

DetECCIÓN electroquímica de peróxido de hidrógeno usando peroxidasa de pasto Guinea (*Panicum maximum*) inmovilizada sobre electrodos serigrafiados de puntos cuánticos

Electrochemical detection of hydrogen peroxide using peroxidase from Guinea grass (*Panicum maximum*) immobilized on screen-printed quantum dots electrodes

Detecção eletroquímica de peróxido de hidrogênio usando Peroxidase imobilizada de capim-da-Guiné (*Panicum maximum*) em eletrodos impressos em tela de pontos quânticos

Paula Andrea Guarín-Guio¹; Hermínsul de Jesús Cano-Calle²; John Jairo Castillo-León^{1*}

¹Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, ²Grupo de Investigación en Físicoquímica Teórica y Experimental, Universidad Industrial de Santander (UIS), Cra. 27 Calle9, Bucaramanga, Colombia.

*jcasleon@uis.edu.co

Fecha recepción: 3 de octubre de 2019

Fecha aceptación: 19 de diciembre de 2019

Resumen

Los biosensores electroquímicos son herramientas analíticas de rápida y confiable respuesta que han adquirido especial interés en los últimos años gracias a la posibilidad de integrar biomoléculas con electrodos hechos a base de materiales nanométricos. En este trabajo se desarrolló un biosensor electroquímico para detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) usando peroxidasa de pasto Guinea (PPG) inmovilizada sobre electrodos serigrafiados de puntos cuánticos (ESPC). La PPG fue aislada y parcialmente purificada a partir de hojas de pasto Guinea con una actividad específica de 602 U mg^{-1} . Posteriormente, la PPG fue inmovilizada sobre la superficie del ESPC mediante adsorción física y el estudio del comportamiento electroquímico fue llevado a cabo mediante voltamperometría cíclica y cronoamperometría. La PPG reveló una pareja bien definida de señales redox a 17 mV/-141 mV correspondientes al proceso redox del grupo hemo (Fe^{2+}/Fe^{3+}) de las peroxidases. La reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno se observó a un potencial redox de -645 mV vs Ag. Este proceso fue controlado por difusión de las especies en la superficie del electrodo en un rango de velocidad de barrido lineal de 50-500 mV/s. La cronoamperometría permitió la construcción de curvas de calibración entre la corriente de reducción y la concentración del H_2O_2 para la determinación de parámetros analíticos como sensibilidad, rango lineal y nivel mínimo de detección. El desarrollo de este biosensor amperométrico se convierte en un paso preliminar para la construcción de un dispositivo portátil y de respuesta rápida para el análisis de H_2O_2 en muestras de interés ambiental y biomédico.

Palabras claves: Biosensor; Peroxidasa; Pasto Guinea; Peróxido de Hidrógeno; Puntos Cuánticos.

Abstract

Electrochemical biosensors are analytical tools of fast and reliable response that have acquired interest in the last years due to the possibility of integrating biomolecules and electrodes made of nanometric materials. In this study, an electrochemical biosensor to detect hydrogen peroxide (H_2O_2) based on Guinea Grass peroxidase (GGP) immobilized on screen-printed quantum dots electrodes (SPQDE) was

developed. GGP was partially purified from Guinea grass leaves having a specific activity of 602 U mg⁻¹. Then, GGP was immobilized by physical adsorption on the surface on SPQDE and the electrochemical behavior was carried out through cyclic voltammetry and chronoamperometry techniques. GGP revealed a well-defined pair of redox signals at 17 mV/-141 mV corresponding to the redox process of the heme group (Fe²⁺/Fe³⁺) of peroxidases. The bioelectrocatalytic reduction of H₂O₂ has a redox potential of -645 mV vs Ag. This process was controlled by the diffusion of the species on the electrode surface using a scan rate range of 50-500 mV s. Chronoamperometry studies allow us the construction of calibration curves of reduction current vs H₂O₂ concentration for the determination of analytical parameters such as sensitivity, linear range and minimum detection level. The development of this amperometric biosensor becomes a preliminary step for the construction of a portable and rapid response device for the analysis of H₂O₂ in samples of environmental and biomedical interest.

Keywords: Biosensor; Peroxidase; Guinea Grass; Hydrogen Peroxide; Quantum Dots.

Resumo

Os biossensores eletroquímicos são ferramentas analíticas de resposta rápida e confiável que adquiriram interesse especial nos últimos anos, graças à possibilidade de integrar biomoléculas com eletrodos feitos de materiais nanométricos. Neste trabalho, um biossensor eletroquímico foi desenvolvido para a detecção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) usando peroxidase do capim-da-Guiné (PPG) imobilizada em eletrodos serigráficos de pontos quânticos (ESPC) serigrafados. O PPG foi isolado e parcialmente purificado a partir de folhas de capim-da-Guiné com atividade específica de 602 U mg⁻¹. Posteriormente, o PPG foi imobilizado na superfície do ESPC por adsorção física e estudo do comportamento eletroquímico foi realizado por voltametria cíclica e cronoamperometria. O PPG revelou um par bem definido de sinais redox em 17 mV/-141 mV correspondente ao processo redox do grupo heme (Fe²⁺/Fe³⁺) de peroxidases. A redução bioeletrocatalítica do H₂O₂ foi observada com um potencial redox de -645 mV vs. Ag. Esse processo foi controlado pela difusão das espécies na superfície do eletrodo em uma faixa de velocidade de varredura linear de 50-500 mV/s. A cronoamperometria permitiu a construção de curvas de calibração entre a corrente de redução e a concentração de H₂O₂ para a determinação de parâmetros analíticos como sensibilidade, faixa linear e nível mínimo de detecção. O desenvolvimento deste biossensor amperométrico torna-se uma etapa preliminar para a construção de um dispositivo portátil e de resposta rápida para a análise de H₂O₂ em amostras de interesse ambiental e biomédico.

Palavras-chave: Biossensor; Peroxidase; Capim Guiné; Peróxido de Hidrogênio; Pontos Quânticos.

Introducción

La determinación de H₂O₂ en diferentes tipos de matrices ambientales y biomédicas es de suma importancia ya que a nivel industrial es usado como agente blanqueador en la industria de papel y en tintes para el cabello y sus desechos son arrojados sin ningún control sobre fuentes hídricas [12–15]. Por otro lado, el H₂O₂ juega un papel muy importante en diferentes tipos de reacciones bioquímicas, por ejemplo, concentraciones elevadas de H₂O₂ contribuyen al daño oxidativo de diferentes enzimas y proteínas que podrían estar correlacionadas con enfermedades como el cáncer [16]. Por lo tanto, es muy importante no únicamente detectar el H₂O₂ sino también determinar su concentración exacta. Actualmente, existen métodos bastante precisos y exactos basados en técnicas analíticas como: espectrometría, cromatografía acoplada a masas

y HPLC [9,17–19]. Sin embargo, estos métodos presentan desventajas tales como: largos tiempos de análisis, uso de personal capacitado, costos elevados, entre otros.

Los biosensores electroquímicos son dispositivos bio-analíticos que integran un elemento de reconocimiento biológico (enzimas, proteínas, virus, tejidos celulares, bacterias, etc.) en la superficie de un transductor y mediante un voltaje operacional se produce una corriente en función de la concentración del analito a determinar. Actualmente, son ampliamente utilizados debido a características operacionales tales como: respuesta rápida, rango lineal de respuesta, niveles mínimos de detección y en la mayoría de los casos no requiere preparación de la muestra [1–3].

Entre los elementos de reconocimiento biológico de mayor interés en la construcción de biosensores

están las peroxidasas (PODs), las cuales son enzimas de tipo oxidorreductasas que catalizan la oxidación de aminas y fenoles usando como agente oxidante el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [2,4]. La POD de rábano picante (PRP) es la enzima comercial más estudiada gracias a su amplia especificidad frente a diferentes sustratos. No obstante, en aplicaciones biotecnológicas que requieren el uso de altas temperaturas, pHs extremos y altas concentraciones de H_2O_2 , la Peroxidasa de rabano picante (PRP) presenta una disminución notable tanto en su actividad bio-catalítica como en su estabilidad [4]. Estas desventajas han motivado a la comunidad científica a la búsqueda de nuevas fuentes naturales de la peroxidasa, es así como en las últimas décadas se han encontrado nuevas peroxidasas provenientes de maní, soya, palmas y otros tipos de plantas tropicales. Recientemente, dos tipos de PODs encontradas en la palma real (*Roystonea regia*) y el pasto guinea (*Panicum maximum*) cultivadas en territorio santandereano (Colombia) han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente [4,5]. La peroxidasa de pasto guinea (PPG) fue inmovilizada sobre electrodos serigrafados de grafeno y usada en la construcción de un biosensor amperométrico para la detección de triclosán con un potencial redox de 0,37 V y un límite de detección de 3×10^{-6} M [6]. Por otro lado, la Peroxidasa de rabano picante (PRP) ha sido usada en la construcción y fabricación de biosensores amperométricos sobre electrodos de grafeno y electrodos de oro modificados con nanotubos de péptidos para detección de H_2O_2 [7,8].

Los últimos avances en el campo de la nanotecnología y las nanociencias, en lo que a fabricación de novedosos materiales se refiere, ha permitido desarrollar nanomateriales para la construcción de nuevos electrodos serigrafados. Uno de los nanomateriales con más aplicaciones electroquímicas son los puntos cuánticos (PC). Los PCs son nanopartículas semiconductoras (Ej: PbX, CdX, ZnX (X: Se, S, Te)) constituidos por aproximadamente de 100 a 100000 átomos por partícula [9]. El caparazón metálico presente en la estructura de los PCs es favorable para la construcción de biosensores electroquímicos debido al mejoramiento en las propiedades electrónicas y al microambiente protector que pueden ofrecer a las enzimas [10,11]. Por otro lado, gracias al tamaño nanométrico de los PCs ha sido posible la fabricación de electrodos robustos, rentables, maleables y fáciles de miniaturizar.

Por ejemplo, Manan *et al.*, desarrollaron un nanocomposito de celulosa nanocristalina decorado con PCs y funcionalizado con tirosinasa para detección electroquímica de fenol [11]. En otro estudio, Ali *et al.*, lograron detectar ácido úrico mediante un biosensor electroquímico altamente sensible fabricado a base de PCs de ZnO [11]. La integración de glucosa oxidasa con puntos cuánticos de grafeno (PCG) sirvió como base para la construcción de un biosensor electroquimioluminiscente para detección de glucosa [11]. Uno de los pocos estudios que integran las peroxidasas con PCs fue el llevado a cabo por Muthurasu *et al.*, quienes inmovilizaron la PRP sobre la estructura de electrodos de PCG para detección electroquímica de H_2O_2 [11].

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, en este estudio se inmovilizó la PPG sobre la superficie de electrodos serigrafados de puntos cuánticos para la determinación de H_2O_2 . Las técnicas electroanalíticas usadas demostraron la eficiencia del biosensor para reducir electrocatalíticamente el H_2O_2 , y permitieron la obtención de parámetros analíticos tales como nivel mínimo de detección, rango lineal y la sensibilidad con valores de 45,21 μ M, 0,5-4 mM y 23,50 μ A/mM, respectivamente. De esta manera, este estudio consistió en una evaluación preliminar de un biosensor amperométrico con el fin de obtener un novedoso sistema bioanalítico portable y de respuesta rápida para la determinación de H_2O_2 en muestras reales de interés ambiental y biomédico.

Procedimiento experimental

Purificación de la peroxidasa de pasto guinea

Para la extracción de la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) se empleó un método similar al descrito por Sakharov *et al.* [4]. Hojas de pasto guinea fueron cortadas en pequeños trozos obteniendo 100 g del triturado para luego ser homogeneizado con un buffer fosfato 100 mM pH 7,4 con agitación constante. El extracto se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min y 4°C con el fin de eliminar los sólidos. Sobre el extracto crudo obtenido, se adicionaron lentamente, polietilenglicol (PEG, peso molecular 15.000-20.000) al 14 %p/v y sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ al 10 %p/v bajo constante agitación magnética hasta disolver todos los sólidos, y lograr la separación de la POD. La capa clara conteniendo la POD fue sometida a cromatografía por exclusión de tamaño empleando como fase estacionaria Sephadex

S-75, y equilibrando la columna con un buffer TRIS-básica de 3 mM a pH 8,3 con un flujo de 1ml/min, la elución se llevó a cabo con el mismo buffer de equilibrio. Finalmente, las fracciones conteniendo la POD fueron centrifugadas empleando Amicones® de 10 kDa durante 30 min a 5000 rpm. Se midió la actividad enzimática y el contenido de proteínas [19], la POD purificada fue almacenada a 4 °C para los experimentos electroquímicos.

Modificación del electrodo serigrafiado de puntos cuánticos con la peroxidasa de pasto guinea

Se utilizaron electrodos serigrafiados de carbono modificados con un núcleo de puntos cuánticos

de CdSe incluyendo un electrodo de referencia de plata y un electrodo auxiliar de carbono. Fueron adquiridos comercialmente (110QD, Dropsens® Oviedo, España) y presentan las siguientes dimensiones: L33 x A10 x A 0,5 mm. Para la modificación de los ESPCs se depositaron 5 µL de la PPG sobre la superficie del electrodo y se almacenó a 4 °C durante 12 h. Posteriormente, la superficie del electrodo fue lavada cuidadosamente con buffer PBS pH 7,4 para eliminar la peroxidasa no adsorbida. En la figura 1, se puede observar un esquema del funcionamiento y los pasos seguidos para preparar el electrodo modificado.

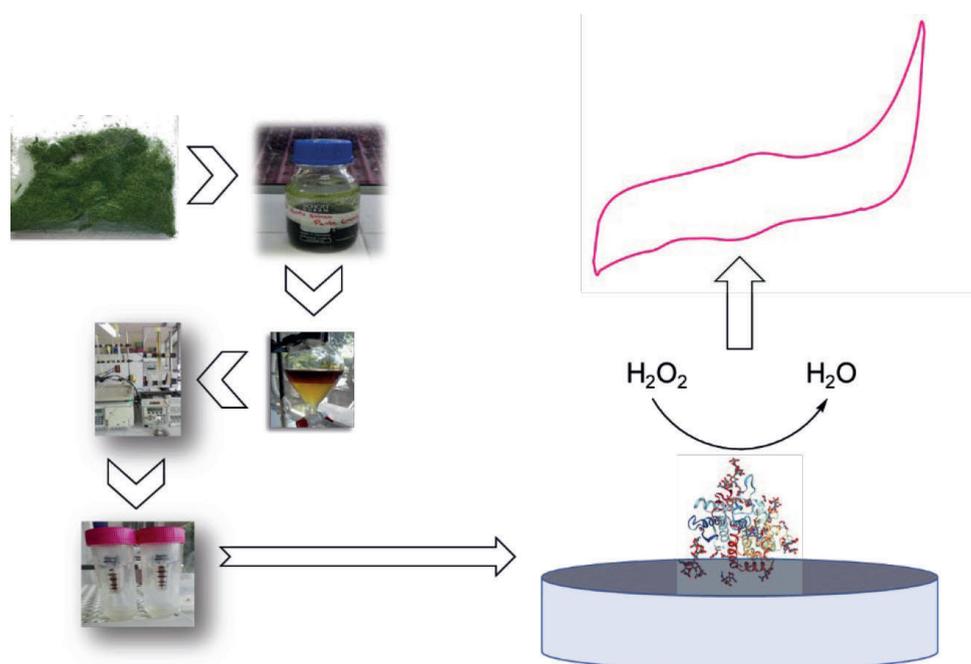


Figura 1. Esquema de la preparación del ESPC con la peroxidasa de pasto guinea y detección electroquímica de peróxido de hidrógeno.

Estudio electroquímico de los ESPCs sin modificar y modificados con la PPG

Por medio de voltamperometría cíclica (VC) se comparó el comportamiento redox del electrodo sin modificar y en presencia de la PPG en una celda acrílica de 7 mL de capacidad conteniendo una solución de PBS 10 mM, pH 7.4. Los VCs fueron medidos a una velocidad de barrido de 50 mV s⁻¹. Todas las mediciones electroquímicas fueron llevadas a cabo en un potenciostato Autolab PGSTAT101 (Echo Chemie, Utrecht, The Netherlands) controlado por el software NOVA 1.10.1.9 (Metrohm, Filderstand, Germany).

Reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno por el ESPC-PPG

Electrodos sin modificar y modificados con la peroxidasa fueron sumergidos en la celda electroquímica conteniendo una solución de PBS 10 mM, pH 7,4 en presencia de una concentración 1 mM de H₂O₂. Por medio de varios VCs (velocidad de barrido de 50 mV s⁻¹) se evaluó el comportamiento del ESPC-PPG en la reducción del H₂O₂.

Estudio del efecto de la velocidad de barrido

Se midieron diferentes VCs del electrodo ESPC-PPG de una solución PBS 10 mM pH 7,4 a

velocidades de barrido comprendidas entre 50 y 500 mV s⁻¹.

Estudio de los parámetros analíticos

Experimentos por cronoamperometría permitieron la construcción de curvas de calibración a diferentes concentraciones de H₂O₂ y se determinaron los siguientes parámetros analíticos: rango lineal del método, límite de detección y sensibilidad del método. Se trabajó a un potencial fijo de -645 mV y se usaron concentraciones de H₂O₂ en un rango entre 0,5 y 6 mM y un tiempo de medición de aproximadamente 10 min. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado mediante la fabricación de electrodos preparados bajo las mismas condiciones.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se resumen las diferentes etapas en la purificación parcial de la PPG. Inicialmente, el extracto de la POD luego de la extracción con el PBS enriquecido en pigmentos coloreados mostró una actividad específica de 162 U mg⁻¹. Posteriormente, los pigmentos fueron removidos eficientemente mediante un sistema bifásico PEG-sulfato de amonio y la capa clara con un volumen de 41 mL presentó un valor en la actividad específica de 304 U mg⁻¹. Finalmente, la cromatografía de permeación en gel y la ultracentrifugación permitieron obtener la PPG con una actividad específica final de 602 U mg⁻¹.

Tabla 1. Etapas de la purificación parcial de la peroxidasa de pasto guinea.

Etapa	Volumen (mL)	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracción	150	83	13459	162	100	1
Remoción de pigmentos	70	41	12498	304	93	1,9
Cromatografía de permeación en gel	30	12	5456	454	26	4,5
Ultracentrifugación	15	5	3012	602	22	6,1

La figura 2 muestra los VCs (velocidad de barrido de 50 mV s⁻¹) del electrodo de PCs sin modificar y modificado con la PPG en una solución PBS 100 mM, pH 7,8. El VC del electrodo modificado muestra una pareja de señales redox bien definidas a 17mV/-141mV las cuales corresponden al proceso redox Fe²⁺/Fe³⁺ del grupo hemo de la

POD, estas señales están en concordancia con otros potenciales redox de la mayoría de PODs [20–25]. Por otro lado, el EPC sin modificar no muestra ninguna señal redox lo que confirma la adsorción de la PPG sobre la superficie de los electrodos de puntos cuánticos.

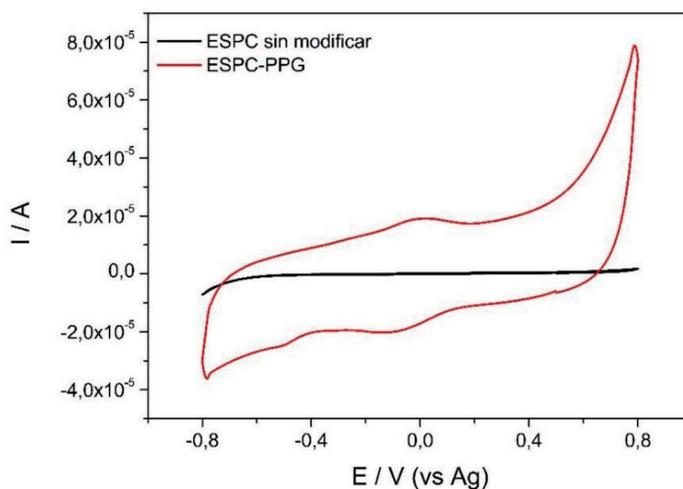


Figura 2. Voltamperogramas cíclicos de ESPCs sin modificar y modificados con la PPG en una solución de buffer PBS 100 mM, pH 7,8 (velocidad de barrido 50 mV s⁻¹).

El potencial formal (promedio del valor del potencial catódico y anódico) de la PPG fue de aproximadamente 79 mV y está dentro de los valores reportados para otras PODs de plantas [25] indicando que los PCs ofrecen un microambiente favorable para la POD inmovilizada mejorando de esta forma la comunicación electrónica entre la superficie del electrodo y la enzima. Además, la separación de los picos catódico y anódico (ΔE_p) es mayor que 56 mV lo que evidencia un proceso redox cuasi-reversible de transferencia de electrones entre la superficie del electrodo y la

enzima [26].

Una manera de obtener información acerca de la reversibilidad del proceso redox es mediante el estudio de la dependencia de la corriente catódica con la raíz cuadrada de diferentes velocidades de barrido [18,27].

La figura 3A muestra VCs a diferentes velocidades de barrido para el electrodo modificado con la PPG en una solución PBS 100 mM, pH 7,8, a partir de los valores de las señales de la corriente catódica y anódica se construyó la curva de la figura 3B.

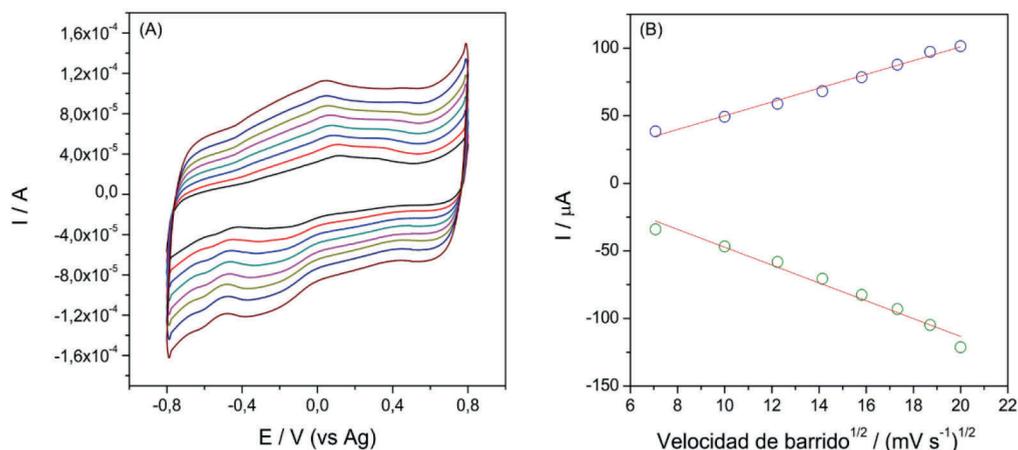


Figura 3. Voltamperogramas cíclicos (A) a diferentes velocidades de barrido (50, 100, 150, 200, 350, 400, 450, 500 mV s^{-1}); (B) curvas de intensidad de corriente vs la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de ESPCs sin modificar y modificados con la PPG en una solución de buffer PBS 100 mM, pH 7,8.

Como se puede apreciar existe una dependencia lineal entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido con las corrientes anódicas y catódicas, respectivamente. Las ecuaciones de regresión lineal fueron, $C_{pa} = 5,09v - 0,98$ ($R = 0,99$) y $C_{pc} = -6,60v + 18,72$ ($R = 0,98$), para la corriente del pico anódico y catódico, respectivamente. Esta linealidad sugiere un proceso cuasi-reversible controlado superficialmente por las especies electroactivas difundándose hacia el electrodo [17]. La reducción electrocatalítica del H_2O_2 por parte de la enzima inmovilizada sobre la superficie del ESPC fue estudiada mediante VC. En la figura 4 se puede apreciar que no hubo ninguna actividad catalítica por parte del electrodo sin modificar, mientras que en el electrodo modificado con la PPG y en presencia de 1 mM de H_2O_2 adicionado a la celda electroquímica se pudo apreciar una corriente catódica a -645 mV, debido a la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 por parte del grupo hemo de la PPG. Un comportamiento similar en la reducción del H_2O_2 por otros tipos de POD

inmovilizado sobre diferentes tipos de electrodos fue observado por otros autores [28–31].

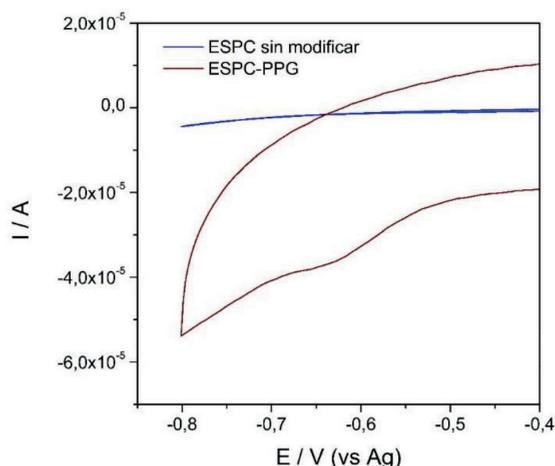
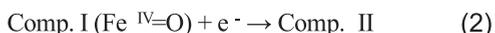
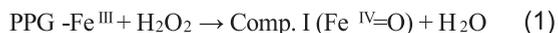


Figura 4. Voltamperograma cíclico de la reducción del H_2O_2 (1 mM) del electrodo no modificado y modificado con la peroxidasa de pasto guinea, velocidad de barrido 50 mV s^{-1} .

Al igual que otras PODs de plantas y de acuerdo con estudios reportados anteriormente [1,12,32–34], el mecanismo por el cual la PPG inmovilizada sobre la superficie del electrodo de PCs reduce el H_2O_2 es descrito en el siguiente esquema:



Inicialmente, luego de reaccionar con el peróxido, el Fe^{III} del grupo hemo de la PPG es oxidado al compuesto I (Ecuación 1), que contienen el ion hierro (III) débilmente enlazado al catión radical protoporfirínico π . El compuesto I obtiene un electrón del electrodo para formar el compuesto II (Ecuación 2). Finalmente, el compuesto II es reducido nuevamente a la forma nativa de la enzima por medio del electrón donado por el electrodo (Ecuación 3).

Con el propósito de demostrar la detección del peróxido por la PPG inmovilizada sobre los electrodos de PC, experimentos de cronoamperometría para monitorear la respuesta amperométrica del electrodo luego de diferentes y sucesivas adiciones de H_2O_2 fueron llevados a cabo. Se escogió un potencial de trabajo de -645 mV (vs Ag) según la señal de potencial presentada

en el VC de la figura 4. El ESPC-PPG mostró una corriente de reducción con valores estables posteriores a la adición de alícuotas de H_2O_2 a la solución buffer agitada magnéticamente (Fig. 5A), esto evidenció un proceso de transferencia rápida de electrones desde el centro redox de la PPG hacia la superficie del electrodo.

Por otro lado, la curva de calibración de la Figura 5B mostró una dependencia lineal descrita por la ecuación: $I = -23,50[H_2O_2] - 46,95$, con un coeficiente de correlación de 0,993. El límite de detección ($Ld= 3,3Sb/m$) fue calculado siguiendo la definición dada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) donde Sb hace referencia a la desviación estándar del blanco y m es la pendiente de la curva de calibración. La sensibilidad se obtuvo a partir de la pendiente de la curva de calibración de la figura 5B. Por lo tanto, el valor obtenido para el Ld fue de $45,21 \mu M$ y la sensibilidad $23,50 \mu A/mM$. Finalmente, en la tabla 2 se muestra una comparación del desempeño analítico de sistemas similares con los obtenidos en este estudio usando PODs para detección de H_2O_2 .

De acuerdo con estos resultados, el biosensor obtenido a base de electrodos serigrafados de puntos cuánticos y modificados con peroxidasa de pasto guinea podría ser potencialmente empleado en el análisis de muestras de interés ambiental y biomédico para la determinación de peróxido de hidrogeno.

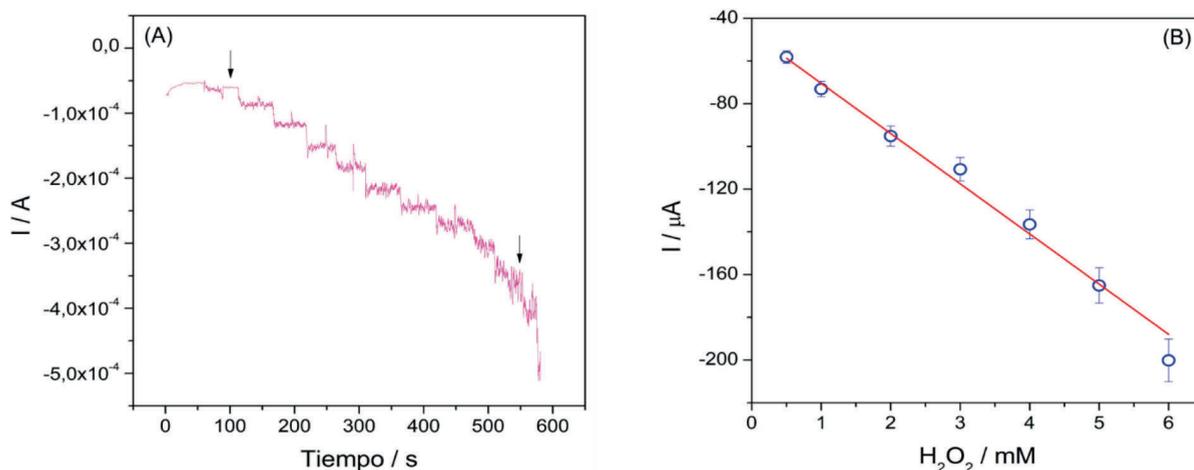


Figura 5. Cronoamperometría de la PPG (A) inmovilizada sobre ESPC en presencia de diferentes cantidades de H_2O_2 en 7 mL de PBS 100 mM, pH 7,8; potencial de trabajo -645 mV (vs Ag). Curva de calibración (B) de la corriente catódica vs concentración de H_2O_2 .

Tabla 2. Comparación de parámetros analíticos de electrodos modificados con peroxidasa para determinación de H₂O₂.

Electrodo modificado	Potencial redox (V)	Rango lineal (μM-mM)	Límite de detección (μM)	Ref.
PRP/AuNP/Au electrodo	-0,3	0,48-1,2	0,16	(35)
PRP/GF/electrodo de carbono	-0,36	3,5-3,3	1,17	(36)
PRP/ITO/dendrímico/QS/Au electrodo	-0,28	165-1,5	200	(37)
PPR/QS-GLU/GF electrodo	-1	100-5	87	(8)
PPG/GF electrodo	-0,65	100-4	150	(5)
PPG/PCs electrodo	-0,64	500-6	45,21	Este estudio

PRP: peroxidasa de rábano picante; ITO: óxido de indio y estaño; QS: quitosano; PPR: peroxidasa de palma real; GF: grafeno; PPG: peroxidasa de pasto guinea; PCs: puntos cuánticos

Conclusiones

El biosensor amperométrico de ESPC-PPG obtenido en este estudio mostró una respuesta rápida y eficaz en la determinación del peróxido de hidrógeno. La caracterización electroquímica por VCs permitió evidenciar la inmovilización de la enzima sobre los electrodos de puntos cuánticos gracias a la presencia de la señal redox del Fe²⁺/Fe³⁺ típica de las peroxidasa y ubicada en potenciales 17 mV/ - 141 mV. El biosensor presentó una rápida respuesta en la determinación del peróxido, además de una alta sensibilidad y un bajo límite de detección. Finalmente, el biosensor fabricado en este estudio se convierte en una potencial herramienta bio-analítica para la detección de peróxido de hidrógeno en diferentes tipos de matrices biológicas o ambientales.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero suministrado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (Proyecto de Convocatoria Interna No. 5762) de la Universidad Industrial de Santander.

Referencias bibliográficas

- [1] Moyo M, Okonkwo JO, Agyei NM. An amperometric biosensor based on horseradish peroxidase immobilized onto maize tassel-multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode for determination of heavy metal ions in aqueous solution. *Enzyme Microb Technol.* 2014;56:28–34.
- [2] Shi L, Liu X, Niu W, Li H, Han S, Chen J, et

al. Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of soybean peroxidase immobilized on single-walled carbon nanohorn modified electrode. *Biosens Bioelectron.* 2009;24(5):1159–63.

- [3] Wang Y, Du J, Li Y, Shan D, Zhou X, Xue Z, et al. A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;90:62–7.
- [4] Sakharov IY, Vesgac B MK, Galaev IY, Sakharova IV, Pletjushkina OY. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*: Purification and some properties. *Plant Sci.* 2001;161(5):853–60.
- [5] Centeno DA, Solano XH, Castillo JJ. A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry.* 2017;116:33-8.
- [6] Orduz AE, Gutiérrez JA, Blanco SI, Castillo JJ, Salcedo-reyes JC. Amperometric detection of triclosan with screen-printed carbon nanotube electrodes modified with Guinea Grass (*Panicum maximum*) peroxidase. 2019;24(2):363–79.
- [7] Vargas JA, Castillo JJ. Desarrollo de un prototipo de biosensor basado en peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) y nanotubos de péptidos inmovilizados sobre electrodos de oro para detección de peróxido de hidrógeno. *Av en Quim.* 2016;11(3):105–11.
- [8] Villamizar EN, Ríos CA, Castillo JJ. 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. *J Mex Chem Soc.* 2016;60(3):135-40.
- [9] Tian K, Nie F, Luo K, Zheng X, Zheng J. A sensitive electrochemiluminescence glucose biosensor based on graphene quantum dot prepared from graphene oxide sheets and hydrogen peroxide. *J Electroanal Chem.* 2017;801:162-70.
- [10] Muthurasu A, Ganesh V. Horseradish Peroxidase Enzyme Immobilized Graphene Quantum Dots as Electrochemical Biosensors. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174(3):945-59.
- [11] Manan FAA, Hong WW, Abdullah J, Yusof NA, Ahmad I. Nanocrystalline cellulose decorated quantum dots based tyrosinase biosensor for phenol determination. *Mater Sci Eng C.* 2019;99:37-46.
- [12] Tang J, Wang B, Wu Z, Han X, Dong S, Wang E. Lipid membrane immobilized horseradish peroxidase biosensor for amperometric determination of hydrogen peroxide. *Biosens Bioelectron.* 2003;18(7):867-72.
- [13] Cinti S, Arduini F, Vellucci G, Cacciotti I, Nanni F, Moscone D. Carbon black assisted tailoring of Prussian Blue nanoparticles to tune sensitivity and detection limit towards H₂O₂ by using screen-printed electrode. *Electrochem commun.* 2014;47:63-6.
- [14] Gatselou VA, Giokas DL, Vlessidis AG, Prodromidis MI. Rhodium nanoparticle-modified screen-printed graphite electrodes for the determination of hydrogen peroxide in tea extracts in the presence of oxygen. *Talanta.* 2015;134:482-7.
- [15] Sun J, Fang H, Chen H. Immobilization of horseradish peroxidase on a self-assembled monolayer modified gold electrode for the detection of hydrogen peroxide. *Analyst.* 1998;123(6):1365-8.
- [16] Chen W, Cai S, Ren QQ, Wen W, Zhao YDi. Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: A review. *Analyst.* 2012;137(1):49-58.
- [17] Xu X, Liu S, Ju H. A Novel Hydrogen Peroxide Sensor via the Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase Immobilized on Colloidal Gold Modified Screen-printed Electrode. *Sensors.* 2003;3(9):350-60.
- [18] Chen S, Yuan R, Chai Y, Xu L, Wang N, Li X, *et al.* Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on the layer-by-layer assembly films of gold colloidal nanoparticles and toluidine blue. *Electroanalysis.* 2006;18:471-7.
- [19] Uribe PA, Ortiz CC, Centeno DA, Castillo JJ, Blanco SI, Gutierrez JA. Self-assembled Pt screen printed electrodes with a novel peroxidase *Panicum maximum* and zinc oxide nanoparticles for H₂O₂ detection. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2019;561:18-24.
- [20] Battistuzzi G, Bellei M, Bortolotti CA, Sola M. Redox properties of heme peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* 2010;500(1):21-36.
- [21] Belcarz A, Ginalska G, Kowalewska B, Kulesza P. Spring cabbage peroxidases - Potential tool in biocatalysis and bioelectrocatalysis. *Phytochemistry.* 2008;69(3):627-36.
- [22] Brusova Z, Ferapontova E, Sakharov I, Magner E, Gorton L. Bioelectrocatalysis of Plant Peroxidases Immobilized on Graphite in Aqueous and Mixed Solvent Media. *Electroanalysis.* 2005;17(5-6):460-8.
- [23] Ramírez EA, Granero AM, Zon MA, Fernández H. Development of an Amperometric Biosensor Based on Peroxidases from *Brassica napus* for the Determination of Ochratoxin A Content in Peanut Samples. *J Biosens Bioelectron S.* 2011;3:1-6.
- [24] Castillo J, Ferapontova E, Hushpalian D, Tasca F, Tishkov V, Chubar T, *et al.* Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of H₂O₂ reduction of recombinant tobacco peroxidase on graphite. Effect of peroxidase single-point mutation on Ca²⁺ modulated catalytic activity. *J Electroanal Chem.* 2006;588(1):112-21.
- [25] Ruzgas T, Csöregi E, Emnéus J, Gorton L, Marko-Varga G. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Anal Chim Acta.* 1996;330(2-3):123-38.
- [26] Xu S, Zhang X, Wan T, Zhang C. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase cross-linked to multi-wall carbon nanotubes. *Microchim Acta.* 2010;172(1-2):199-205.
- [27] Zhang H-L, Zou X-Z, Lai G-S, Han D-Y, Wang F. Direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on carbon-coated iron nanoparticles for amperometric detection of hydrogen peroxide. *Electroanalysis.* 2007;19(18):1869-74.
- [28] Moyo M, Okonkwo JO, Agyei NM. A novel

- hydrogen peroxide biosensor based on adsorption of horseradish peroxidase onto a nanobiomaterial composite modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*. 2013;25(8):1946–54.
- [29] Wang Z, Xu Q, Wang H-Q, Yang Q, Yu J-H, Zhao Y-D. Hydrogen peroxide biosensor based on direct electron transfer of horseradish peroxidase with vapor deposited quantum dots. *Sensors Actuators B Chem*. 2009;138(1):278–82.
- [30] Yin H, Ai S, Shi W, Zhu L. A novel hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on gold nanoparticles–silk fibroin modified glassy carbon electrode and direct electrochemistry of horseradish peroxidase. *Sensors Actuators B Chem*. 2009;137(2):747–53.
- [31] Kang XB, Pang GC, Liang XY, Wang M, Liu J, Zhu WM. Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan. *Electrochim Acta*. 2012;62:327–34.
- [32] Ma L, Yuan R, Chai Y, Chen S. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA-silver nanohybrids and PDDA-protected gold nanoparticles. *J Mol Catal B Enzym*. 2009;56(4):215–20.
- [33] Kuposova E, Shumilova G, Ermolenko Y, Kisner A, Offenhäusser A, Mourzina Y. Direct electrochemistry of cyt c and hydrogen peroxide biosensing on oleylamine- and citrate-stabilized gold nanostructures. *Sensors Actuators B Chem*. 2015;207:1045–52.
- [34] Ahirwal GK, Mitra CK. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase-gold nanoparticles conjugate. *Sensors*. 2009;9(2):881–94.
- [35] Yagati A, Min J, Cho S. Electrosynthesis of ERGO-NP nanocomposite films for bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase towards H_2O_2 . *J. Electrochem. Soc*. 2014;166:133–40.
- [36] Zhang Q, Qiao Y, Zhang L, Wu S, Zhou H, Song X. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on water soluble sulfonated graphene film via self-assembly. *Electroanalysis*. 2011;23:900–6.
- [37] Farzana S, Ganesh V, Berchmans S. A sensing platform for direct electron transfer study of horseradish peroxidase. *J. Electrochem. Soc*. 2013;160:573–80.