



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

Jesús A. Vargas, John J. Castillo*

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología GIBIM,
Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

(*) jcasleon@uis.edu.co

Recibido: 04/07/2016

Revisado: 18/10/2016

Aceptado: 17/11/2016

Resumen

En este trabajo se desarrolló un novedoso prototipo de biosensor enzimático para detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la co-inmovilización de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) (PPR) y nanotubos de péptidos (NTPs) mediante el uso de glutaraldehído (GA) como agente entrecruzante sobre electrodos serigrafados de oro. El desarrollo del electrodo enzimático comprendió primero la extracción y purificación de la peroxidasa de las hojas de la palma real. Posteriormente, la superficie de electrodos de oro fue modificada mediante la adsorción del conjugado PPR-NTP y su caracterización se llevó a cabo mediante voltamperometría cíclica (VC) y cronoamperometría. Los estudios de VC mostraron un potencial redox de trabajo de la PPR de -0.4 V contra un electrodo de referencia Ag/AgCl. El biosensor enzimático presentó una respuesta en corriente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. El estudio de los parámetros analíticos mostró un rango lineal en un intervalo de 500-6000 μM , una sensibilidad de calibrado de 0,022 $\mu A \cdot L/mol$ y un límite de detección de 432 μM . El proceso de transferencia de electrones enzima-electrodo estuvo controlado superficialmente y dependió del pH de la solución. El prototipo de biosensor enzimático desarrollado en éste estudio se convierte en una potencial herramienta bio-analítica para la detección de H_2O_2 en muestras reales de interés biomédico y ambiental.

Palabras claves: biosensor; peroxidasa de palma real, nanotubos de péptido

Abstract

Development of a prototype biosensor based on real palm peroxidase (*Roystonea regia*) and nanotubes of peptides immobilized on gold electrodes for detection of hydrogen peroxide. In this work we developed a novel H_2O_2 enzymatic biosensor through the co-immobilization of royal palm tree peroxidase (RPTP) (*Roystonea regia*) with peptide nanotubes (PNTs) on screen-printed gold electrodes employing glutaraldehyde as a cross-linking agent. The biosensor development begins with the isolation and purification of peroxidase from the leaves of palm tree. Then the surface of the electrode was modified by adsorption of the conjugate RPTP-PNT and the electrochemical characterization was made by cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry techniques. The CVs exhibited a redox potential around -0.4 V using an Ag/AgCl reference electrode. The enzymatic biosensor shows a catalytic response towards different hydrogen peroxide concentrations. Analytical parameters such as: linear range, sensibility and detection limit exhibited values of 500-6000 μM , 0.022 $\mu A \cdot L/mol$ and 432 μM , respectively. A surface-controlled process electron transfer was observed and the biosensor exhibited a pH dependence. The novel biosensor presented in this work could be a potential bioanalytical tool for the detection of hydrogen peroxide in real samples of biomedical and environmental importance.

Keywords: Biosensor; Royal palm tree peroxidase; Peptide nanotubes.

Introducción

La determinación de H_2O_2 ha despertado considerable atención en los últimos años debido a su importancia en procesos relacionados con el cáncer y a sus efectos contaminantes en el medio ambiente¹. Los enormes avances en la instrumentación analítica moderna han dado lugar a una mejora en la selectividad, inclusive para análisis de trazas, mediante técnicas como: cromatografía de gases, espectrome-

tría de masas, cromatografía líquida de alta resolución, etc. Sin embargo, la gran mayoría de estas técnicas implican un elevado costo y consumo de tiempo, dada la necesidad de realizar pre-tratamientos a las muestras².

Como alternativa a estos inconvenientes surge el desarrollo de los denominados biosensores, dispositivos en los que se emplean sustancias de origen biológico para el reconocimiento de especies particulares y que representan sistemas

altamente sensibles y específicos³. Los biosensores juegan un rol determinante para abordar de modo rápido y confiable el análisis de un amplio espectro de especies: patógenos, compuestos asociados a procesos industriales, contaminantes ambientales, entre otros⁴.

La mayoría de biosensores utilizan la peroxidasa de rábano picante (PRP) (*Armoracia rusticana*) para la detección de peróxido de hidrógeno⁵⁻⁷; sin embargo, existen algunas limitaciones relacionadas con la estabilidad de ésta enzima como: desnaturalización de la peroxidasa en altas concentraciones de H₂O₂, altas temperaturas y pHs. De esta forma, surge la necesidad de encontrar nuevas enzimas con mejores propiedades catalíticas para el desarrollo de biosensores mejorados y más eficientes. Colombia es un país con excelentes recursos naturales prospectos a nuevas fuentes enzimáticas que pueden ser usadas para el desarrollo biotecnológico del país⁹. Esta biodiversidad da grandes ventajas competitivas que al ser basadas en el uso sostenible puede y debe convertirse en desarrollo científico para el país. Existe una gran motivación para encontrar nuevas fuentes potenciales de la peroxidasa (POD) con posibles aplicaciones para la construcción de biosensores amperométricos. En 2005, Alpeeva y cols.¹⁰ realizaron un estudio comparativo utilizando PRP, peroxidasa de batata dulce (PBD) (*Ipomea batatas*) y peroxidasa de palma real (PPR) (*Roystonea regia*). En este estudio se evaluaron parámetros analíticos tales como: nivel mínimo de detección, rango lineal de trabajo, estabilidad operacional y de almacenamiento. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento diferente para cada uno de los biosensores destacando la superioridad del biosensor de PPR.

El uso de la nanotecnología es, sin duda, una herramienta potente a la hora de diseñar biosensores¹¹, ya que estos nanomateriales (nanotubos de carbono, nanotubos de péptidos o cualquier estructura con al menos una dimensión menor a 100 nm) presentan propiedades únicas como buena conductividad y biocompatibilidad por lo que mejoran la transferencia de carga desde las enzimas hacia los electrodos^{12,13}. Los nanotubos de péptidos surgen como una alternativa hacia los ya usados nanotubos de carbono, además, presentan otras ventajas en comparación a estos últimos como facilidad a la hora de su síntesis y mayor reactividad¹⁴.

En este trabajo se utilizó la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*) adsorbida sobre electrodos de oro modificados con NTPs y GA para la construcción de un novedoso biosensor sensible a la presencia de H₂O₂.

Materiales y métodos

Extracción y semi-purificación de la peroxidasa de palma real

La extracción y semi-purificación de la PPR se llevó a cabo por medio de la metodología utilizada por Sakharov¹⁵. El extracto fue semi-purificado mediante un sistema de reparto bifásico compuesto por sulfato de amonio (10 % p/v) y

polietilenglicol (14 % p/v). Posteriormente el extracto fue sometido a diferentes etapas cromatográficas. Finalmente se midió la actividad enzimática utilizando como sustrato el guayacol y se determinó la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol, a 470 nm, con un coeficiente de extinción molar del producto de 5200 M⁻¹.cm⁻¹. La determinación de la concentración de proteínas en la solución enzimática de POD se hizo utilizando el método de Bradford¹⁵.

Síntesis de los nanotubos de péptido

La metodología para la formación de los NTPs ha sido descrita anteriormente¹⁴. Se añadieron 100 mg de difenil-alanina a 1 mL de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP). De esta solución se tomaron 20 µL y se diluyeron a 1 mL, usando agua ultrapura. La concentración final fue de 2 mg/mL. Detalles adicionales de la obtención de los NTPs puede ser encontrada en la información de soporte (Fig. S1)

Modificación de los electrodos serigrafados de oro

Se utilizaron electrodos serigrafados de oro (DRP-220 AT, Dropsense) adquiridos comercialmente. Para la modificación de los electrodos se preparó una solución que contenía NTPs y POD en relación 1:1 v/v, luego se añadió GA en concentración 0,25 % p/v y se agitó durante 1 minuto a 50 rpm. La solución de PPR/GA/NTP se conservó a una temperatura de 4 °C durante 2 h antes de su uso. 10 µL de solución de la solución preparada anteriormente se depositaron sobre la superficie del electrodo de trabajo y se almacenó a 4 °C durante 12 h. Posteriormente la superficie del electrodo fue lavada suavemente con buffer fosfato pH 7,0 para eliminar el exceso de enzima, GA y NTPs que no se adsorbieron sobre el electrodo. En la figura S2 (información de soporte) se puede apreciar el efecto de la presencia de la POD en el electrodo modificado comparado con el electrodo sin modificar en el proceso redox del ferrocianuro de potasio. Todas las mediciones fueron realizadas utilizando un Potenciostato/Galvanostato Autolab y los datos fueron procesados mediante el software NOVA 1.10.1.9.

Reducción bioelectroquímica del peróxido de hidrógeno.

La caracterización cualitativa de la reducción bioelectroquímica del peróxido de hidrógeno se hizo por VC. Para ello se tomaron VCs de electrodos previamente modificados con 10 µL de la enzima, los cuales se pusieron en contacto dentro de una celda de acrílico de 7 mL de capacidad conteniendo una solución tampón de fosfatos 10 mM, pH 7,0; KCl 0,1 M y H₂O₂ 5 mM. Todas las soluciones fueron desgasificadas usando nitrógeno para evitar interferencias con el oxígeno molecular.

Estudio del efecto de la velocidad de barrido

Se tomaron VCs de una solución tampón de fosfatos 10 mM pH 7,0; H₂O₂ 1 mM a velocidades de barrido comprendidas entre 25 y 500 mV/s.

Estudio del efecto del pH

Se midió el VC de las siguientes soluciones tampón: 10 mM ácido cítrico/citrato trisodio (pH 3,0), 10 mM ácido acético/acetato de sodio (pH 5.0), 10 mM fosfato de potasio dibásico/fosfato de potasio monobásico (pH 6,0; 7,0 y 8,0) y 10 mM carbonato de sodio/bicarbonato de sodio (pH 10). Cada solución contenía H₂O₂ 5 mM y la velocidad de barrido lineal fue de 100 mV/s.

Estudio de los parámetros analíticos

Mediante la construcción de curvas de calibración a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno se determinaron los siguientes parámetros analíticos: rango lineal del método, límite de detección y sensibilidad del método, para ello se utilizó cronoamperometría. Se utilizó un potencial fijo de -0.4 V y se usaron concentraciones de peróxido de hidrógeno en un rango de 1 a 5000 µM durante un tiempo de aproximadamente 12 min. Todas las mediciones fueron realizadas utilizando triplicados mediante la fabricación de electrodos preparados bajo las mismas condiciones.

Resultados

Purificación parcial de la peroxidasa de palma real

En la tabla 1, conocida como tabla de rendimiento, se puede observar la efectividad de cada una de las etapas usadas durante la purificación proteica de la peroxidasa. Como es normal, a medida que transcurre el proceso, el rendimiento se reduce y la muestra se va enriqueciendo en el compuesto de interés.

Finalmente las fracciones recogidas conteniendo la POD fueron incubadas a 4 °C para la modificación de los electrodos de oro y el diseño del biosensor.

Modificación física de los electrodos de oro para la determinación de peróxido de hidrógeno.

Para el desarrollo del biosensor, los electrodos de oro se modificaron depositando una solución que contenía NTP, PPR en una relación 1:1 y GA en concentración 0,25 % p/v para la determinación de H₂O₂. Este proceso no es posible

con un electrodo de oro, grafeno o carbono vítreo que no cuente con la presencia de una enzima o de otra sustancia que pueda reducir el H₂O₂.

En esta conformación del biosensor, cada elemento juega un rol importante. Por un lado, los nanotubos de péptidos ofrecen una alternativa hacia los ya usados nanotubos de carbono (NTC), en cuanto a sus propiedades eléctricas, biocompatibilidad y, lo más importante, al proceso de transferencia de carga desde las proteínas hacia el electrodo¹², además, químicamente los NTP son más reactivos en contraste con los NTC, por lo que no requiere su funcionalización¹⁴.

En segundo lugar, el GA sirve como un agente entrecruzante entre la enzima y los nanotubos. El grupo aldehído del GA puede reaccionar con los grupos aminos de los aminoácidos tanto de los nanotubos como de la enzima para formar bases de Schiff¹⁷. El uso del GA ha sido reportado anteriormente tanto para hacer uniones NTC-enzima¹⁸, como para NTP-enzima¹⁹.

Finalmente la peroxidasa de palma real transfiere los electrones desde el grupo hemo hacia el H₂O₂ para su reducción. La peroxidasa de palma real es el componente biológico en nuestro biosensor.

Reducción bioelectroquímica del peróxido de hidrógeno.

La reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno fue estudiada mediante VC en ausencia/presencia de peróxido de hidrógeno a una velocidad de barrido lineal de 100 mV/s.

La figura 1 muestra los VCs obtenidos en una solución tampón fosfato 10 mM pH 7 con H₂O₂ 5 mM. El VC del electrodo sin modificar no muestra ningún tipo de señal como respuesta luego de la adición de peróxido de hidrógeno a la solución, esto demuestra que la PPR es un componente esencial para la construcción del biosensor. Por otro lado el VC del electrodo modificado muestra un pico bien definido debido a la reducción bio-electrocatalítica del H₂O₂ alrededor de los -0,4 V. Este hecho demuestra la transferencia directa de electrones desde la enzima hacia el electrodo, gracias al puente de comunicación formado por los nanotubos y el GA como agente entrecruzante. Además

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

Etapas de Purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de Purificación *	Porcentaje de Rendimiento *
Extracción	112	58,9	4559,4	77,467	1,0	100,0
Reparto bifásico	46	12,8	2512,0	196,942	2,5	55,1
Cromatografía hidrofóbica	14,8	5,3	1372,6	259,652	3,4	30,1
Cromatografía de exclusión por tamaño	20	5,0	2505,4	504,343	6,5	55,0

* Los factores de purificación y rendimiento fueron calculados siguiendo el procedimiento utilizado por Sakharov y cols.¹⁶

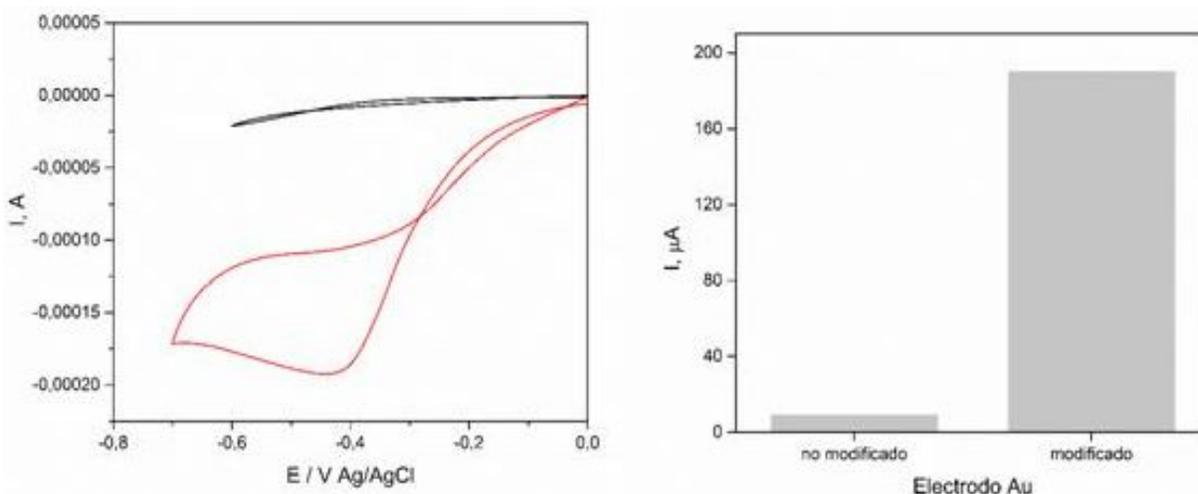


Fig. 1: VC de electrodos serigrafiados de oro sin modificar (-) y modificados (-) en presencia de H_2O_2 5 mM. Comparación de la corriente bioelectrocatalítica de los electrodos modificados y sin modificar. Velocidad de barrido 100 mV/s.

el método de unión entre los componentes no involucra el sitio catalítico de la enzima. En la figura S3 (información de soporte) se compara la respuesta bioelectrocatalítica de los electrodos sin modificar, modificado con PPR, modificado con NTP y el electrodo PPR/GA/NTP.

El mecanismo de detección del peróxido por parte de la POD engloba una oxidación de dos electrones del grupo ferri-hemoprostético de la peroxidasa nativa por el H_2O_2 . Esta reacción da lugar a un producto intermedio, compuesto I (estado de oxidación +5), que consiste en un ion oxiferrilo ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$) y un radical catiónico porfirínico π . El compuesto I tiene actividad catalítica y su radical porfirínico capta un electrón del electrodo originando el compuesto II el cual toma de nuevo otro electrón del electrodo para volver a su estado inicial de ferropoxidasa. Además el compuesto II muestra

una mayor estabilidad que el compuesto I, y el proceso de reducción del compuesto II hacia la PPR nativa es lento²⁰. Se concluye entonces que el proceso de reducción del compuesto II es el detectado en este experimento²¹.

Estudio de la velocidad de barrido en la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno.

La figura 2A muestra los VCs obtenidos en solución tampón 10 mM pH 7 con H_2O_2 1 mM a diferentes velocidades de barrido lineal. Con el incremento de la velocidad de barrido de 50 a 500 mV/s, la corriente del pico de reducción del H_2O_2 incrementa de manera proporcional en este rango. Así la reacción en el electrodo es típica de un proceso reversible controlado difusionalmente en la superficie²².

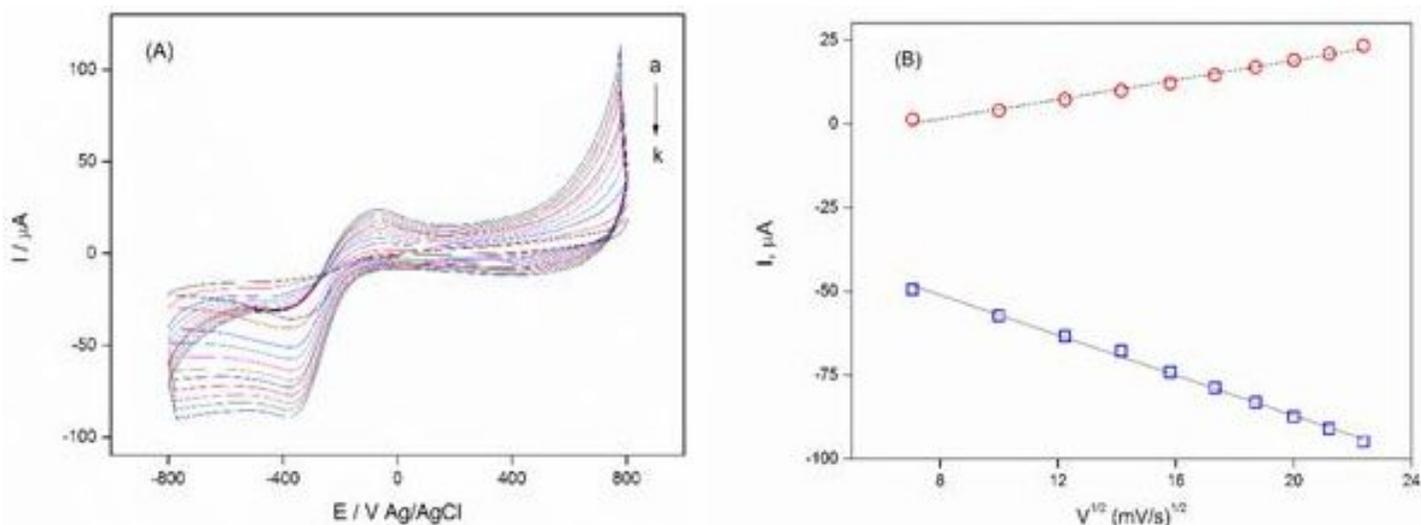


Fig. 2: A) VCs del electrodo modificado con PPR/GA/NTP en una solución tampón 10 mM pH 7 KCl 0,1 M, H_2O_2 1 mM a diferentes velocidades de barrido de la (a) a la (k): (a) 25, (b) 50, (c) 100, (d) 150, (e) 200, (f) 250, (g) 300, (h) 350, (i) 400, (j) 450, (k) 500 mV/s. B) Corriente del pico catódico y anódico vs raíz cuadrada de la velocidad del barrido lineal.

Los picos anódico y catódico incrementan linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido desde 50 hasta 500 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

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

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

Anteriores autores tales como Luet *al.*, 2009⁷ reportaron procesos reversibles para electrodos de oro modificados con HRP en el rango de 50-700 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Es bien sabido que el pH influye en la conformación de la enzima y sus propiedades biocatalíticas²². Como se observa en la figura 3 entre pH 5,0 y pH 7,0, la enzima mantiene hasta un 93 % de su actividad catalítica, a medida que el pH se desplaza hacia valores ácidos no hay respuesta por parte del biosensor, pero, en cambio hay respuesta significativa a pH básico (pH 10). Cabe resaltar que la POD de palma exhibe un mayor rango de trabajo que la HRP cuyo rango de pH está limitado únicamente a valores entre 6,0 y 8,0²².

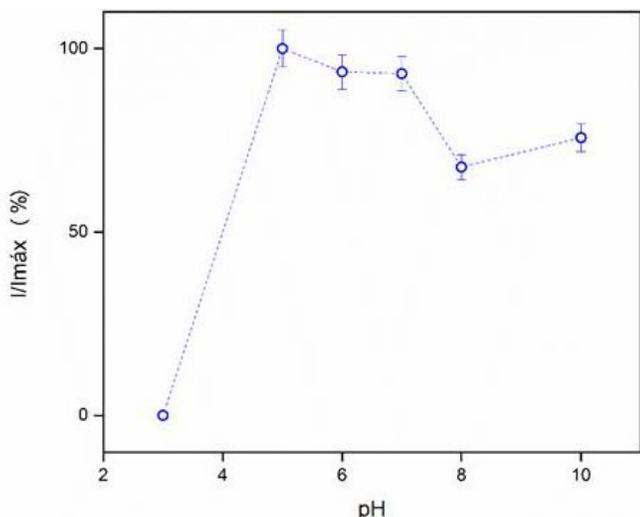


Fig. 3: Dependencia de la respuesta del biosensor en función del pH. Todas las mediciones de pH fueron realizadas por triplicado.

Respuesta del biosensor a adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno por cronoamperometría.

Se usó cronoamperometría para evaluar el cambio de corriente en el tiempo cuando se variaba la concentración de H_2O_2 en una solución tampón y así hallar la sensibilidad y la linealidad de la respuesta del electrodo PPR/GA/NTP mediante la construcción de curvas de calibración. El voltaje aplicado fue de -0,4 V vs Ag/AgCl, resultado que se dedujo de la señal obtenida en los VCs (Fig. 1).

La figura 4A muestra el cronoamperograma del electrodo PPR/GA/NTP luego de sucesivas adiciones de alícuotas de 100 μL de H_2O_2 en un rango de concentraciones desde 500 hasta 6000 μM . Como experimento control se realizaron las mismas adiciones de H_2O_2 a un electrodo sin modificar (Fig. 4A). Lo anterior confirma que la detección de H_2O_2 es debido a la presencia de la PPR inmovilizada sobre los electrodos de oro. En la figura 4B se aprecia la curva de calibración obtenida con los valores de la corriente a diferentes concentraciones de H_2O_2 .

Como se observa en la figura 4A hay una relación lineal entre la corriente y la concentración de peróxido en el rango de 500 μM hasta 6000 μM . La ecuación que se ajusta por regresión lineal de los datos está dada a continuación:

$$i (\mu\text{A}) = -0,02461 ([\text{H}_2\text{O}_2] \text{ mM}) - 44,262$$

Esta ecuación presenta un coeficiente de correlación r^2 de 0,9853. Este valor indica cuanto se ajusta la ecuación de la recta a los datos obtenidos. A partir de 400 s el valor de la corriente presenta cierto nivel de ruido debido probablemente a una desorción de la enzima lo cual dificultó la lectura del valor de la corriente. La sensibilidad del método se define entonces como el valor absoluto de la pendiente, es decir, 0,02461 para un electrodo modificado PPR/GA/NTP en un rango de 500-6000 μM .

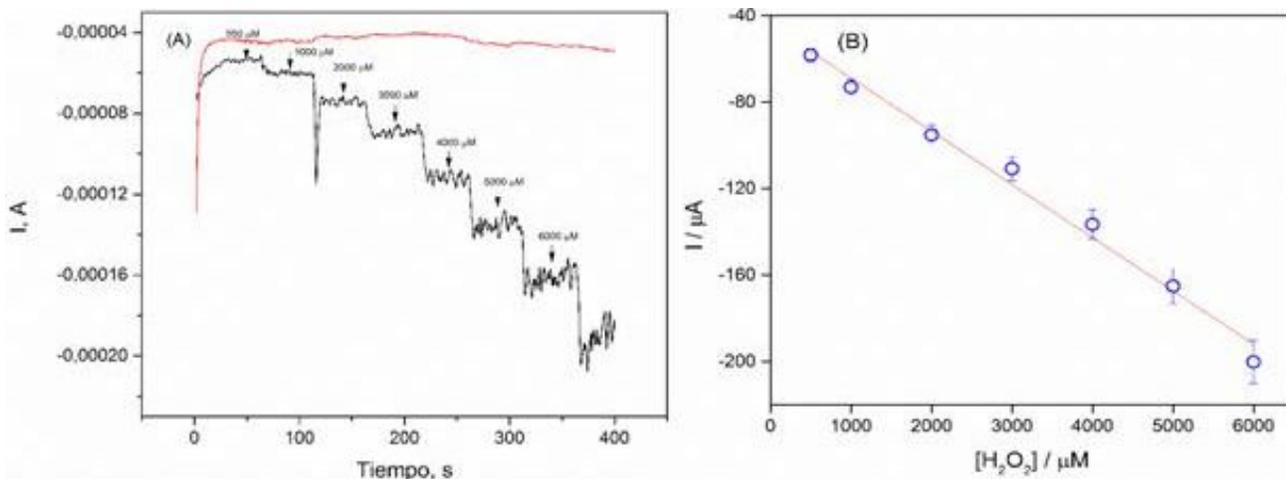


Fig. 4: Respuesta corriente vs tiempo para la adición de H_2O_2 a una diferencia de potencial de -0,4 V vs Ag. A) Electrodo sin modificar (-) y electrodo modificado con PPR/GA/NTP (-) y B) Curva de calibración obtenida de los datos de la cronoamperometría a diferentes concentraciones de peróxido (500-6000 μM). Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

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

El LD fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{LD}=(k*s_b)/m \quad (1)$$

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.

En el desarrollo del presente trabajo se exploran nuevas fuentes de obtención de enzimas con aplicaciones analíticas. La PPR es una alternativa con mejores características (rango de trabajo según el pH, estabilidad térmica) a la ya estudiada HRP^{8,16}. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían abrir interesantes perspectivas para el desarrollo de biosensores novedosos usando fuentes naturales propias como elementos de reconocimiento biológico y para el diseño e investigación en la fabricación de novedosos sistemas de detección y así solucionar los problemas que la sociedad demanda hoy en día.

Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un novedoso sistema de detección de peróxido de hidrógeno basado en un biosensor amperométrico de peroxidasa de palma real y nanotubos de péptido. El análisis electroquímico indicó que el sistema PPR/GA/NTP exhibió un potencial de trabajo alrededor de -0,4 V vs Ag/AgCl en presencia de soluciones de H_2O_2 . La cronoamperometría permitió la obtención de curvas de calibración para la determinación de figuras de mérito como: rango lineal, sensibilidad de calibrado y límite de detección, las cuales arrojaron valores de 500-6000 μM , 0,02461 μA L/mol y 432 μM , respectivamente. El desarrollo del biosensor amperométrico abre así nuevas posibilidades de construcción de novedosos sistemas de detección de analitos de importancia biomédica y ambiental.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Industrial de Santander por el apoyo recibido mediante el proyecto de Convocatoria Interna número 1782 y al programa Capital Semilla número 1735.

Referencias

1. S Xu, X Zhang, T Wan, C Zhang. A third generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase cross-linked to multi-walled carbon nanotubes. **Microchimica Acta**, **172**, 199-205 (2011).
2. JJ Castillo, WE Svendsen, N Rozlosnik, P Escobar, F Martínez, J Castillo-León. Detection of cancer cells using a peptide nanotube-folic acid modified graphene electrode. **Analyst**, **138**, 1026-1031 (2013).
3. J Castillo-León, S Gaspar, S Leth, M Niculescu, A Mortari, I Bontidean, V Soukharev, S Domeanu, A Ryabov, E Csöregi. Biosensors for life quality: Design, development and applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **102**, 179-194 (2004).
4. M Lei, J Feng, L Wu, J Zhou, J Chen, A Wang. Novel phenol biosensor based on laccase immobilized on reduced graphene oxide supported palladium-copper alloyed nanocages. **Biosensors and Bioelectronics**, **74**, 347-352 (2015).
5. S Xu, J Li, Z Zhou, C Zhang. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized by sol-gel thin film on a multi-walled carbon nanotube modified electrode. **Analytical Methods**, **6**, 6310-6315 (2014).
6. G Lai, H Zhang, D Han. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase by carbon-coated iron nanoparticles in combination with chitosan and cross-linking of glutaraldehyde. **Microchimica Acta**, **165**, 159-165 (2009).
7. X Xu, S Li, H Ju. A novel hydrogen peroxide sensor via the direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on colloidal gold modified screen-printed electrode. **Sensors**, **3**, 350-360 (2003).
8. I Sakharov, A Vorobiev, J Castillo. Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, **33**, 661-667 (2003).
9. I Sakharov, G Bautista, I Sakharova. Peroxidasas de plantas tropicales. **Revista Colombiana de Química**, **28**, 97-106 (1999).
10. I Alpeeva, M Niculescu, J Castillo-León, E Csöregi, I Sakharov. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique properties characteristics for hydrogen peroxide monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, **21**, 742-748 (2005).
11. Y Wang, H Chang, H Wu, H Liu. Bioinspired prospects of graphene: from biosensing to energy. **Journal of Materials Chemistry B**, **1**, 3521-3524 (2013).
12. B Park, R Zheng, K Ko, B Cameron, D Yoon, D Kim. A novel glucose biosensor using bi-enzyme incorporated with peptide nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**, **38**, 295-301 (2012).
13. B Park, D Yoon, D Kim. Encapsulation of enzymes inside peptide nanotubes for hydrogen peroxide detection. **Electrochemical Society Transactions**, **33**, 25-29 (2010).
14. J Castillo, T Rindzevicius, K Wu, M Schmidt, K Janik, A Boisen, W Svendsen, J Castillo-León. Synthesis and characterization of covalent diphenylalanine nanotube-folic acid conjugates. **Journal of Nanoparticle Research**, **16**, 1-8 (2014).
15. M Bradford. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**, 248-254 (1976).
16. I Sakharov, M Vesga, I Galaev, I Sakharova, O Pletjushkina. Peroxidase from leaves of royal palm tree *Roystonea regia*:

purification and some properties. **Plant Science**, **161**, 853-860 (2001).

17. R Pauliukaite, E Ghica, O Filho-Fatibello, C Brett. Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes with a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode. **Analytical Chemistry**, **81**, 5364-5372 (2009).
18. M Yemini, M Reches, E Gazit, J Rishpon. Peptide nanotube-modified electrodes for enzyme-biosensor applications. **Analytical Chemistry**, **77**, 5155-5159 (2005).
19. J Castillo, E Ferapontova, D Hushpulia, F Tasca, V Tishkov, T Chubar, I Gazaryan, L Gorton. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of H₂O₂ reduction of recombinant tobacco peroxidase on graphite. Effect of peroxidase single-point mutation on Ca²⁺-modulated catalytic activity. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, **588**, 112-121 (2006).
20. E. Ferapontova, L. Gorton. (2001). Effect of proton donors on direct electron transfer in the system gold electrode-horseradish peroxidase. **Electrochemistry Communications**, **3**, 767-774.
21. T Tangkuaraman, C Ponchio, T Kangkasomboon, P. Katikawong, W Veerasai. Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan. **Biosensors and Bioelectronics**, **22**, 2071-2078 (2007).
22. L Gary, J Long. Limit of detection a closer Look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, **55**, 712A-724A (1983).

Información de soporte

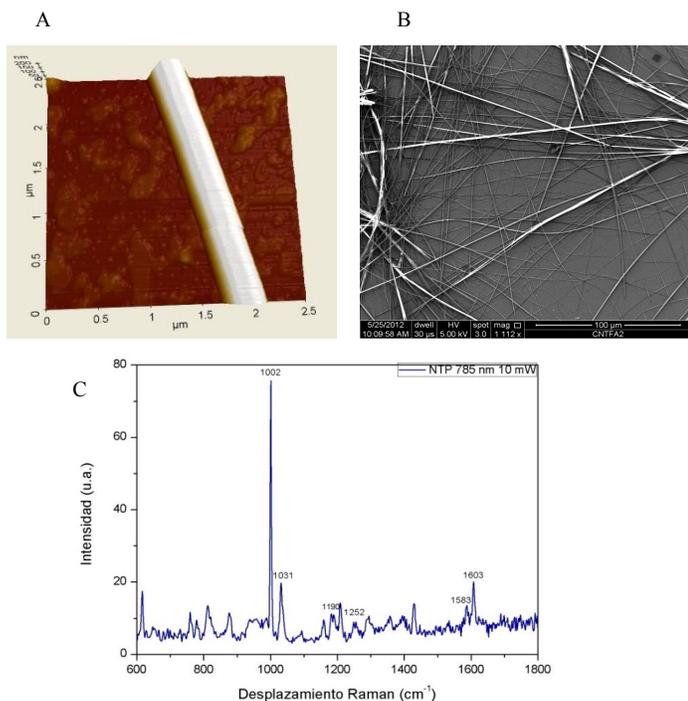


Fig. S1: (A) Microscopia de fuerza atómica (AFM), por sus siglas en inglés de NTP; (B) Imagen SEM de una muestra de NTPs y (C) Espectro Raman de las principales vibraciones de los NTPs.

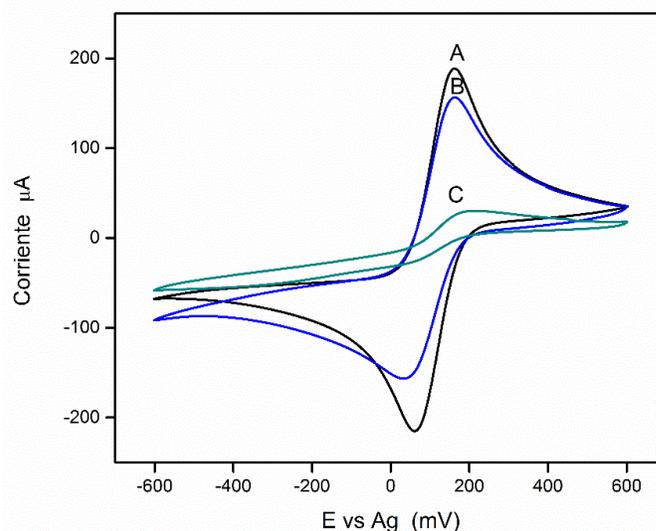


Fig. S2: VCs de (A) electrodo de oro, (B) electrodo modificado con PPR y (C) electrodo modificado con NTPs-PPR. Ferrocianuro de potasio 10 mM, velocidad de barrido 100 mV/s.

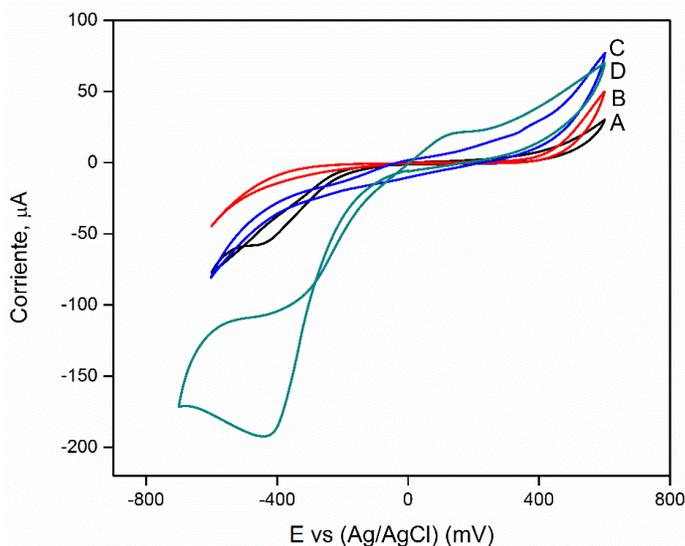


Fig. S3: VCs de (A) electrodo de oro, (B) electrodo modificado con PPR y (C) electrodo modificado con NTPs-PPR. Solución tampón 10 mM pH 7,0 KCl 0,1 M, H₂O₂ 1 mM; velocidad de barrido 100 mV/s.