la superficie electródica reacciona con el H₂O₂ para formar un primer intermediario (Compuesto I) que es una forma oxidada de dos-equivalentes que contiene un grupo hemo oxiferril (Fe⁴⁺=O) y un catión radical porfirínico π. El radical porfirínico sustrae un electrón del electrodo para formar un segundo intermediario (Compuesto II), que luego se reduce de nuevo a la PPG nativa mediante la aceptación de un electrón desde el electrodo⁴².



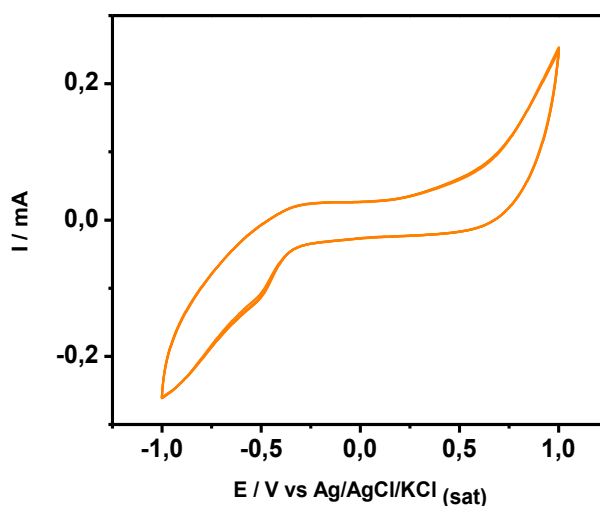
Donde PPG es la enzima, Cpd I y Cpd II son los compuestos I y II correspondientes a intermediarios oxidados de la peroxidasa, y AH₂ y AH* son el sustrato donante de electrones y el producto radical de su oxidación respectivamente.

Figura 24. Posible mecanismo para la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 por la PPG para el electrodo modificado con PPG.



La estabilidad del electrodo modificado con PPG se comprobó utilizando VC. En la figura 25 se enseña el VC para el electrodo modificado con PPG tomado en 10 mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M en presencia de H_2O_2 4 mM, velocidad de barrido 100 mV s^{-1} y sometido a 10 ciclos consecutivos. El sistema se estabiliza en el segundo ciclo manteniéndose constante hasta terminar el ciclo número 10; en este caso particular. Este resultado confirma que la enzima no se desorbe de la superficie del electrodo, por lo menos no hasta el ciclo número 10.

Figura 25. VC de electrodo modificado con PPG en 10 mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M y 4 mM H_2O_2 (velocidad de barrido 100 mV s^{-1}) Número de ciclos 10.

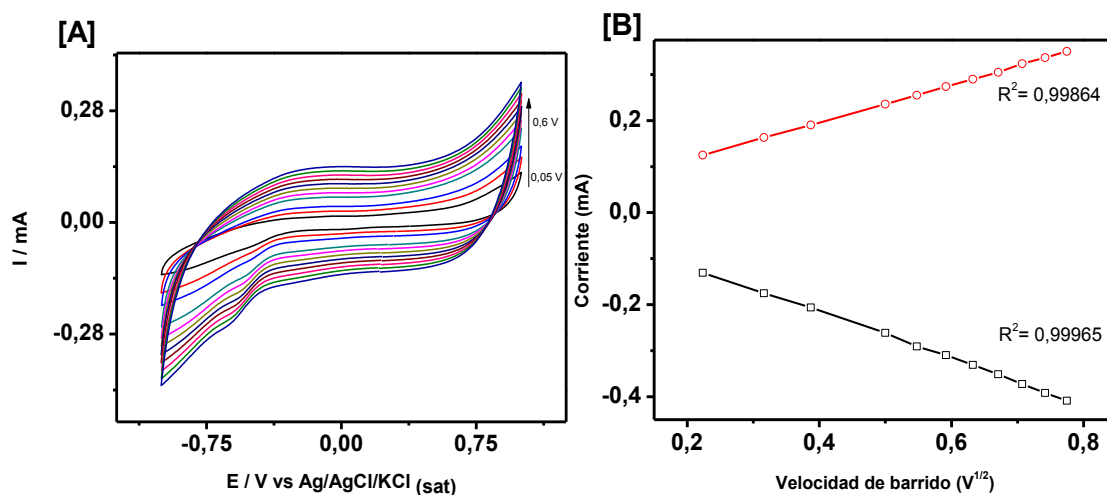


4.4 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO SOBRE LA RESPUESTA BIOELECTROCATALÍTICA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La reversibilidad electroquímica del electrodo modificado con PPG para la detección de H_2O_2 se estudió mediante VC empleando diferentes velocidades de barrido como se observa en la figura 26[A].

Con el incremento de la velocidad de barrido desde 50 a 600 mV s^{-1} , la corriente del pico de reducción del H_2O_2 incremento de manera directamente proporcional como se observa en la figura 26[B]. Así, se concluye que la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 es un proceso controlado superficialmente tal como se reporta por Wang y col¹⁶. Es decir, a mayor velocidad de barrido las especies reducidas se encuentran más cercanas a la superficie del electrodo.

Figura 26. A) VC de electrodo modificado con PPG en solución 10mM PBS (pH 8.0) KCl 0.1 M , 1 mM H_2O_2 a diferentes velocidades de barrido lineal, desde 50 hasta 600 mV s^{-1} . B) Relación lineal entre corrientes anódicas (rojo) y catódicas (negro) contra raíz cuadrada de velocidad de barrido lineal.



Este comportamiento ha sido observado en otros trabajos como el de Shihong. C y col, quienes reportaron procesos reversibles en el rango de $10\text{-}250 \text{ mV s}^{-1}$ para

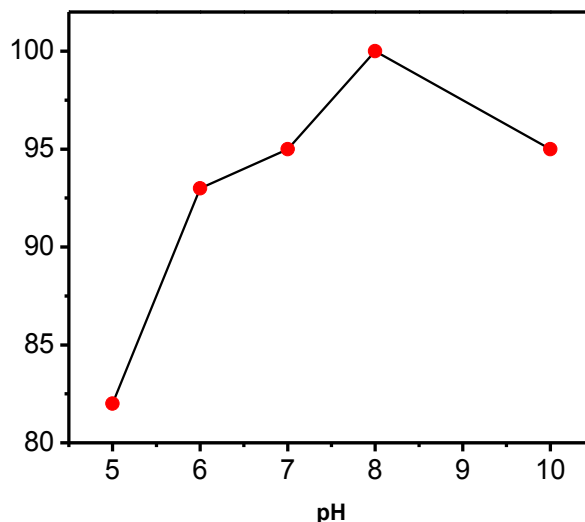
electrodos de carbono modificados con nanotubos de carbono, nanoesferas de quitosano organosilica@chitosan y HRP para la detección de H_2O_2 ⁴³. Otros trabajos como el de Xiao. B y col reportaron procesos reversibles en el rango 25-250 mV s^{-1} para electrodos de carbono modificados con quitosano y nanopartículas de oro fijadas con HRP para la detección de H_2O_2 ⁴².

4.5 INFLUENCIA DE pH

El pH es una propiedad que influye en la conformación de las enzimas y sus propiedades catalíticas. Éste estudio se llevó a cabo para determinar la dependencia de la respuesta del electrodo modificado con PPG a diferentes valores de pH. Las soluciones buffer empleadas en este estudio fueron las detalladas en el apartado 3.4.4.

Para tal fin, se registraron VCs en soluciones buffer desde pH 5 hasta pH 10 en presencia de 4 mM de H_2O_2 , velocidad de barrido 100 mVs^{-1} . La figura 27 representa la dependencia de la respuesta del biosensor en función del pH. A pHs ácidos las cargas de los aminoácidos de la proteína aumentan haciendo que se pierda su estructura terciaria (desnaturalización) y por ende su actividad enzimática, razón por la cual pH 5 y 6 presentan la menor respuesta para la detección de H_2O_2 . Con este análisis se concluye que el pH óptimo para la afinidad con el sustrato y por ende una mejor respuesta del biosensor es pH 8.0.

Figura 27. Dependencia de la corriente relativa (%) contra el pH



Como se ha visto, el pH influye en la conformación de las enzimas y su actividad; esta dependencia al pH a su vez puede variar según la fuente de la enzima; así, la construcción de electrodos enzimáticos requiere el estudio del efecto del pH sobre la respuesta de biosensores. En la literatura se pueden encontrar muchos ejemplos al respecto, tal como se reporta en Shu-Xia y col¹⁸. donde se usa una matrix sol-gel de tetraetilo de silicona para la inmovilización de enzima HRP sobre nanotubos de carbono multicapa en electrodos de carbón vítreo. En este estudio, la respuesta del biosensor al pH fue estudiada entre 5.8 y 8.5. La respuesta de corriente incrementó desde pH 5.8 hasta 7.0 mostrando un máximo en pH 7.0. La respuesta de corriente decreció desde pH 7.0 hasta 8.5. Este comportamiento se asoció a la dependencia de la metamorfosis de la proteína al pH. A pH altos y bajos la actividad de la HRP decrecería debido a la desnaturalización de la enzima asociada al decrecimiento de la señal de corriente. Análisis similares se pueden encontrar en Luo y col⁴⁴ y Wang y col¹⁶.

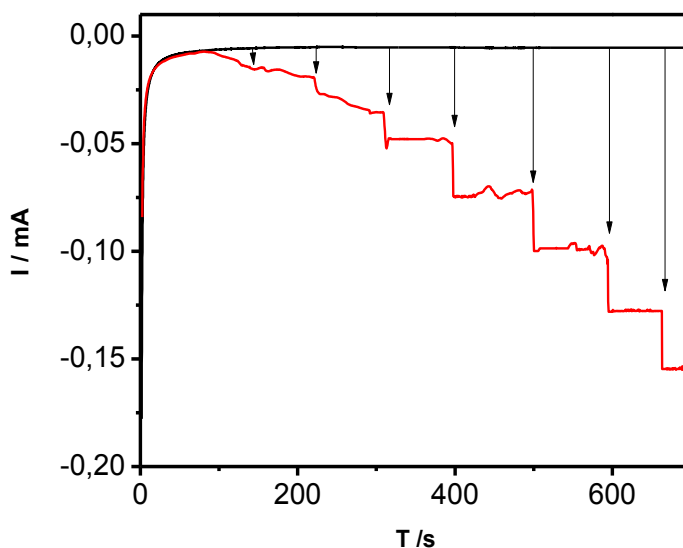
4.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS

Respuesta del biosensor a adiciones sucesivas de H₂O₂ por cronoamperometría. Los experimentos de cronoamperometría se emplearon

para evaluar la sensibilidad y la linealidad de la respuesta del electrodo modificado con PPG hacia el H_2O_2 . El potencial aplicado para esta técnica fue -1.0 V . Cada experimento se realizó bajo agitación suave con ayuda de un agitador magnético, una vez estabilizada la señal de corriente (aproximadamente 4 min), se empezó a medir la corriente para cada concentración de H_2O_2 agregado a la celda electroquímica. Se procedió tal como se describió en el apartado 3.5.1.

La figura 28 muestra el resultado de la cronoamperometría de los electrodos sin modificar y electrodos modificados con PPG para sucesivas adiciones de H_2O_2 . Cada flecha representa la adición de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mM H_2O_2 respectivamente. Para hacer los experimentos reproducibles las adiciones de H_2O_2 se realizaron aproximadamente cada 100 segundos aumentando en 0.5 mM la concentración de H_2O_2 .

Figura 28. Respuesta corriente (mA) contra tiempo (s) para la adición de H_2O_2 a un potencial de -1.0 V , electrodo sin modificar (negro) y electrodo modificado con PPG (rojo).



Cada inyección de H_2O_2 dio lugar a un incremento en la intensidad de corriente como se observa en la figura 28, lo que permitió la construcción de curvas de

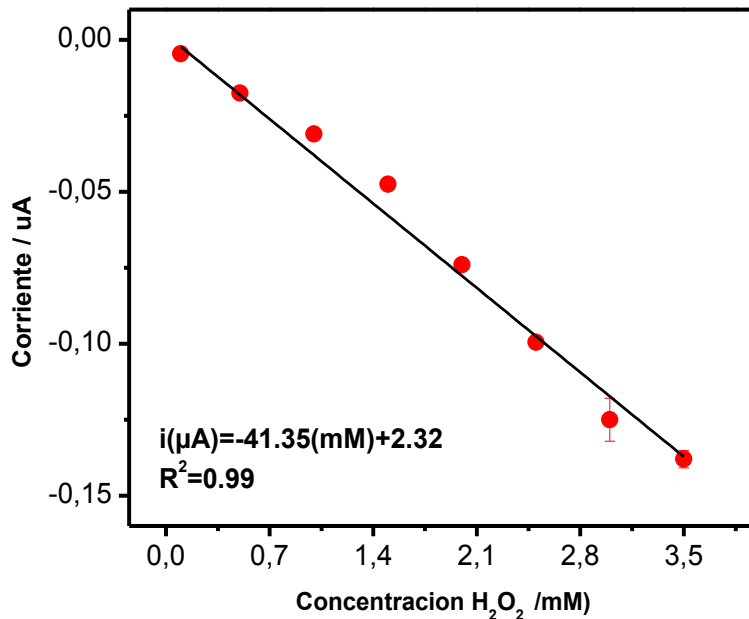
calibración con comportamiento lineal como se presenta en la figura 29. De acuerdo a la curva de calibración, existe una relación lineal entre la corriente y la concentración de H_2O_2 en el rango de 0,1 mM hasta 3.5 mM. La ecuación 11 se ajusta por regresión lineal de los datos

$$i(\mu A) = -41.35 * (H_2O_2 \text{ mM}) + 2.32 \quad [11]$$

$$r^2 = 0.9886 \quad [12]$$

La ecuación 12 presenta un coeficiente de correlación r^2 de 0.9886. La sensibilidad del método se define como el valor absoluto de la pendiente de la recta, es decir 41.65 para los electrodos modificados con PPG en un rango de 0.1-3.5 mM.

Figura 29. Curva de calibración obtenida con los datos de los ensayos de cronoamperometría.



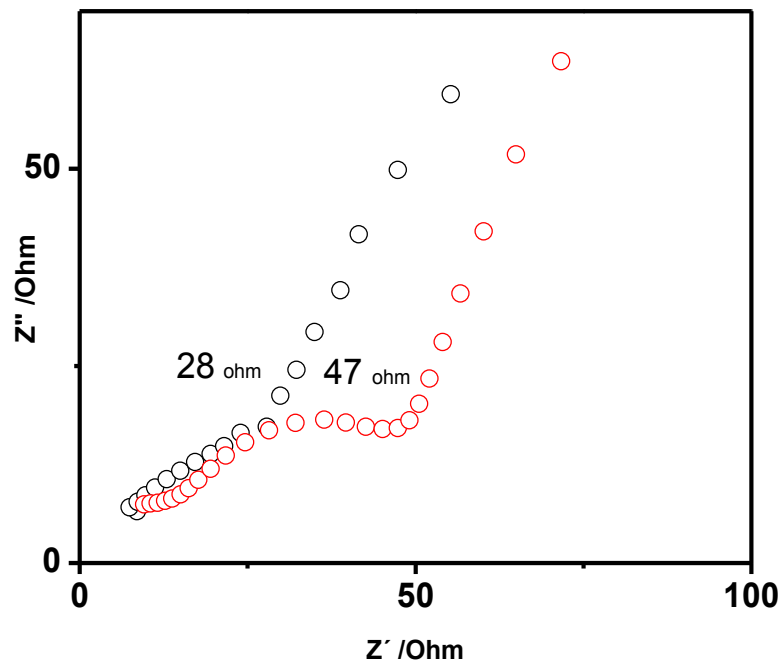
El límite de detección (LD) ecuación 6, es la menor concentración de peróxido cuya señal puede ser distinguida de la del ruido. Para esta técnica analítica el límite de detección fue de 100 μM .

4.7 IMPEDANCIA DE ELECTRODOS MODIFICADOS

La figura 30, muestra el diagrama de Nyquist para los electrodos sin modificar y modificados con PPG, estos diagramas corresponden a los experimentos de espectroscopia de impedancia (EIS, por sus siglas en ingles). Para realizar las medidas de impedancia, los electrodos fueron colocados en contacto con una solución 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ KCl 0.1 M y en el potenciostato fue escogido el modo de impedancia, y se asignó el potencial formal de la pareja redox. El diagrama de Nyquist consiste de una representación entre la impedancia real Z'' en función de la impedancia imaginaria Z' , En esta clase de gráficos se pueden apreciar dos partes, la primera correspondiente a un semicírculo que muestra el comportamiento capacitivo del electrodo y la segunda que corresponde a un comportamiento lineal, que corresponde al proceso faradaico de transferencia de carga.

La variación del radio de los semicírculos presentados en la figura 30, representan los cambios en la resistencia a la transferencia de carga. En este caso particular el electrodo sin modificar presenta una resistencia a la transferencia de carga de 28Ω , y la modificación del electrodo con PPG presenta un aumento a la transferencia de carga 47Ω . El aumento presentado en el electrodo modificado con PPG indica una mayor impedancia en la interfase, lo que se traduce en que la conductividad disminuye significativamente en presencia de PPG. Con respecto a la parte lineal Z' , se observa que el comportamiento es similar en ambas gráficas y es que este comportamiento es reflejo del comportamiento difusivo de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ hacia la superficie del electrodo. Es decir, del proceso de transferencia farádico que se da entre las superficies y el $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, debe ser muy similar.

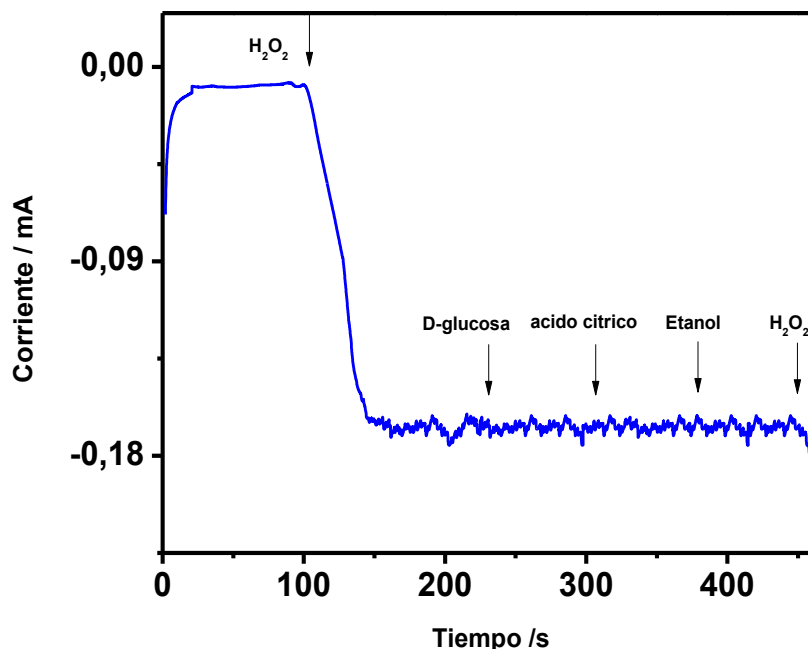
Figura 30. Espectroscopia de impedancia electrodos sin modificar (negro) y modificados con PPG (rojo).



4.8 SELECTIVIDAD DEL ELECTRODO MODIFICADO EN PRESENCIA DE SUSTANCIAS INTERFERENTES

La especificidad del electrodo modificado con PPG fue evaluada en la presencia de: glucosa, ácido cítrico y etanol. En la figura 31 se muestra la influencia de estos compuestos en la respuesta de corriente por parte del electrodo modificado con PPG, los resultados indican que el electrodo tiene una excelente especificidad hacia el H_2O_2 .

Figura 31. Perfil amperométrico (corriente contra tiempo) del electrodo modificado con PPG en solución 10 mM PBS (pH 8.0) 0.1 M KCl, respuesta en presencia de H₂O₂, glucosa, ácido cítrico y etanol.



El biosensor desarrollado en este trabajo fue comparado con datos de la literatura reciente, en la cual la determinación de H₂O₂ se realiza con diferentes tipos de biosensor, como puede ser visto en la tabla 6. En la misma se aprecian las características de estos biosensores amperométricos, en la tabla se incluye el tipo de la enzima empleada, naturaleza del electrodo, sistema de inmovilización empleado, potencial para la determinación de H₂O₂, rango lineal y límite de detección.

El biosensor desarrollado en este trabajo mostró que puede ser usado en la determinación cuantitativa de H₂O₂ en un rango lineal de 1×10^{-4} M a 3.5×10^{-3} M. Sin embargo, tal como se muestra en la tabla 6, existen biosensores con un mayor rango lineal, incluso en varias órdenes de magnitud, como el reportado por Wang y col¹⁶, biosensores capaces de detectar concentraciones de peróxido de hidrógeno en el orden de picomolar.

No obstante, el biosensor presentado en este trabajo es útil para detectar H₂O₂ a concentraciones superiores a las reportadas por Farzana y col⁴⁵. El biosensor presentado en este trabajo, cubre el intervalo superior del rango lineal del reporte mencionado anteriormente: 1.5x10⁻³ M, lo cual es una ventaja al momento de analizar muestras con concentraciones superiores en tiempo real y sin tratamiento.

Cabe resaltar que el biosensor desarrollado en este trabajo presentó el potencial de reducción de H₂O₂ más negativo entre los biosensores de comparación. Por otro lado, como se puede observar en la tabla 6 y demás reportes de la literatura mencionados a lo largo de este trabajo, la mayoría de trabajos de electrodos enzimáticos usan la enzima HRP como elemento de reconocimiento molecular para la detección de peróxido de hidrógeno. Cabe destacar que este trabajo hace un aporte novedoso mediante el empleo de la enzima extraída de pasto guinea (*Panicum maximum*), especie presente en nuestra región, considerada mala hierba y sin valor agregado ni utilidad más que el forraje del ganado. No se han encontrado aplicaciones similares en literatura para enzimas peroxidasa, donde la fuente sea de este tipo, y al ser una fuente fácilmente accesible le da un plus al presente trabajo.

Además, el presente trabajo concreta la importancia de estudiar la biodiversidad presente en nuestro país, a fin de descubrir nuevas fuentes de enzimas que podrían ser potenciales herramientas de bioconocimiento para la fabricación de nuevos electrodos enzimáticos.

Tabla 6. Diferentes tipos de biosensores de peróxido de hidrógeno.

Enzima/ electrodo	Forma de inmovilización	Detección Amperométrica	Características analíticas	Referencia
PPG/SPE Grafeno	Inmovilización de PPG en electrodos serigrafiados de grafeno	(E= -1 V vs Ag)	Rango lineal: 1x10 ⁻⁴ M – 3.5x10 ⁻³ M LD:1.04x10 ⁻⁴ M	Este trabajo
HRP/AuE	Asociación de coloides de Au con monocapas de cisteamina	(E= -0.3 V)	Rango lineal: 1.4x10 ⁻⁶ M–	(Yi, Huang- Xian, &

	sobre la superficie de electrodos de oro. HRP inmovilizada sobre coloides de oro.		2.8×10^{-3} M LD: 5.8×10^{-7} M	Hong-Yuan, 2000)
HRP/CPE	Inmovilización de HRP usando una matrix sol-gel hibrida con quitosano en electrodos de pasta de carbono.	(E= -0.1 V vs. SCE.)	Rango lineal: 2.5×10^{-4} M- 3.4×10^{-3} M LD: 3×10^{-6} M	(Miao & Tan, 2001)
HRP/GCE	Incorporación covalente de CNTs y nAu sobre recubrimiento poli(tionina) depositados por electropolimerización sobre GCE	(E= -0.4 V vs. SCE)	Rango lineal: 5.0×10^{-6} M – 7.0×10^{-3} M LD: 3.0×10^{-6} M	(Feng, Wang, Zhang, Yan, Shen, & Yu, 2007)
HRP/GCE	Electropolimerización p-ABSA sobre GCE mediante VC. Adsorción de tionina y ensamble de capas de oro para la inmovilización de HRP	(E= -0.45 V)	Rango lineal: 2.6×10^{-6} M – 8.8×10^{-3} M LD: 6.4×10^{-7} M	(Gao, Yuan, Chai, Chen, Cao, & Tang, 2007)
HRP/AuE	Adsorción de HRP en CNT funcionalizados sobre electrodos de oro usando L-cisteína.	(E= -0.35 V)	Rango lineal: 1.0×10^{-12} M – 1.0×10^{-11} M LD: 2.1×10^{-13} M	(Wang, y otros, 2012)
HRP/ITOE	Uso de nanopartículas de oro dispersas en un film de quitosano y dentrímeros para la inmovilización de HRP en electrodos ITO	(E= -0.28 V vs NCE)	Rango lineal: 1.65×10^{-4} M – 1.5625×10^{-3} M LD: 2.0×10^{-4} M	(Farzana, Ganesh, & Berchmans, 2013)

Abreviaturas: AuE: electrodo de oro; CNT: nanotubos de carbono; SBP: peroxidasa de soya; VC: voltamperometría cíclica; GCE: electrodo de carbón vítreo; HRP: peroxidasa de rábano picante; LD: límite de detección; p-ABSA: ácido sulfónico p-aminobenceno; SCE: electrodo saturado calomel; PEGDGE: polietileno glicol diglicidil éter; CPE: electrodo de pasta de carbono; ITOE: electrodo de óxido de indio estaño

5. CONCLUSIONES

- Se modificaron electrodos serigrafiados DRP-110GPH mediante la adsorción física de peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) para la detección de peróxido de hidrógeno.
- La extracción de la peroxidasa proveniente del pasto guinea recolectado del páramo Berlín presento una actividad específica de 724.7 U/mg y rendimiento 24.3 %, cercano al reportado por Bautista y col.
- La inmovilización de la peroxidasa sobre los electrodos modificados se confirmó mediante voltametría cíclica; donde se observaron las señales redox del grupo hemo de la peroxidasa en -0.206 V y 0.161 V para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ (reducción) y $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (oxidación) respectivamente.
- La voltamperometría de ferricianuro de potasio en los electrodos sin modificar y modificados con PPG confirman que la inmovilización de enzima aumenta la conductividad eléctrica y se mejoran las propiedades electroquímicas del electrodo.
- La reducción bioelectrocatalítica de peróxido de hidrógeno se presentó como un aumento en la intensidad de corriente potencial -1.0 V vs Ag/AgCl/KCl_(sat).
- El estudio mediante voltamperometría cíclica del efecto de la variación de velocidad de barrido, demostró que la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno es un proceso reversible controlado en la superficie.
- Los estudios por voltamperometría cíclica para los electrodos modificados con PPG indicaron que la respuesta para la detección de peróxido de hidrógeno es

estable a partir del ciclo 2 y que aún para el ciclo 10 el biosensor es estable en su respuesta.

- El pH óptimo para el electrodo modificado con PPG fue pH 8.0, a pHs ácidos la respuesta disminuye notablemente debido a la desnaturalización de la enzima.
- El método analítico presentó un rango lineal para la detección de peróxido de hidrógeno en el rango 100-3500 μM , con una sensibilidad de 41.35 y un límite de detección de 150 μM .
- El electrodo modificado con PPG demostró ser específico frente al H_2O_2 en presencia de sustancias como glucosa, ácido cítrico y etanol.

6. RECOMENDACIONES

- Aunque la reducción del oxígeno molecular no interfiere con la señal de la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno; se recomienda para experimentos a futuro usar un flujo de Argón o Nitrógeno para burbujear la solución, además de generar una atmosfera libre de oxígeno durante los ensayos electroquímicos.
- Los espectros de impedancia suelen ser analizados mediante circuitos eléctricos equivalentes compuestos por componentes como: resistencias (R), capacitancias (C), inductancias (L), entre otros, combinados de tal manera que reproduzcan los espectros de impedancia medidos. Se sugiere recolectar más datos electroquímicos en diferentes experimentos para calcular el circuito equivalente representativo de electrodos modificados y el sistema usado.
- Realizar un estudio de la efectividad del electrodo modificado con PPG en la detección de peróxido de hidrógeno en muestras reales.

REFERENCIAS

1. THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A. & WILSON, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* Vol 16, 121–131.
2. WANG, J. (2001). Glucose Biosensors : 40 Years of Advances and Challenges. 983–988.
3. MONOŠÍK, R., STRED'ANSKÝ, M., ŠTURDÍK, E. (2012). Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis. *J. Clin. Lab. Anal.* Vol 26, 22–34.
4. CHATTOPADHYAY, K., MAZUMDAR, S. (2000). Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase : Effect of Temperature and pH. 263–270.
5. VILLAMIZAR, E. N., RÍOS, C., CASTILLO, J. (2016). A Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Immobilization of the Highly Stable Royal Palm Tree Peroxidase (*Roystonea regia*) with Chitosan and Glutaraldehyde on Screen-printed Graphene Electrodes. Vol 60, 135–140.
6. CLEMENT, M., PONTON, A. PERVAIZ, S. (1998). Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. 13–18.
7. WHITTEMORE, E., LOOD, D., WATT, J., COTMAN, C. (1995). Peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. Vol 67, 921-932.

8. OKUDA, S., NISHIYAMA, N., SAITO, H., KATSUKI, H. (1996). Hydrogen peroxide- mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3- hydroxykynurenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 93, 12553–12558.
9. SU, G., WEI, Y. GUO, M. (2011). Direct Colorimetric Detection of Hydrogen Peroxide Using 4-Nitrophenyl Boronic Acid or Its Pinacol Ester. *American Journal of Analytical Chemistry*. Vol 2, 879–884.
10. Methods for the detection of residual concentrations of hydrogen peroxide in advanced oxidation processes. *WateReuse Foundation*.
11. SAKHAROV, I. SAKHAROVA, G., BAUTISTA, G., ROJAS, A. (1999). Peroxidasa de Plantas Tropicales. *Revista Colombiana de química*, Vol 28, 97-106.
12. IKEHATA, K., BUCHANAN, I. D., PICKARD, M. A. SMITH, D. W. (2005). Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Bioresour. Technol.* Vol 96, 1758–1770.
13. ZAMORANO, L., PINA, D., ARELLANO, J., BURSAKOV, S., ZHADAN, A., CALVET, J., SANZ, L., NIELSEN, P., VILLAR, E., ROIG, M., WATANABE, L., POLIKARPOV, I. (2008). Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea regia* peroxidase stability. *Biochimie*, 1737–1749.
14. ZAMORANO, L. BARRERA, S., ARELLANO, J., ZHADAN, B., GALINA G., CUADRADO, N., ROIG, S. (2009). Thermal stability of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree at pH 3. *Int. J. Biol. Macromol.* Vol 44, 326–332.

15. CAI, F., OUYANG, C., DUAN, P., GAO, S., XU, Y., CHEN, F. (2012). Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. *J. Mol. Catal. B Enzym.* Vol 77, 59–66.
16. WANG, Y. DU, J., LI, Y., SHAN, D., ZHOU, X., XUE,Z. (2012). A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single- walled carbon nanotubes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, Vol 90, 62–67.
17. LIU, Y., ZHANG, H., HAN D. (2006). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on gold colloid/cysteine/nafion-modified platinum disk electrode. *Sensors Actuators, B Chem.* Vol 165, 109–115.
18. CAO, Z., JIANG, X., XIE, Q. YAO, S. (2008). A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized in a tetrathiafulvalene- tetracyanoquinodimethane/multiwalled carbon nanotubes film. *Biosens. Bioelectron.* Vol 24, 222–227.
19. GOODE, J., RUSHWORTH, J., MILLNER, P. (2015). Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir* , Vol 31, 6267–6276.
20. CAMPOS, M. Los Biosensores En La Quimica Analitica Moderna.
21. BANNISTER, J., CENTRE, B. (1990). *Amperometric biosensors. Journal of biotechnology*, chapter 1.
22. GARC, L. E. Z. GARC, C. (2010). Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. *Inmunoelectroanalysis* 197–222.

23. Innovative technology for miniaturised electrochemistry. Dropsens catalogue.
24. YANG, W., RINGER, S., THORDARSON, P., GOODING, J., BRAET, F. (2010). Carbon nanomaterials in biosensors: Should you use nanotubes or graphene. *Angew. Chemie - Int. Ed.* Vol 49, 2114–2138.
25. Propiedades y aplicaciones del grafeno. *12 Monografías del SOPT*.
26. MCCOSKER, T. H. TEITZEL, J. K. (1975). A review of guinea grass (*Panicum maximum*) for the wet tropics of australia. *Tropical grasslands* 9, 1977–190.
27. TUAH, A. K., BUADU, M. K., FIAGOME, G. E. K., SACEY, A. K. (1979). Studies on the nutritive value of giant star and guinea grass forages in the Ashanti forest belt of Ghana. *Ghana Jnl agric. Sci.* 111, 103–111.
28. ARROYO, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 1–17.
29. COSNIER, S. MARKS, R., LELLOUCHE, J., PERIE, K. SZUNERITS, S. (2000). Electrogenerated poly(chiral dicarbazole) films for the reagentless grafting of enzymes. *Electroanalysis* 12, 1107–1112.
30. LIU, H., YING, T., SUN, K., LI, H. QI, D. (1997). Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N- methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode. *Anal. Chim. Acta* 344, 187–199.
31. CRUZ, I., FATIBELLO, O. (2000). Biosensor based on paraffin/graphite

modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta* 52, 681–689.

32. ABRUÑA, H. (1999). Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrodes surfaces and its application in a H₂O₂ biosensor. *Anal. Chem.* 71, 5530–5537.
33. CAMPUZANO, S. JA, F. (2002). Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulv alene and glucose oxidase at a gold disk electrode. 526, 92–100.
34. PIRO, B., DO, V., LE, L., HEDAYATULLAH, M. PHAM, M. C. (2000). Electrosynthesis of a new enzyme-modified electrode for the amperometric detection of glucose. *J. Electroanal. Chem.* 486, 133–140.
35. KISSINGER, P. T., BOTT, A. W., SYSTEMS, B. LAFAYETTE, W. (2002). Electrochemistry for the Non-Electrochemist. *Current* 2, 51–53.
36. BARD, A. J. FAULKNER, L. R. (2001). *ELECTROCHEMICAL METHODS: Fundamentals and applications.*
37. MENA, M., GONZALEZ, A., AGÜI, L. (2005). Biosensores electroquímicos basados en nanopartículas de oro. *Anales de la Real Sociedad Española de Química.*
38. CASTILLO, J., ALPEEVA, I., CHUBAI, T. GALAEV, I. CSOREGI, E. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.* 163, 1011–1019.
39. SKOOG., HOLLER., NIEMAN. Principios de análisis instrumental. Mc.

GrawHill, quinta edición.

40. FENG, H., WANG, H., ZHANG, Y., YAN, B., SHEN, G. (2007). A direct electrochemical biosensing platform constructed by incorporating carbon nanotubes and gold nanoparticles onto redox poly(thionine) film. *Anal. Sci.* 23, 235–9.
41. ALMAGRO, V. Cinética electroquímica.
42. BIN, X. CHANG, G., YI, X., WANG, M. LIU, J.(2012). Electrochimica Acta Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase / GNPs-thionine / chitosan. *Electrochim. Acta* 62, 327–334.
43. CHEN, S., RUO, Y., YAQIN, C., BIN, Y., WENJUN, L., LIGEN, M. (2009). Electrochimica Acta Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase on core – shell organosilica@chitosan nanospheres and multiwall carbon nanotubes composite. 54, 3039–3046.
44. LUO, X. QIU, Z., WAN, Q., SHU,H., YANG,N. (2014). Graphene nanoplatelets and horseradish peroxidase based biosensor. 211, No. 12, 2795–2800.
45. FARZANA, S., GANESH, V. BERCHMANS, S. (2013). A Sensing Platform for Direct Electron Transfer Study of Horseradish Peroxidase. 160, 573–580.
46. PEÑA, N. PINGARRÓN, J. (2003). *Desarrollo De Biosensores Amperométricos Compósitos Basados En Peroxidasa*. Universidad complutense de Madrid.

BIBLIOGRAFIA

ABRUÑA, H. (1999). Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrodes surfaces and its application in a H₂O₂ biosensor. *Anal. Chem.* 71, 5530–5537.

ALMAGRO, V. *Cinética electroquímica.*

ARROYO, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 1–17.

BANNISTER, J., CENTRE, B. (1990). Amperometric biosensors. *Journal of biotechnology*, chapter 1.

BARD, A. J. FAULKNER, L. R. (2001). *ELECTROCHEMICAL METHODS: Fundamentals and applications.*

BIN, X. CHANG, G., YI, X., WANG, M. LIU, J.(2012). *Electrochimica Acta* Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase / GNPs-thionine / chitosan. *Electrochim. Acta* 62, 327–334.

CAI, F., OUYANG, C., DUAN, P., GAO, S., XU, Y., CHEN, F. (2012). Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. *J. Mol. Catal. B Enzym.* Vol 77, 59–66.

CAMPOS, M. *Los Biosensores En La Química Analítica Moderna.*

CAMPUZANO, S. JA, F. (2002). Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. *Sensors*, 2, 92–100.

CAO, Z., JIANG, X., XIE, Q. YAO, S. (2008). A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized in a tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane/multiwalled carbon nanotubes film. *Biosens. Bioelectron.* Vol 24, 222–227.

CASTILLO, J., ALPEEVA, I., CHUBAI, T. GALAEV, I. CSOREGI, E. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.* 163, 1011–1019.

CHATTOPADHYAY, K., MAZUMDAR, S. (2000). Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase : Effect of Temperature and pH. *Journal of Biochemistry*, 126, 263–270.

CHEN, S., RUO, Y., YAQIN, C., BIN, Y., WENJUN, L., LIGEN, M. (2009). Electrochimica Acta Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase on core – shell organosilica@ chitosan nanospheres and multiwall carbon nanotubes composite. *Sensors*, 9, 3039–3046.

CLEMENT, M., PONTON, A. PERVAIZ, S. (1998). Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *Journal of Biochemistry*, 123, 13–18.

COSNIER, S. MARKS, R., LELLOUCHE, J., PERIE, K. SZUNERITS, S. (2000). Electrogenerated poly(chiral dicarbazole) films for the reagentless grafting of enzymes. *Electroanalysis* 12, 1107–1112.

CRUZ, I., FATIBELLO, O. (2000). Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta* 52, 681–689.

FARZANA, S., GANESH, V. BERCHMANS, S. (2013). A Sensing Platform for Direct Electron Transfer Study of Horseradish Peroxidase. 160, 573–580.

FENG, H., WANG, H., ZHANG, Y., YAN, B., SHEN, G. (2007). A direct electrochemical biosensing platform constructed by incorporating carbon nanotubes and gold nanoparticles onto redox poly(thionine) film. *Anal. Sci.* 23, 235–9.

GARC, L. E. Z. GARC, C. (2010). Los biosensores electroquímicos : herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. *Inmunoelectroanálisis* 197–222.

GOODE, J., RUSHWORTH, J., MILLNER, P. (2015). Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir* , Vol 31, 6267–6276.

IKEHATA, K., BUCHANAN, I. D., PICKARD, M. A. SMITH, D. W. (2005). Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Bioresour. Technol.* Vol 96, 1758–1770.

Innovative technology for miniaturised electrochemistry. *Dropsens catalogue*.

KISSINGER, P. T., BOTT, A. W., SYSTEMS, B. LAFAYETTE, W. (2002). Electrochemistry for the Non-Electrochemist. *Current* 2, 51–53.

LIU, H., YING, T., SUN, K., LI, H. QI, D. (1997). Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-

methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode. *Anal. Chim. Acta* 344, 187–199.

LIU, Y., ZHANG, H., HAN D. (2006). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on gold colloid/cysteine/nafion-modified platinum disk electrode. *Sensors Actuators, B Chem.* Vol 165, 109–115.

LUO, X. QIU, Z., WAN, Q., SHU, H., YANG, N. (2014). Graphene nanoplatelets and horseradish peroxidase based biosensor. 211, No. 12, 2795–2800.

MCCOSKER, T. H. TEITZEL, J. K. (1975). A review of guinea grass (*Panicum maximum*) for the wet tropics of australia. *Tropical grasslands* 9, 197–190.

MENA, M., GONZALEZ, A., AGÜI, L. (2005). Biosensores electroquímicos basados en nanoparticulas de oro. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*.

Methods for the detection of residual concentrations of hydrogen peroxide in advanced oxidation processes. *WaterReuse Foundation*.

MONOŠÍK, R., STRED'ANSKÝ, M., ŠTURDÍK, E. (2012). Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis. *J. Clin. Lab. Anal.* Vol 26, 22–34.

OKUDA, S., NISHIYAMA, N., SAITO, H., KATSUKI, H. (1996). Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol 93, 12553–12558.

PEÑA, N. PINGARRÓN, J. (2003). *Desarrollo De Biosensores Amperométricos Compósitos Basados En Peroxidasa*. Universidad complutense de Madrid.

PIRO, B., DO, V., LE, L., HEDAYATULLAH, M. PHAM, M. C. (2000). Electrosynthesis of a new enzyme-modified electrode for the amperometric detection of glucose. *J. Electroanal. Chem.* 486, 133–140.

Propiedades y aplicaciones del grafeno. 12 Monografías del SOPT.

SAKHAROV, I. SAKHAROVA, G., BAUTISTA, G., ROJAS, A. (1999). Peroxidasa de Plantas Tropicales. *Revista Colombiana de química*, Vol 28, 97-106.

SKOOG., HOLLER., NIEMAN. Principios de análisis instrumental. Mc. GrawHill, quinta edición.

SU, G., WEI, Y. GUO, M. (2011). Direct Colorimetric Detection of Hydrogen Peroxide Using 4-Nitrophenyl Boronic Acid or Its Pinacol Ester. *American Journal of Analytical Chemistry*. Vol 2, 879–884.

THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A. & WILSON, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* Vol 16, 121–131.

TUAH, A. K., BUADU, M. K., FIAGOME, G. E. K., SACKEY, A. K. (1979). Studies on the nutritive value of giant star and guinea grass forages in the Ashanti forest belt of Ghana. *Ghana Jnl agric. Sci.* 111, 103–111.

VILLAMIZAR, E. N., RÍOS, C., CASTILLO, J. (2016). A Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Immobilization of the Highly Stable Royal Palm Tree Peroxidase (*Roystonea regia*) with Chitosan and Glutaraldehyde on Screen-printed Graphene Electrodes. Vol 60, 135–140.

WANG, J. (2001). Glucose Biosensors : 40 Years of Advances and Challenges. 983–988.

WANG, Y. DU, J., LI, Y., SHAN, D., ZHOU, X., XUE,Z. (2012). A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single- walled carbon nanotubes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, Vol 90, 62–67.

WHITTEMORE, E., LOOD, D., WATT, J., COTMAN, C. (1995). Peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. Vol 67, 921-932.

YANG, W., RINGER, S., THORDARSON, P., GOODING, J., BRAET,F. (2010).Carbon nanomaterials in biosensors: Should you use nanotubes or graphene. *Angew. Chemie - Int. Ed.* Vol 49, 2114–2138.

ZAMORANO, L. BARRERA, S., ARELLANO, J., ZHADAN, B., GALINA G., CUADRADO, N., ROIG, S. (2009). Thermal stability of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree at pH 3. *Int. J. Biol. Macromol.* Vol 44, 326–332.

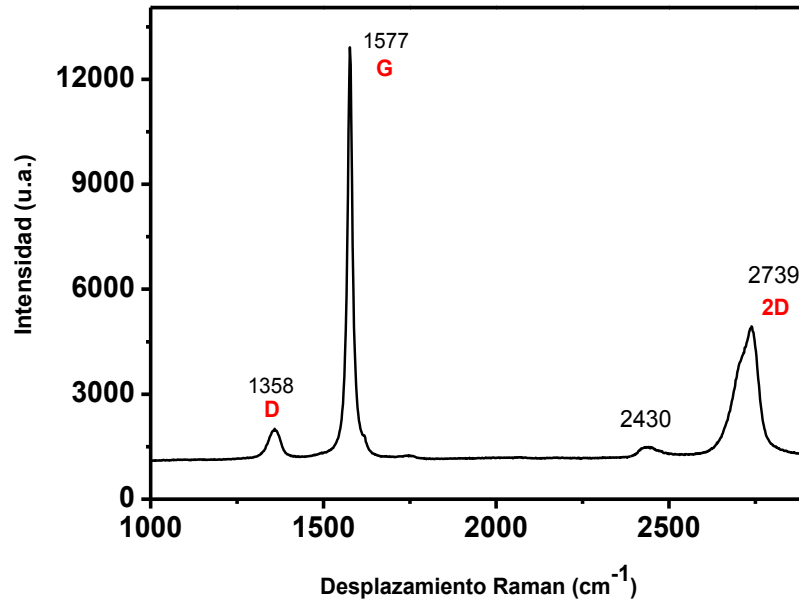
ZAMORANO, L., PINA, D., ARELLANO, J., BURSAKOV, S., ZHADAN, A., CALVET, J., SANZ, L., NIELSEN, P., VILLAR, E., ROIG, M., WATANABE,L., POLIKARPOV, I. (2008). Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea regia* peroxidase stability. *Biochimie*, 1737–1749.

ANEXOS

ANEXO A. CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS ELECTRODOS DRP-110GPH.

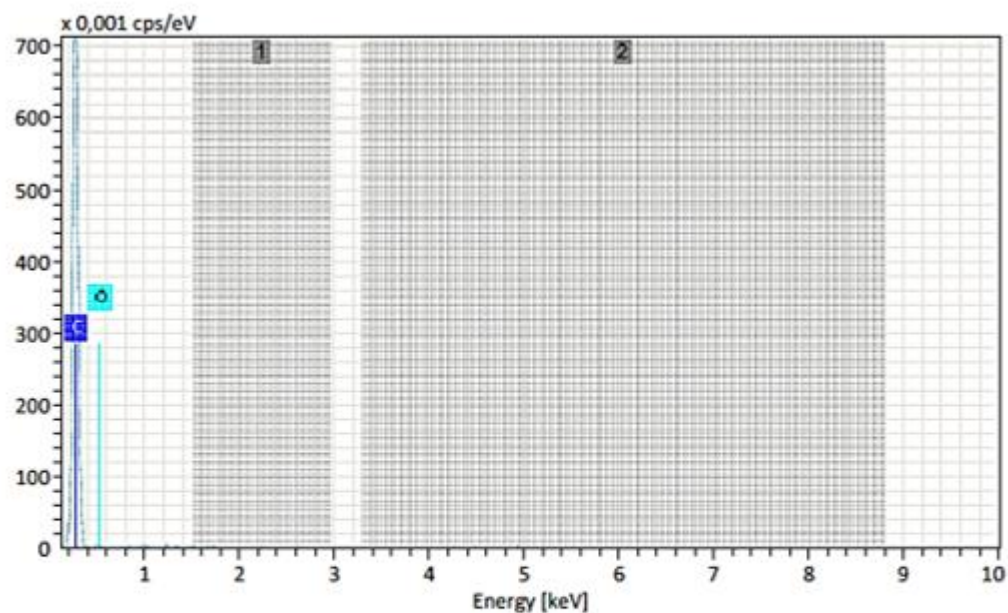
Como electrodos de trabajo se utilizaron electrodos descartables, de referencia DRP-110GPH (electrodos serigrafiados de grafeno). Antes de cualquier estudio electroquímico la superficie de estos electrodos fue caracterizada mediante espectroscopia Raman y análisis elemental.

Los análisis de RAMAN se tomaron en el laboratorio de espectroscopia en el parque tecnológico de Guatiguara con el equipo LabRAM HR Evolution. Los resultados de espectroscopia RAMAN se presentan en este anexo. Dentro de la espectroscopia RAMAN, los modos vibracionales en una misma capa de carbonos con hibridación sp^2 dan origen a una banda denominada G en 1577 cm^{-1} . Además, como consecuencia de los defectos de estructura cristalina causados por carbonos con hibridación sp^3 unidos a grupos funcionales oxigenados que favorecen el pliegue de monocapas se presenta una banda denominada D en 1358 cm^{-1} . Otros fenómenos, como los de doble resonancia dan origen a una banda denominada 2D en 2739 cm^{-1} y en 2430 cm^{-1} aparece una señal que podría asociarse a un sobretono de la vibración de elongación del enlace C-O en grupos carboxílicos y quinonas presentes en la estructura. Las señales anteriormente descritas y las intensidades de las mismas confirman la presencia de grupos oxigenados en el material de estudio.



Espectro RAMAN de electrodo de trabajo.

Además de la caracterización de los electrodos serigrafados por espectroscopia RAMAN, se realizó análisis elemental por medio de Espectrometría dispersiva de rayos X (EDAX, por sus siglas en ingles), tal cual se puede observar en el anexo. Los análisis por EDAX sugieren que el grafeno se encuentra sustituido en varios puntos de anclaje con grupos funcionales oxigenados, lo que aumenta su versatilidad a la hora de funcionalizar la superficie de los electrodos.

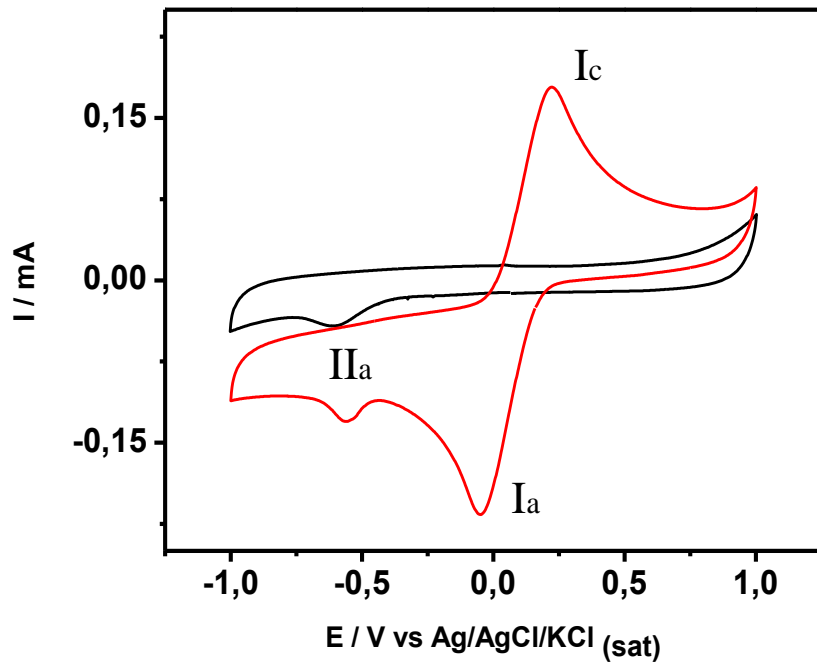


Element	At. No.	Line s.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [%]	Atom [%]	abs. error [%] (1 sigma)	abs. error [%] (2 sigma)	abs. error [%] (3 sigma)
Carbon	6	K-Serie	2658	98,17	98,53	98,89	17,46	34,92	52,38
Oxygen	8	K-Serie	15	1,47	1,47	1,11	1,71	3,42	5,13
Sum				99,64	100,00	100,00			

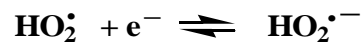
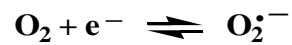
Análisis elemental de la superficie del electrodo de trabajo por EDAX.

ANEXO B. EFECTO DEL OXÍGENO PRESENTE EN EL SISTEMA.

Para establecer el rango adecuado para la determinación de peróxido de hidrógeno, se realizó un barrido de potencial, desde el potencial de circuito abierto (OCP), hasta un potencial de inversión de -1.0 V vs $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat})}$, posteriormente el potencial fue incrementado hasta llegar a 1.0 V , y nuevamente invertido hasta el OCP. Generando así una onda triangular y una voltametría cíclica. Antes de realizar el análisis de H_2O_2 , estudios electroquímicos de una solución conteniendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM + PBS 10 mM + KCl fueron hechos. Como puede apreciarse en el anexo, la figura en (rojo), el comportamiento electroquímico del $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, presenta una señal electroquímica reversible, pico i_a y i_c , típica de la electroquímica de este sistema de prueba. También se puede apreciar en esta voltametría la presencia de una señal a -0.52 V (IIa), que no corresponde a la naturaleza de la señal del ferricianuro, porque como se puede observar en la figura en (negro), esta señal aparece incluso cuando trabajamos el sistema de electrolito en ausencia de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Esta señal puede ser asociada a oxígeno molecular disuelto (ver ecuaciones de anexo). Para disminuir este efecto de reducción se desgasificaron las soluciones antes de las medidas electroquímicas.



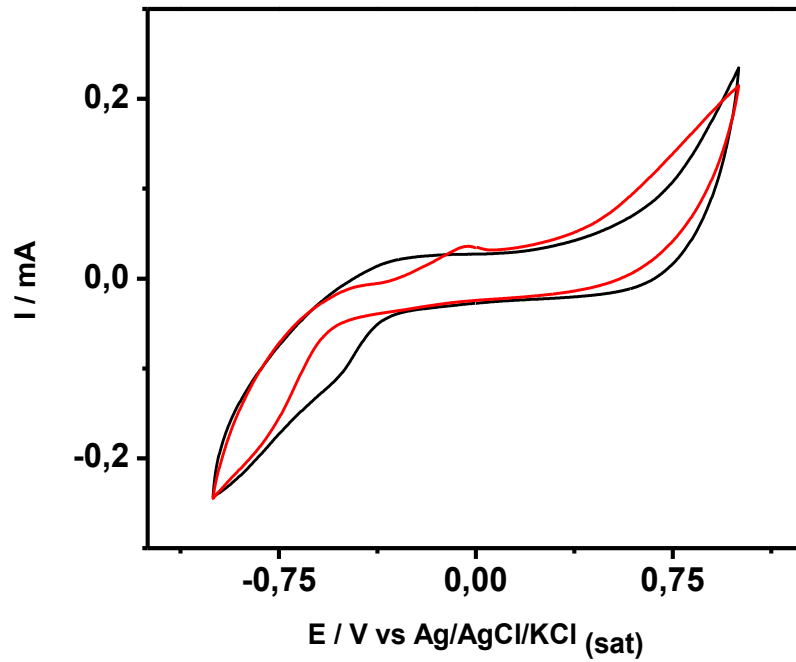
Comportamiento electroquímico de electrodo sin modificar, solución 10 mM PBS pH 8.0 en KCl 0.1 M (negro) y solución $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM en KCl 0.1 M en agua (rojo), velocidad de barrido 100 mV s^{-1} .



ANEXO C. EFECTO KCl

El transporte de las especies reaccionantes desde la solución hacia la superficie del electrodo puede efectuarse de tres modos principalmente: difusión, migración y convección³⁶. En electroanálisis, las formas de transporte diferentes a difusión, se consideran indeseables, por lo que diferentes formas de atenuar los efectos de migración y convección se han realizado. Por ejemplo, agregar un exceso de electrolito soporte (0,1 M KCl) especie no electroactiva iónica que minimiza su efecto, con lo que se facilita la conductividad de la disolución al disminuir la resistencia de la celda electroquímica⁴¹, los experimentos de VC se realizaron sin agitación, eliminando el transporte por convección. Así, el proceso fue controlado únicamente por difusión, mediante el movimiento de las especies redox bajo la influencia de un gradiente de concentración.

Sin embargo, como se observa en el anexo; al comparar VCs tomados en ausencia y presencia de KCl se puede concluir que para los electrodos empleados en este trabajo (electrodos descartables) no es necesario usar un electrolito soporte como KCl, porque como se evidencio que, en ausencia o presencia de esta especie, la señal de intensidad de corriente no presento cambios significativos, lo que permite hacer una evaluación de H₂O₂ en ausencia de electrolito.



VC electrodo modificado con PPG en 10mM PBS (pH 8.0) y 3 mM H₂O₂ en ausencia (rojo) y presencia (negro) de KCl (velocidad de barrido 100 mV s⁻¹).