

Estudio de las propiedades bioelectroquímicas de la peroxidasa de la limonaria
(*Cymbopogon citratus*)

Ella Sofia Rodríguez Ortiz

Director

Doctor en Química, John Jairo Castillo León

Codirector

Doctor en Química, Herminul De Jesús Cano Calle

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Ciencias

Escuela De Química

Bucaramanga

2024

Agradecimientos

A Ella y Rito por su amor, apoyo y guía, porque sin ustedes nada sería posible.

A Tita y Dei por los tiernos cuidados, las complicidades y las peleas.

A Ely, Camilo, Cath, Diego, Juanma, Karen, Archi, Sara, Silvia y Sofi

por resistir y compartir la vida conmigo.

A Naturalistas por las preciosas experiencias,

por ayudarme a descubrir lo que me apasiona y por creer en mí.

A la música que me sostiene en los momentos más duros.

A los profesores John y Hermínsul por su orientación en la realización de este proyecto.

A Stefanía por su valiosa asesoría,

A Martica por amablemente prestar el espacio del laboratorio,

y a las compañeras del laboratorio 404 por el lindo ambiente

Tabla de contenido

Introducción.....	12
1. Marco de Referencia.....	14
2. Marco teórico.....	17
2.1 Oxidorreductasas	17
2.2 Peroxidasas	18
2.2.1 Clasificación de las peroxidasas.....	19
2.2.2 Ciclo catalítico.....	21
2.3 Propiedades moleculares de las peroxidasas	23
2.3.1 Estabilidad en pH	23
2.3.2 Estabilidad en temperatura	23
2.4 Electroforesis	24
2.5 Generalidades de la limonaria (<i>Cymbopogon citratus</i>)	24
2.6 Biosensores	25
2.6.1 Biosensores electroquímicos	26
2.6.2 Biosensores electroquímicos con peroxidasas.	28
2.6.3 Voltamperometría cíclica.....	28
3. Metodología.....	32
3.1 Reactivos.....	32
3.2 Obtención de la peroxidasa.....	32
3.2.1 Recolección y extracción de la peroxidasa	32
3.3 Eliminación de pigmentos por reparto bifásico	33
3.4 Ultrafiltración.....	34
3.5 Medición de la concentración de proteínas por el método BCA	34
3.6 Determinación de la actividad enzimática	34
3.7 Determinación de la masa molecular por electroforesis	35
3.8 Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes pH.....	35
3.9 Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes temperaturas	36
3.10 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la peroxidasa.....	36
3.11 Inmovilización de la peroxidasa en electrodos serigrafiados de carbono modificados con óxido de grafeno.....	37

3.12 Caracterización de electrodos modificados por medio de voltamperometría cíclica con ferricianuro de potasio	38
3.13 Evaluación de la respuesta del electrodo modificado frente al peróxido de hidrógeno	39
3.14 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno	39
4. Análisis y resultados	40
4.1 Extracción y semi-purificación de la peroxidasa de limonaria	40
4.2 Caracterización bioquímica de la peroxidasa de limonaria	44
4.2.1 Estabilidad a diferentes pH	44
4.2.2 Termoestabilidad	46
4.2.3 Determinación de la masa molecular por electroforesis	49
4.3 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD	50
4.3.1 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente al guayacol	51
4.3.2 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente a la o-dianisidina	55
4.3.3 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente a la o-fenilendiamina	59
4.3.4 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente al ABTS.	61
4.4 Modificación y caracterización de los electrodos por métodos electroquímicos	65
4.5 Reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno	69
4.6 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno	73
5. Conclusiones	77
6. Recomendaciones	79
Referencias	80

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Biosensores electroquímicos para detección de H ₂ O ₂ con peroxidasas.....	16
Tabla 2 Clasificación de las enzimas según la reacción que catalizan. Tomado de Nelson (2009, p. 185)	18
Tabla 3 Clasificación de las peroxidasas hemo no animales	20
Tabla 4 Condiciones para el análisis de la especificidad sustrática	36
Tabla 5 Tabla de purificación para la peroxidasa extraída de las hojas de limonaria	43
Tabla 6 Propiedades bioquímicas de peroxidasas extraídas recientemente	45
Tabla 7 Condiciones estimadas para obtener las curvas de Michaelis Menten	64
Tabla 8 Valores de corriente y voltaje de los picos en los voltamperogramas cíclicos con PBS	66
Tabla 9 Valores de corriente y voltaje de los voltamperogramas cíclicos con K ₃ [Fe(CN) ₆]	68
Tabla 10 Valores de corriente y voltaje de los picos de los VCs a diferentes velocidades de barrido para el SPGE/CYPOD-RB.....	75
Tabla 11 Valores de corriente y voltaje de los picos de los VCs a diferentes velocidades de barrido para el SPGE/CYPOD-UF	75

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Estructura tridimensional de la peroxidasa de palma real (<i>Roystonea regia</i>).....	15
Figura 2 Superfamilias de peroxidasas de clase III.....	16
Figura 3 Clasificación filogenética de las peroxidasas	20
Figura 4 Mecanismo catalítico de las peroxidasas hemo	22
Figura 5 Limonaria (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	25
Figura 6 Estructura general de un biosensor.	26
Figura 7 Mecanismo del biosensor electroquímico de glucosa basado en glucosa oxidasa	27
Figura 8 Esquema del barrido de potencial en la voltamperometría cíclica.....	29
Figura 9 Notación de los voltamperogramas cíclicos	30
Figura 10 Forma de un voltamperograma cíclico.....	31
Figura 11 Montaje experimental para las mediciones de voltamperometría cíclica	38
Figura 12. Actividad relativa a diferentes pH de extracción	41
Figura 13 Etapas de obtención de la peroxidasa	42
Figura 14 Etapas de extracción y semi-purificación de la peroxidasa de limonaria (A) Extracción (B) Centrifugación (C) Fase clara del reparto bifásico (D) Concentrado de la ultrafiltración.	43
Figura 15 Actividad enzimática de la CYPOD a diferentes pH	44
Figura 16 Actividad relativa de la CYPOD a diferentes temperaturas.....	47
Figura 17 Actividad residual de la CYPOD en función del tiempo	48
Figura 18 Cinética de la inactivación térmica de la CYPOD	49
Figura 19 SDS-PAGE al 10% de las diferentes etapas de extracción	50

Figura 20 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de guayacol	53
Figura 21 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con guayacol como segundo sustrato.	54
Figura 22 Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H ₂ O ₂ y guayacol.	55
Figura 23 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de o-dianisidina.....	56
Figura 24 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con o-dianisidina como segundo sustrato.	57
Figura 25 Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H ₂ O ₂ y o-dianisidina.....	58
Figura 26 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de o-fenilendiamina	59
Figura 27 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con o-fenilendiamina como segundo sustrato.	60
Figura 28 Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H ₂ O ₂ y o-fenilendiamina.	61
Figura 29 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de ABTS..	62
Figura 30 Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con ABTS como segundo sustrato.....	63
Figura 31 Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H ₂ O ₂ y ABTS.....	64
Figura 32 Modificación de los SPGE con CYPOD	65
Figura 33 Voltamperogramas cíclicos medidos a 100mVs ⁻¹ en solución de PBS 100 mM pH 6.0 y 0,1M KCl en (a) SPGE (b) SPGE/CYPOD-UF (c) SPGE/CYPOD-RB.....	66

Figura 34 Voltamperogramas cíclicos medidos a 100 mVs-1 en solución 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ y 0,1M KCl de (a) SCPE (b) SPGE/CYPOD-UF (c) SPGE/CYPOD-RB.....	67
Figura 35 Voltamperograma cíclico de los electrodos con solución 1.0 mM de H_2O_2 y 0.1 M KCl a 50 mV/s de (a) SPGE (b) SPGE/CYPOD-RB (c) SPGE/CYPOD-UF	70
Figura 36 Mecanismo de la reducción bielectrocatalítica directa del peróxido de hidrógeno en electrodos modificados con peroxidasa	71
Figura 37 Voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno a 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM, 3.0 mM y 4.0 mM en KCl 0.1 M a 50 mVs-1 para (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF	71
Figura 38 Curva de calibración para el peróxido de hidrógeno a 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM, 3.0 mM y 4.0 mM en KCl 0.1 M para (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF ..	72
Figura 39 Voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido en solución 3 mM de H_2O_2 0,1 M KCl de (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF	74
Figura 40 Intensidad de corriente de los picos anódicos y catódicos en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en solución 3 mM de H_2O_2 0,1 M KCl de (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF	76

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
μL	microlitros
ABTS	ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
BSA	Albúmina de Suero Bovino
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
kDa	Kilodalton
mL	Mililitros
PEG	Polietilenglicol
POD	Peroxidasa
CYPOD	Peroxidasa de las hojas de limonaria
p/p	Peso/peso
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
I	Corriente
VC	Voltamperograma cíclico
mA	Miliamperios
mV	Milivoltios
SPGE	Electrodo serigrafado de carbono modificado con óxido de grafeno
AH₂	Sustrato reductor
mM	Milimolar
UF	Ultrafiltrado
RB	Reparto bifásico

Resumen

Título: Estudio De Las Propiedades Bioelectroquímicas De La Peroxidasa De La Limonaria (*Cymbopogon citratus*)

Autor: Ella Sofía Rodríguez Ortiz

Palabras clave: peroxidasa, limonaria, biosensor, caracterización bioquímica.

La detección electroquímica de H_2O_2 por medio de biosensores, particularmente los basados en la reducción catalítica por proteínas naturales como las peroxidasas, ha surgido como un método alternativo para la detección de dicho analito. Por lo anterior, surge la necesidad de estudiar las propiedades bioelectroquímicas de peroxidasas (PODs) adaptables a estos dispositivos. En este trabajo fue extraída y parcialmente purificada la peroxidasa de limonaria (CYPOD) mediante reparto bifásico (ATP) con PEG 14% y $(NH_4)_2SO_4$ 10%, y ultrafiltración con amicones de 30 kDa, obteniendo una actividad específica de 124,37 U/mg en el extracto final.

La POD de limonaria fue caracterizada bioquímicamente para determinar su estabilidad a diferentes pH, encontrando que posee un rango de pH óptimo de 4,0 a 6,0. Estudios de termoestabilidad mostraron que de 40°C a 66°C mantiene el 80% de su actividad enzimática. Se estudió el efecto del pH y concentración de sustratos en la actividad de la CYPOD con guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina y ABTS estimando las condiciones óptimas para estudiar la especificidad sustrática.

Finalmente, se analizó la respuesta electroquímica de la CYPOD frente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en electrodos serigrafados de carbono modificados con óxido de grafeno (SPGE) por medio de voltamperometría cíclica (VC), comparando los extractos obtenidos del reparto bifásico (RB) y la ultrafiltración (UF). El sistema SPGE/CYPOD mejoró la reversibilidad del proceso redox de $K_3[Fe(CN)_6]$, redujo el H_2O_2 a potenciales bajos (0,45 V para el RB y 0,43 V vs Ag/Cl para el UF) con una respuesta lineal en el intervalo evaluado (0,5 a 4 mM) y presentó un comportamiento quasi-reversible. Con estos resultados, alta estabilidad en un rango de pH y temperatura, respuesta lineal al peróxido de hidrógeno y favorecimiento del proceso de reducción, la peroxidasa de las hojas de limonaria demuestra tener alto potencial biotecnológico, en especial para los biosensores de H_2O_2 .

Abstract

Título: Study of bioelectrochemical properties of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) peroxidase

Autor: Ella Sofía Rodríguez Ortiz

Palabras clave: peroxidase, lemongrass, biosensor, biochemical characterization.

Hydrogen peroxide electrochemical detection by natural protein-based biosensors like peroxidases have arisen as an alternative method for the detection of this analyte. Therefore, there is an increasing interest in studying the bioelectrochemical properties of a variety of peroxidases that can be adapted to these devices. In this work peroxidase from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) was extracted and partially purified through aqueous two-phase separation (ATP) with PEG 14% and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%, and ultrafiltration with 30 kDa amicon, achieving a specific activity of 124,37 U/mg for final extract.

Peroxidase from lemongrass (CYPOD) was bioelectrochemically characterized to determine its pH stability, obtaining an optimum range from 4,0 to 6,0. Thermostability studies showed that CYPOD maintained activity over 80% between 40 °C and 66°C and that its inactivation constant k is $0,00898 \text{ min}^{-1}$. Effect of pH and substrates concentration in CYPOD catalytic activity was studied with guaiacol, o-dianisidine, o-phenylenediamine and ABTS, and optimal conditions to study its substrate specificity were estimated.

Additionally, CYPOD extract from the ultrafiltrated (UF) and ATP (RB) phase were deposited in screen printed electrodes modified with graphene oxide (SPGE) to analyse the response towards H_2O_2 with cyclic voltammetry. The SCPE/CYPOD electrode enhanced the reversibility of redox process of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, reduced H_2O_2 at low potentials (0,45 V for RB and 0,43 V vs Ag/Cl for UF) with a linear response in the studied range (0,5 to 4 Mm) and performed a quasi-reversible process. With this results, high stability in relative acidic conditions and large temperature range, linear response to hydrogen peroxide, and favoring of reduction process, peroxidase from lemongrass leaves proves its potential for biotechnological applications, specially, biosensing of H_2O_2

Introducción

Las enzimas son catalizadores biológicos que regulan las transformaciones químicas en los organismos vivos, aceleran reacciones que en condiciones biológicas no se desarrollarían notoriamente, son específicas sobre los sustratos en que actúan y requieren condiciones particulares de pH y temperatura para funcionar óptimamente. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran las PODs, las cuales son enzimas oxidorreductasas que catalizan la oxidación de sustratos por medio de la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o peróxidos orgánicos. Se destacan por sus notables propiedades redox que se han aplicado extensamente en biotecnología en áreas específicas como: la biodetección de analitos en muestras ambientales y biológicas, la biorremediación de ecosistemas acuáticos y la bioquímica clínica.

Las peroxidasas se emplean en biosensores para la detección de diversos analitos entre los que destacan el glifosato, el peróxido de hidrógeno, algunos compuestos fenólicos y tintes textiles (Bódalo et al., 2006; Dave y Sanghvi, 2022; Octubre et al., 2024; Rodionov et al., 2016; Songa et al., 2009). También se ha demostrado su eficacia en la degradación de contaminantes en aguas residuales provenientes de industrias textiles, petroquímicas y farmacéuticas (Sellami et al., 2022; A. K. Singh et al., 2021). Además, son ampliamente usadas en kits de ensayos inmunoenzimáticos como los de detección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y metabolitos como glucosa, etanol, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, entre otros (Krainer y Glieder, 2015; Regalado et al., 2004).

La peroxidasa de rábano picante (HRP) es la más usada comercialmente para la mayoría de las aplicaciones, en especial, los biosensores electroquímicos de peróxido de hidrógeno, debido a su alta actividad catalítica. Sin embargo, no es estable a pH extremo o

temperaturas elevadas y no soporta altas concentraciones de H_2O_2 (Chattopadhyay y Mazumdar, 2000; Wang et al., 2016). En la búsqueda de alternativas que puedan reemplazar o incluso superar la actividad biocatalítica de la HRP se ha aprovechado la biodiversidad de flora en Colombia para obtener y estudiar variedad de peroxidasa provenientes de fuentes vegetales como la de pasto de guinea (*Panicum maximum*), palma real (*Roystonea regia*), palma africana (*Eleais guineensis*) y batata (*Ipomea batatas*). En un estudio preliminar de peroxidasa en plantas tropicales, realizado por Sakharov y col. 1999, se encontró actividad peroxidasa significativa en las hojas de limonaria, sugiriendo que puede tener potencial en aplicaciones biotecnológicas.

Por lo expuesto anteriormente, en este proyecto se extrajo la peroxidasa de las hojas de limonaria (*Cymbopogon citratus*), una nueva fuente vegetal de peroxidasa, para estudiar algunas de sus propiedades bioquímicas y evaluar su respuesta electroquímica frente al H_2O_2 . El estudio se desarrolló en tres etapas, en la primera, se realizó la extracción y semi-purificación de la peroxidasa; en la segunda, se llevó a cabo una caracterización bioquímica que abarcó el análisis de la estabilidad a diferentes pH, la termoestabilidad, la especificidad sustrática frente a guayacol, ABTS, o-dianisidina y o-fenilendiamina, y la determinación del peso molecular de la CYPOD por electroforesis. En la última etapa se caracterizó electroquímicamente, por medio de voltamperometría cíclica, la respuesta de la peroxidasa frente al peróxido de hidrógeno en electrodos serigrafados de carbono modificados con óxido de grafeno.

1. Marco de Referencia

A través de técnicas como difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) se ha estudiado la estructura de las peroxidasas. En 1980 fue analizada por primera vez la estructura de la peroxidasa citocromo c de la levadura y desde entonces ha sido una referencia para el análisis de otras proteínas de este tipo (Poulos et al., 1980). Aproximadamente 84% de las peroxidasas conocidas tienen un grupo prostético hemo, es decir hierro (III) protoporfirina IX y estas a su vez contienen a la clase III que son aquellas principalmente provenientes de plantas (Watanabe et al., 2010). Las peroxidasas vegetales a pesar de tener un bajo nivel de homología entre sí en su secuencia de aminoácidos mantienen estrecha relación en cuanto a su estructura secundaria (Banci, 1997; El Ichi et al., 2011). Además, en su sitio activo comúnmente presentan iones de calcio y contienen en su mayoría α -hélices y cuatro enlaces disulfuro, los cuales estabilizan la estructura tridimensional de la enzima (Figura 1).

En la base de datos de oxidorreductasas RedOxiBase (*RedOxiBase*, 2024) reposan las secuencias de más de 8000 peroxidasas de origen vegetal cuya clasificación por familia taxonómica se presenta en la Figura 2. Algunas de estas se han estudiado para evaluar su aplicación en diferentes ámbitos, en los últimos años se han caracterizado peroxidasas en las hojas de *Cedrela fissilis* (Fritzke et al., 2020), el rábano *Raphanus Sativus* (Saikia et al., 2022), el jengibre *Zingiber officinale* (El-Khonezy et al., 2020) y las plantas de *Abelmoschus esculentus* (Ali y Shaker, 2023) y *Lepidium sativum* (Altay et al., 2018).

Los biosensores electroquímicos han basado su funcionamiento en diversas peroxidasas de plantas, aprovechando sus propiedades de oxidación-reducción. Entre las enzimas más estudiadas para esta aplicación se encuentran la peroxidasa de rábano picante

(HRP) y la de cáscara de soja (SBP). La peroxidasa de las hojas de pasto de guineo (*Panicum maximum*) se evaluó para ser utilizada en biosensores de H₂O₂ y presentó una alta estabilidad térmica, condiciones óptimas de pH 8.0 y 66°C y un límite máximo de cuantificación de 3.5 mM (Centeno et al., 2017). En la Tabla 1 se resumen algunos de los últimos estudios que se han realizado para la detección de peróxido de hidrógeno con biosensores electroquímicos usando peroxidases de plantas.

Figura 1

Estructura tridimensional de la peroxidasa de palma real (Roystonea regia)

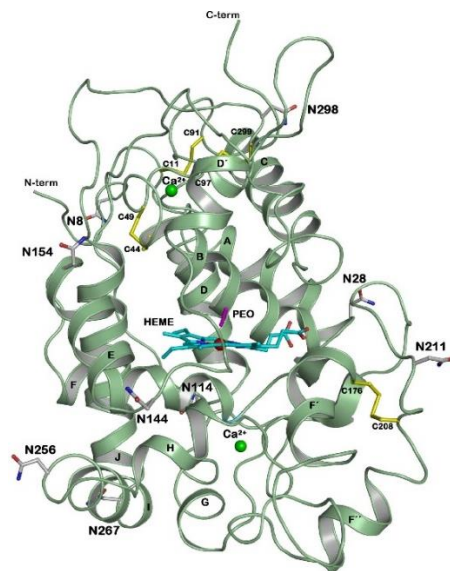
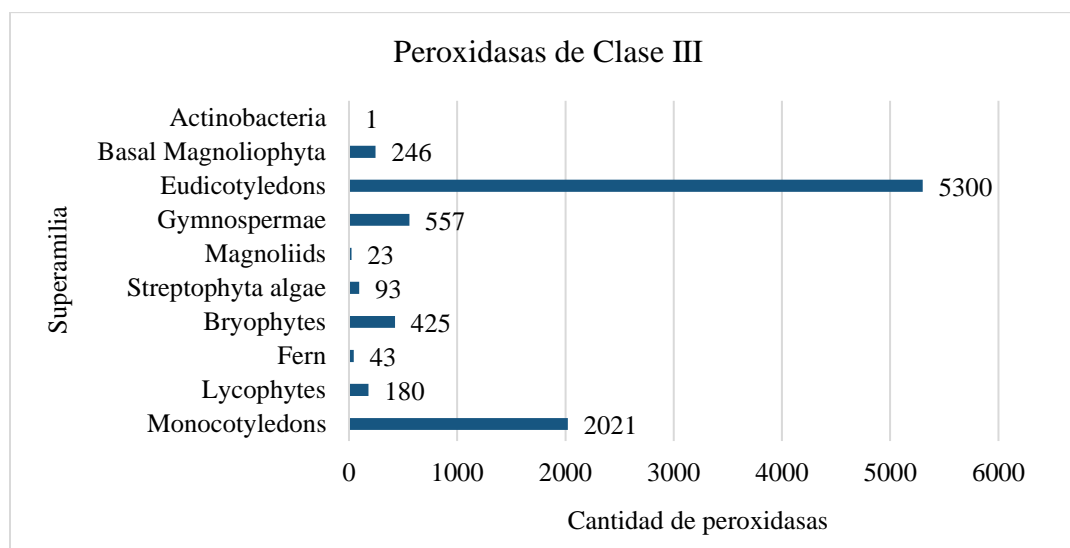


Figura 2

Superfamilias de peroxidasas de clase III



Nota. Gráfica de elaboración propia con información encontrada en la Figura 1(E) de Cleverson *et. al.*, (2024).

Tabla 1

Biosensores electroquímicos para detección de H_2O_2 con peroxidasas

Fuente de la peroxidasa	Rango lineal [μM]	Límite de detección	Referencia
Raíz de rábano picante (<i>Armoracia rusticana</i>)	0.175 a 6.125	58 nM	(Tamborelli et al., 2024)
Hojas de Mastuerzo (<i>Lepidium sativum</i>)	0.2 a 10	70 nM	(Caglar et al., 2021)
Cáscara de soya (<i>Glycine max</i>)	20 a 100	0.19 μM	(Bhaskar et al., 2023)
Hojas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	6 a 900	1.8 μM	(Ciogli et al., 2021)
Hojas de pasto guinea (<i>Panicum maximum</i>)	100 a 3500	84 μM	(Centeno et al., 2017)
Hojas de palma real (<i>Roystonea regia</i>)	100 a 5000	87 μM	(Villamizar et al., 2016)

2. Marco teórico

7.1 Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos, en su gran mayoría proteínas, que regulan transformaciones químicas y procesos de conversión de energía en seres vivos. Las enzimas son importantes por su poder catalítico, debido a que pueden llegar a aumentar la velocidad de las reacciones hasta en un millón de veces, reacciones que en condiciones biológicas se desarrollarían muy lentamente. Además, presentan alta especificidad, es decir, que una enzima actúa solo sobre algunas reacciones o sustratos estrechamente relacionados (Nelson y Cox, 2009; Stryer et al., 2012).

La actividad catalítica de la mayoría de las enzimas depende de un cofactor que facilita la catálisis de las reacciones y este puede ser un ion inorgánico o una pequeña molécula orgánica (coenzima). Según la reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en seis grupos principales presentados en la Tabla 2.

2.1 Oxidorreductasas

Son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de un sustrato a otro. En las reacciones que catalizan, el sustrato oxidado se identifica como donador de electrones, en contraste, el sustrato reducido es el aceptor de electrones. Hay 26 subclases de las oxidorreductasas diferenciadas con base en las moléculasceptoras o donadoras sobre las que actúan (*ExplorEnz - the Enzyme Database*, 2024).

Algunas categorías reconocidas son las oxidasas, que utilizan el O₂ como aceptor de electrones (Motoyama et al., 2022); las deshidrogenasas, que transfieren hidrógenos en

reacciones reversibles (Zhao y Kaldis, 2022); las oxigenasas, las cuales introducen oxígenos en los sustratos sobre los que actúan (Song et al., 2022); y las peroxidasas, cuyo aceptor de electrones es el peróxido de hidrógeno o los hidroperóxidos.

Tabla 2

Clasificación de las enzimas según la reacción que catalizan. Tomado de Nelson (2009, p. 185)

Nombre de la clase	Tipo de reacción catalizada
Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H).
Transferasas	Transferencia de grupos.
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua).
Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos.
Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas.
Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP o a un cofactor similar.

2.2 Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1) son una familia de enzimas que hacen parte de las oxidorreductasas. Se encuentran en organismos de todos los reinos conocidos y tienen un peso molecular entre 30000 y 150000 Da. Catalizan la oxidación de sustratos (AH₂)

orgánicos e inorgánicos como fenoles, aminas aromáticas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos azoicos (Elmetwalli et al., 2023; Ivanec-Goranina, 2024; Yoo et al., 2022), entre otros, usando el peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos orgánicos como aceptor de electrones de acuerdo con la siguiente ecuación:



En las plantas, las peroxidasas cumplen funciones elementales (Freitas et al., 2024):

- Regulan el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) evitando el estrés oxidativo.
- Biosintetizan las proteínas de las paredes celulares siendo las enzimas más abundantes en las células para esta función.
- Participan en el crecimiento de las plantas por su papel esencial en el metabolismo de auxinas.
- Forman una parte crucial del sistema de defensa vegetal ante estrés biótico y abiótico.

2.2.1 Clasificación de las peroxidasas

Las peroxidasas se clasifican inicialmente con base en la presencia o ausencia de un grupo hemo en su núcleo, las peroxidasas no hemo contienen en cambio selenio, vanadio o flavín en su sitio activo. Una siguiente división las discrimina en seis superfamilias para el caso de las hemo y cinco para el caso de las no hemo (Figura 3).

A su vez las peroxidasas hemo no animales se dividen en tres clases dependiendo del organismo del que provienen. Las de clase I no tienen puentes disulfuro, iones de calcio, ni

péptidos terminales que faciliten su secreción a diferencia de las clases II y III. En la Tabla 3 se resumen algunas características y ejemplos de cada clase.

Figura 3

Clasificación filogenética de las peroxididasas

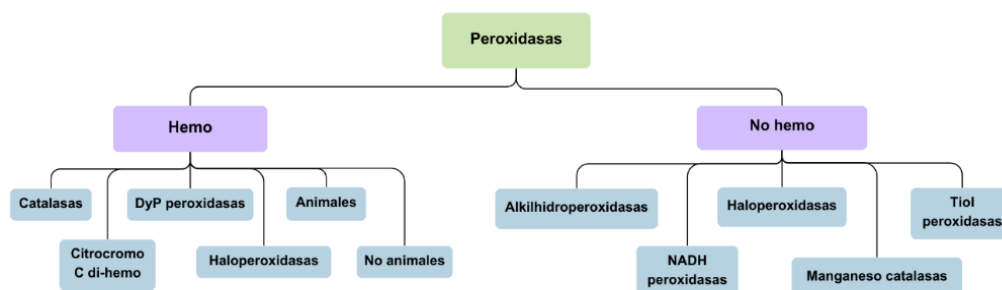


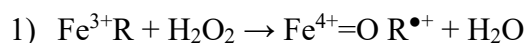
Tabla 3

Clasificación de las peroxididasas hemo no animales

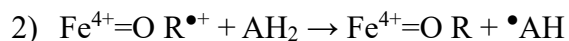
Clase	Origen	Características	Ejemplos
I	Intracelulares en plantas, hongos y procariontas	No están glicosiladas ni tienen iones de calcio o puentes disulfuro	Citocromo C peroxidasa (CcP), catalasa peroxidasa, ascorbato peroxidasa
II	Extracelulares en hongos	Están relacionadas con la degradación de lignina	Lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnPs)
III	Extracelulares en plantas	Pueden tomar una ruta de reacción diferente de a la peroxidativa llamada hidroxílica	HPR, SBP, peroxidasa de limonaria

2.2.2 Ciclo catalítico

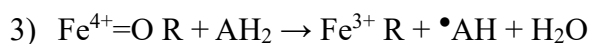
El mecanismo de reacción de las peroxidasas hemo es una oxidación con transferencia de dos electrones. Un proceso en común para todas las peroxidasas de este tipo es la formación del Compuesto I, un complejo catiónico radicalario oxo-ferril. Sin embargo, a partir de este compuesto la reacción puede tomar diferentes rutas dependiendo del sustrato presente (Gamenara et al., 2012). Por eso, se enfocará la explicación del mecanismo peroxidativo, el cual es el más recurrente en las reacciones con peroxidasas. El proceso se desarrolla en los siguientes tres pasos (Longoria et al., 2010; Poulos, 2014).



Compuesto I



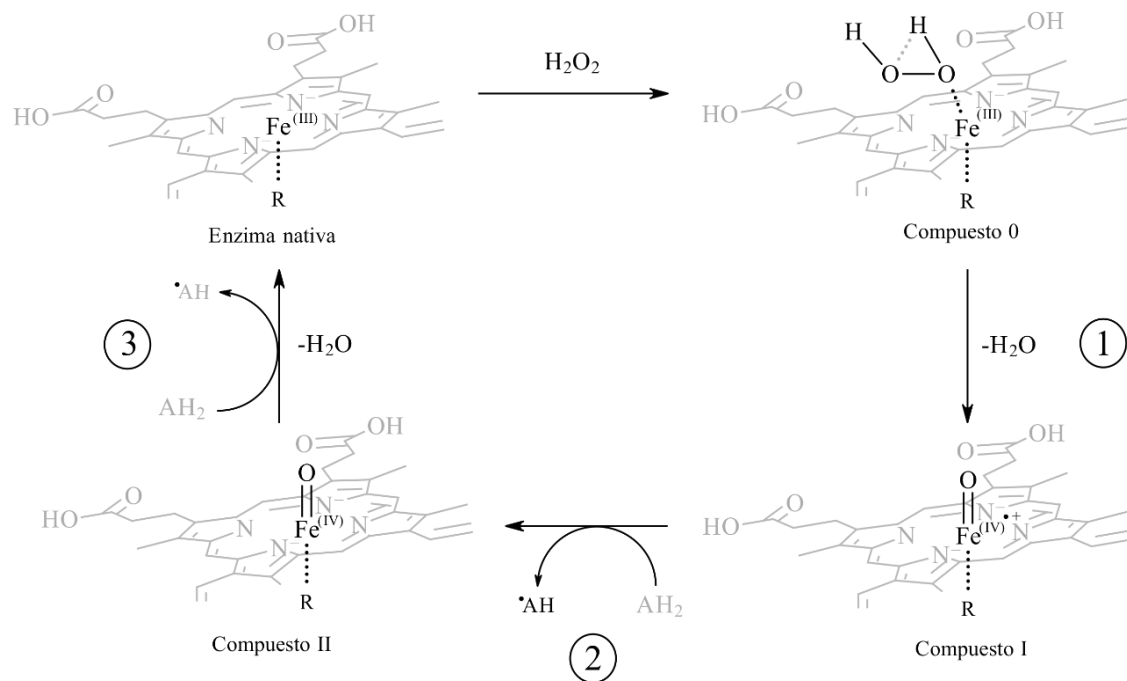
Compuesto II



1. Formación del Compuesto I: El H_2O_2 se enlaza al ion de hierro (Fe^{3+}) desde uno de los oxígenos y se forma un complejo hierro-peróxido con tiempo de vida extremadamente corto, a veces llamado Compuesto 0, seguidamente, el enlace entre oxígenos y entre el $\text{O}_1\text{-H}$ sufre una ruptura heterolítica y a su vez la porfirina (o residuo aminoácido en algunas peroxidasas) transfiere un electrón para formar un doble enlace $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Este paso da como productos una molécula de agua y el Compuesto I, un complejo oxo-ferril hemoradical catiónico: $(\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O})\text{R}^{\bullet+}$.

Figura 4

Mecanismo catalítico de las peroxididasas hemo



Nota. Gráfica de elaboración propia con información de Gamenara D. (2012) y Torres y Ayala (2010)

2. Formación del Compuesto II: En este paso una molécula de sustrato reduce el catión de porfirina dando como resultado el Compuesto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$)R y una molécula de sustrato oxidado.

3. Retorno de la enzima nativa: Finalmente otra molécula de sustrato reduce al Compuesto II liberando una segunda molécula de agua, otra molécula de sustrato oxidada y regresa la peroxidasa a su estado nativo. Los dos radicales del sustrato pueden experimentar diferentes reacciones.

2.3 Propiedades moleculares de las peroxidasas

La actividad biológica y funcionalidad de una enzima es su capacidad para inducir una reacción química, y esta depende de la estructura de la proteína, como esta es sensible a la temperatura, pH y concentración de sal del medio en el que se encuentra, las peroxidasas, al ser enzimas, también son susceptibles a cambios por las condiciones del ambiente. De esta manera, las enzimas también tienen condiciones óptimas en las que alcanzan su mayor actividad catalítica.

2.3.1 Estabilidad en pH

El pH indica la cantidad de iones hidronio presentes en una solución. Ante los cambios de pH, los aminoácidos que componen el sitio activo de las peroxidasas se protonan o desprotonan dependiendo de su naturaleza, cambiando así su estado de ionización y esto puede afectar el enlace con el sustrato y su catálisis (Stryer et al., 2012). En el análisis de la actividad de las peroxidasas a diferente pH se ha evidenciado que cada una tiene rangos de pH óptimos distintos, independientemente de su clase, pero normalmente se encuentran entre pH 4,5 y 7,0 (Alneyadi et al., 2018; Saud Al-Bagmi et al., 2019).

2.3.2 Estabilidad en temperatura

Aumentar la temperatura del medio en el que una enzima cataliza un sustrato facilita que se alcance la energía de activación, acelerando así la reacción hasta un punto de máxima actividad. Sin embargo, seguir incrementando la temperatura genera la desnaturalización de la enzima. Las peroxidasas, en comparación con otras enzimas, ostentan una alta estabilidad térmica debido a la gran cantidad de residuos de cisteína, los enlaces disulfuro, los iones de

calcio y la extensa red de puentes de hidrógeno que conforman su estructura (Chattopadhyay y Mazumdar, 2000; Deepa y Arumughan, 2002).

2.4 Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, o SDS-PAGE, es una técnica usada para separar mezclas de proteínas según su relación carga/masa al hacerlas desplazarse a través de un campo eléctrico (Nelson y Cox, 2009). El SDS, un detergente aniónico, desnaturaliza la estructura secundaria y terciaria, y las recubre con una carga negativa que se correlaciona con su tamaño (Brunelle y Green, 2014), mientras el gel de poliacrilamida actúa como un tamiz molecular, retrasando la migración de las proteínas dependiendo de su carga y masa. La concentración del gel se varía dependiendo del tamaño de las proteínas que se requieran separar, para masas de 10 a 200 kDa una concentración del 8 al 12 % de acrilamida es suficiente (Banga, 1998).

Después de la electroforesis, se adiciona una solución de tinción que contiene azul de Coomassie, este colorante se fija a las proteínas selectivamente por interacciones hidrofóbicas y uniones heteropolares entre aminoácidos (Georgiou, C. D., et. al., 2008), lo que permite observar las bandas resultantes de la separación de las proteínas. Para identificar el tamaño, se cargan estándares de proteínas de un tamaño conocido junto con las muestras y se analizan en las mismas condiciones.

2.5 Generalidades de la limonaria (*Cymbopogon citratus*)

La limonaria (*Cymbopogon citratus*) es originaria de India, pero se cultiva en países tropicales. Pertenece a la familia de las gramíneas. Es una planta perenne de rápido

crecimiento, alcanza una altura de 1 a 2 metros. Sus hojas son largas y lineales con una extensión de 30 a 100 cm, poseen una lígula corta, muchos bulbos, pequeños rizomas y su inflorescencia se da en espiguillas (Lawal et al., 2017). Ha demostrado tener diversas propiedades farmacológicas, como ser antimicrobiana, antiinflamatoria, antidiabética, y anticancerígena, por esto, sus hojas son usadas con fines medicinales en infusión (*GBIF Secretariat*, 2023). Hasta el momento no se reportan estudios que evalúen las propiedades bioelectroquímicas de la peroxidasa de esta planta.

Figura 5

Limonaria (Cymbopogon citratus)



Nota. Fuente: inaturalist.org [Citado 25 de marzo de 2024] Recuperado de: <https://colombia.inaturalist.org/observations/202603093>

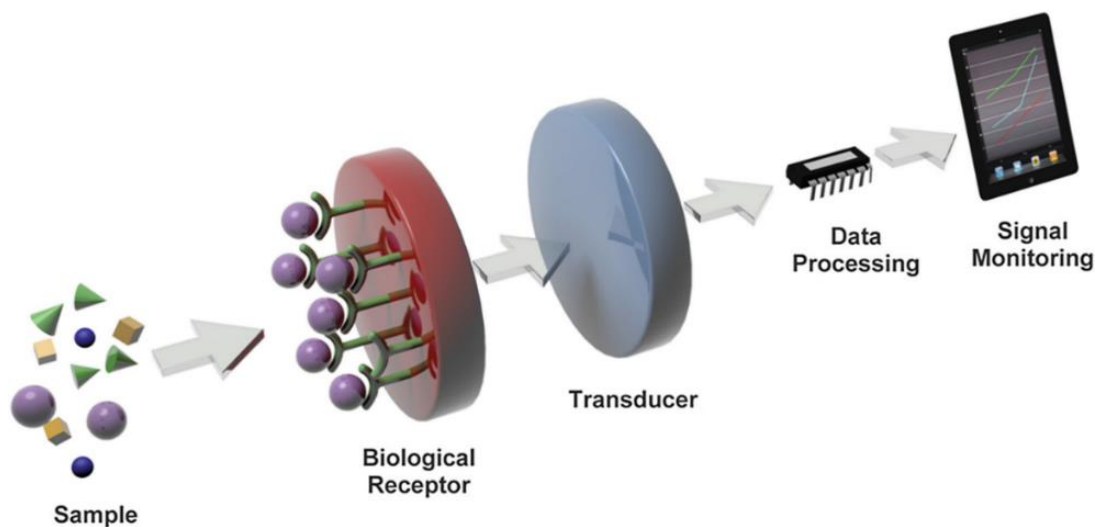
2.6 Biosensores

Los biosensores son dispositivos de reconocimiento que detectan y cuantifican moléculas químicas o biológicas en matrices complejas a través de la conversión de una interacción biomolecular a una señal cuantificable con ayuda de un transductor. El

biorreceptor es la molécula con la capacidad de capturar selectivamente el analito *target* y puede ser una enzima, un anticuerpo o un ácido nucleico. La interacción entre el biorreceptor y el *target* genera un cambio en una propiedad medible (luz, pH, carga, masa) produciendo así una señal que es recibida por el transductor y que además es proporcional a la concentración del analito (Y.-C. Zhu et al., 2019). Existen diferentes tipos de biosensores dependiendo del tipo de transductor o de biorreceptor que se utilicen. Considerando el tipo de transductor pueden ser ópticos, piezoeléctricos, magnéticos, nanomecánicos y electroquímicos, y dependiendo del biorreceptor pueden ser biocatalíticos o de afinidad.

Figura 6

Estructura general de un biosensor.



Nota. Tomado de Lechuga, L. M. (2023)

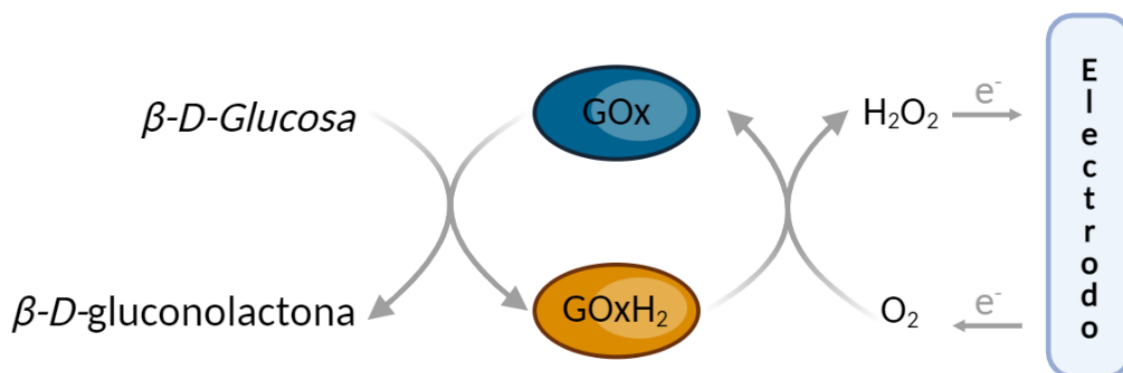
2.6.1 Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos se fundamentan en cambios en la corriente eléctrica producidos por la interacción del biorreceptor electroactivo y el *target* (Lechuga, 2023). La

carga eléctrica generada se transporta a través de electrodos, los cuales, son componentes esenciales en este tipo de dispositivos. Son el soporte sólido en el que se inmoviliza el biorreceptor brindando estabilidad a la molécula y permitiendo la transferencia de la carga eléctrica a través del circuito del sensor (Wanjari et al., 2023). La detección en estos dispositivos necesita de tres electrodos, el de referencia, que mantiene una referencia estable del potencial redox; el de trabajo, que actúa como transductor y el auxiliar que soporta la conexión entre la solución electrolítica con el electrodo de trabajo. El material de los electrodos depende de los analitos, no obstante, generalmente se usa oro, carbono, silicio y platino (Grieshaber et al., 2008).

Figura 7

Mecanismo del biosensor electroquímico de glucosa basado en glucosa oxidasa



Las enzimas son los biorreceptores más usados para este tipo de sistemas debido a su especificidad y actividad biocatalítica. Estas catalizan la formación de la especie electroactiva que es detectada en el dispositivo de diferentes maneras (Ronkainen et al., 2010). El inicio del estudio de biosensores electroquímicos basados en enzimas se dio con la creación de un biosensor que usaba glucosa oxidasa (GOx) para la detección de glucosa en sangre (Clark Jr y Sachs, 1968). En el biosensor (Figura 7) la GOx se une selectivamente con

la glucosa y la oxida a gluconolactona, seguidamente, la enzima reducida vuelve a su estado nativo transfiriendo los electrones a una molécula mediadora que en este caso es el oxígeno, el cual se reduce a peróxido de hidrógeno. Finalmente, el mediador reducido pierde los electrones en la superficie del electrodo produciendo la corriente eléctrica. Este biosensor es de tipo amperométrico, sin embargo, según el mecanismo de medición de la señal los biosensores electroquímicos basados en enzimas pueden ser además voltamétricos, potenciométricos, conductimétricos o impedimétricos (Rafaqat et al., 2024; S. Singh et al., 2020).

2.6.2 Biosensores electroquímicos con peroxidasas.

Las peroxidasas han encontrado un campo de aplicación en biosensores electroquímicos de diversos analitos, principalmente el peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos, aminas aromáticas, compuestos fenólicos, y compuestos inhibidores de la enzima como cianuro, fluoruro e hidroxilamina (Ruzgas et al., 1996). El interés en el desarrollo de este tipo de biosensores se fundamenta en la propiedad de las peroxidasas de transferir electrones a bajos potenciales de trabajo (Sukma et al., 2023).

2.6.3 Voltamperometría cíclica

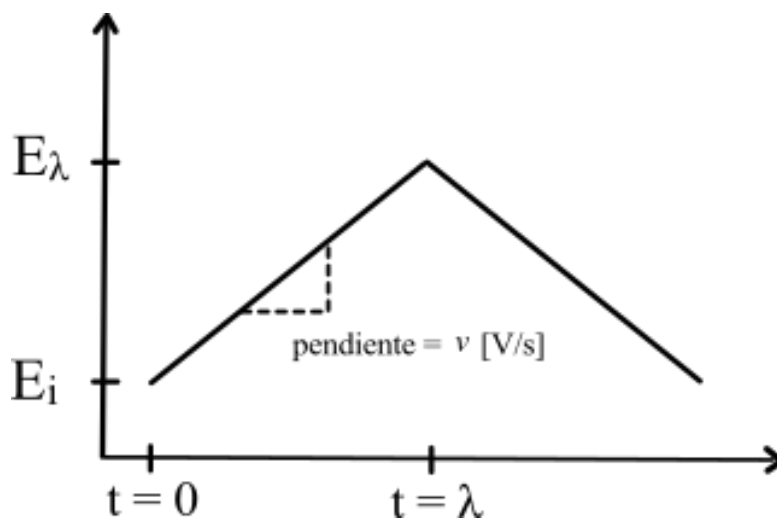
La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica de barrido de potencial extensamente usada en la caracterización de electrodos debido a la facilidad que brinda para estudiar propiedades fundamentales de los procesos redox en los sistemas electrodo/electrolito. En un ensayo de voltamperometría cíclica se mide la corriente en función del potencial aplicado al electrodo de trabajo a velocidad de barrido constante. El barrido se realiza en un rango definido dentro del cual tiene lugar el proceso de oxidación y

reducción de interés, partiendo de un potencial E_i , en el que no ocurren procesos farádicos significativos, hasta alcanzar un potencial E_λ en el que se invierte la dirección del barrido tras lo cual se retorna al potencial de partida Figura 8.

El comportamiento de la corriente en función del voltaje aplicado se reporta gráficamente en un voltamperograma cíclico (VC) para el cual existen dos convenciones que se pueden emplear (Figura 9). En la convención de Estados Unidos los potenciales positivos se encuentran a la izquierda y los negativos a la derecha, y en la convención IUPAC es lo contrario, potenciales positivos a la derecha y negativos a la izquierda.

Figura 8

Esquema del barrido de potencial en la voltamperometría cíclica



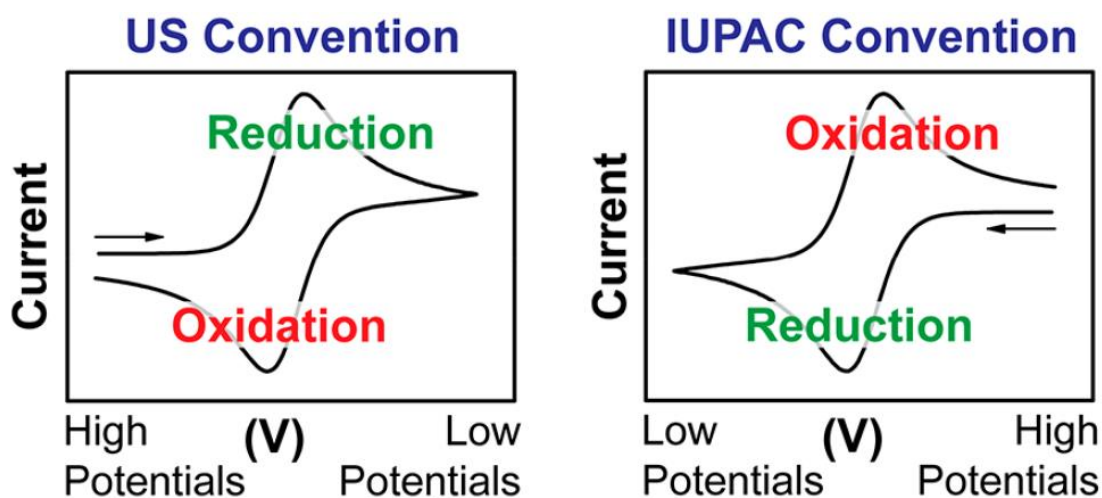
Un VC contiene información cinética y termodinámica del sistema medido y su forma dependerá de la constante de velocidad electroquímica y el potencial formal del par redox del sistema, de los coeficientes de difusión de las especies y de la velocidad de barrido (Compton et al., 2014). Durante el barrido de potenciales positivos a potenciales negativos, electrones del electrodo se transfieren al LUMO del agente oxidante en el electrolito,

reduciéndose, y a la corriente producida se le llama corriente catódica; en el barrido inverso, al pasar de potenciales negativos a potenciales positivos, la especie reductora transfiere los electrones del HOMO al electrodo, oxidándose, y se genera una corriente anódica (Elgrishi et al., 2018).



Figura 9

Notación de los voltamperogramas cíclicos



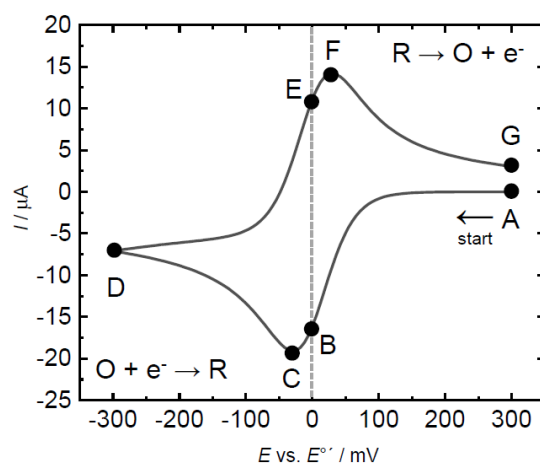
Nota. Tomado de Elgrishi et al., (2018)

Si se considera una reacción de un paso con transferencia de un solo electrón como la de la ecuación 1 el voltamperograma medido tendrá una forma similar a la de la Figura 10. En los puntos C y F la corriente alcanza sus valores mínimo y máximo, estos picos se denominan picos de corriente anódica y catódica (I_{pa} , I_{pc}) respectivamente, y el signo de la corriente simplemente indica la dirección del flujo de electrones y depende de la notación, como ya se mencionó anteriormente. Estos picos están a determinados valores de voltaje que

se identifican como E_{pa} para el voltaje en el que está el pico anódico y E_{pc} para el que está en el pico catódico.

Figura 10

Forma de un voltamperograma cíclico



Nota. Tomado de Yamada et al., (2022)

Una de las características importantes de un sistema que permite estudiar la voltamperometría cíclica es la reversibilidad, que puede ser química, cuando el producto de la reacción es estable y puede re-oxidarse tras su reducción, y electroquímica, que se refiere a la cinética de la transferencia electrónica entre el electrodo y el electrolito. La velocidad de transferencia de electrones y la velocidad de transporte de masa son los dos procesos que controlan esta propiedad, y dependiendo de la relación que tienen entre sí el sistema se puede clasificar en:

- Reversible: *velocidad transferencia electrónica* \gg *velocidad transporte de masa*
- Quasi-reversible: *Intermedio*
- Irreversible: *velocidad transporte de masa* \gg *velocidad transferencia electrónica*

3. Metodología

3.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de: SIGMA-ALDRICH: guayacol $C_7H_8O_2$, o-dianisidina $C_{14}H_{16}N_2O_2$, o-fenilendiamina $C_6H_8N_2$, ABTS (ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$; PanReac AppliChem ITW Reagents: sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, ácido acético glacial CH_3COOH , ácido bórico H_3BO_3 ; J.T. Baker: peróxido de hidrógeno H_2O_2 (30% p/p), fosfato de potasio monobásico K_2HPO_4 , fosfato de potasio dibásico KH_2PO_4 , ferricianuro de potasio $K_3Fe(CN)_6$; Carlo Erba Reagents: ácido ortofosfórico H_3PO_4 , cloruro de potasio KCl.

3.2 Obtención de la peroxidasa

Para la extracción de la peroxidasa de las hojas de limonaria (*Cymbopogon citratus*) comercializada en plazas de mercado de la ciudad de Bucaramanga se empleó una metodología similar a la descrita por Sakharov (2001) con algunas modificaciones como el tiempo de extracción y pH de la solución buffer de fosfatos.

3.2.1 Recolección y extracción de la peroxidasa

Las hojas de limonaria fueron adquiridas en plazas de mercado de la ciudad de Bucaramanga. Las hojas se lavaron con agua desionizada y se cortaron en trozos de aproximadamente 3 cm de longitud. Para determinar el pH óptimo de extracción inicialmente se pesaron 30 g de hojas a los que se le añadieron 120 mL de buffer de fosfatos (PBS) en proporción 1:4. La mezcla se dejó agitando por 24 horas a 160 rpm y temperatura ambiente. Se realizaron tres ensayos usando buffer de fosfatos (PBS) 100mM a pH 6.0, 7.0 y 8.0; para

los cuales el pH 6.0 presentó mayor actividad enzimática por lo que se seleccionó para hacer la extracción principal.

Para obtener el extracto de la limonaria se pesaron 100 g de hojas que se dividieron en dos partes iguales, a una parte se le agregaron 400 mL de PBS 100 mM a pH 6.0 y se dejó agitando por 24 horas a 160 rpm y temperatura ambiente. Seguidamente, se filtró el extracto obtenido con un filtro de tela de algodón y al sobrenadante se le agregaron los 50g de hojas restantes. Para concentrar la enzima en el extracto se dejó agitando 24 horas más y se filtró bajo las condiciones previamente descritas. Para eliminar sólidos el extracto obtenido se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Al finalizar la extracción y en cada etapa de la semi-purificación se midieron la concentración de proteínas, por el método de BCA (sección 3.5), y la actividad enzimática (sección 3.6).

3.3 Eliminación de pigmentos por reparto bifásico

Para eliminar los fenoles, polifenoles y sus productos de oxidación, se adicionó al extracto polietilenglicol (PEG, peso molecular 12000 Da) 14% p/v y sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) 10% p/v y se agitó a temperatura ambiente hasta su completa disolución con la ayuda de un agitador magnético. Se dejó reposar en un embudo de decantación por una hora, hasta que se formaron dos fases insolubles. Se midió la actividad enzimática de ambas fases y la fase inferior de color claro que contenía la peroxidasa se recolectó y se le determinó la concentración de proteínas.

3.4 Ultrafiltración

Como último paso de la semi-purificación se centrifugó el extracto a 5000 rpm y 4°C por 30 minutos usando amicones de 30000 Da. Se midió la actividad enzimática del filtrado y del concentrado para determinar el que contenía la peroxidasa y se recolectó el concentrado para las etapas posteriores. Al finalizar la obtención de la peroxidasa se construyó la tabla de purificación según (Burgess, 2009).

3.5 Medición de la concentración de proteínas por el método BCA

La cuantificación de proteínas en los extractos de cada etapa de la purificación se realizó por medio del método de BCA (Thermo Scientific, 2024) construyendo una curva de calibración usando como patrón a la albúmina de suero bovino (BSA) en el rango de 20 a 2000 µg/mL y por medio del lector de microplacas Multiskan Sky (Thermo Scientific).

3.6 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática del extracto se determinó a través del seguimiento de las velocidades iniciales de reacción utilizando un espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU). Para medir la cantidad de tetraguayacol ($\epsilon=26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) formado de la reacción entre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el sustrato guayacol, que es catalizada por la peroxidasa, se cuantificó la variación de absorbancia a 470 nm durante los primeros 120 segundos. Se preparó la solución de sustratos en 20 mL de PBS 100mM a pH 6.0 adicionando 40 µL de guayacol y 10 µL de peróxido de hidrógeno 30% (p/p). Para la medición en la celda del espectrofotómetro se añadieron 33 µL de extracto diluido y 1 mL de solución de sustratos.

Una unidad de actividad peroxidasa (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de guayacol por minuto bajo condiciones de pH 6.0 y temperatura de 25 °C. La actividad específica será expresada como unidades de actividad de peroxidasa por miligramo de proteína total.

3.7 Determinación de la masa molecular por electroforesis

Para determinar la masa molecular de la CYPOD se analizaron los extractos de tres etapas (extracción, reparto bifásico y ultrafiltración) a través de electroforesis con dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% según el procedimiento de (Laemmli, 1970). Los geles de separación y stacking se prepararon en Tris-SDS buffer a pH 8,9 y 6,8 respectivamente con la adición de persulfato de amonio (APS) y TEMED en ambos casos. La electroforesis se realizó a 150 V durante 1 hora, y se usó como patrón de referencia el marcador de peso molecular obtenido de Thermo Scientific (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 a 250 kDa) y HRP (75kDa). Los marcadores de masa se visualizaron usando azul de Coomassie.

3.8 Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes pH

Para el estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la peroxidasa se incubaron 10 μL del extracto semi-purificado en un volumen de 990 μL de buffer universal compuesto por ácido bórico, ácido acético y ácido fosfórico 100mM e hidróxido de sodio 10 mM en un rango de pH de 2.0 a 12.0. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la actividad enzimática tomando 33 μL del extracto incubado y 1 mL de solución de sustratos preparada tomando 5 mL del buffer universal a pH correspondiente y añadiéndole 2,5 μL de H_2O_2 y 10 μL de guayacol.

3.9 Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes temperaturas

Se realizó un primer ensayo para determinar la temperatura de inactivación de la peroxidasa. En un baño termostataado se calentaron simultáneamente tubos de ensayo con 2 mL de una solución de extracto 1:100 en PBS pH 6.0 100mM. Cuando cada uno de estos alcanzó una temperatura determinada en el rango de 40 a 80°C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se determinó su actividad enzimática (sección 3.6). Para el siguiente ensayo se identificó la última temperatura donde la actividad enzimática reportó altos valores antes de disminuir por el calentamiento (66°C).

Para determinar la constaste de inactivación se calentaron 25 mL de solución de extracto 1:100 en PBS pH 6.0 100 mM hasta alcanzar 66° C y se dejó incubar por 15 minutos. Se mantuvo el calentamiento a dicha temperatura y se fueron sacando alícuotas de 2 mL cada 10 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les midió su actividad enzimática.

3.10 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la peroxidasa

Para estudiar la especificidad sustrática de la CYPOD frente a diferentes sustratos agentes reductores (guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina y ABTS) se analizó el efecto de la concentración de sustrato, la concentración de H₂O₂ y el pH en la actividad catalítica de la enzima. Para el análisis se utilizó el software STATPGRAPHICS 19 y el resumen de los intervalos, longitud de onda y coeficiente de absortividad molar con los que se ensayaron los factores se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

Condiciones para el análisis de la especificidad sustrática

Sustrato	Longitud de onda [nm]	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]	[AH ₂] mM	[H ₂ O ₂] mM	pH
Guayacol	470	26600	0.1 a 10.0	0.7 a 10.0	4.0 a 8.0
o-dianisidina	420	2640	0.08 a 0.5	1.0 a 9.0	4.0 a 8.0
o-fenilendiamina	445	11100	0.1 a 5.0	0.7 a 8.0	4.0 a 8.0
ABTS	414	31000	0.016 a 0.15	0.2 a 5.0	3.0 a 6.0

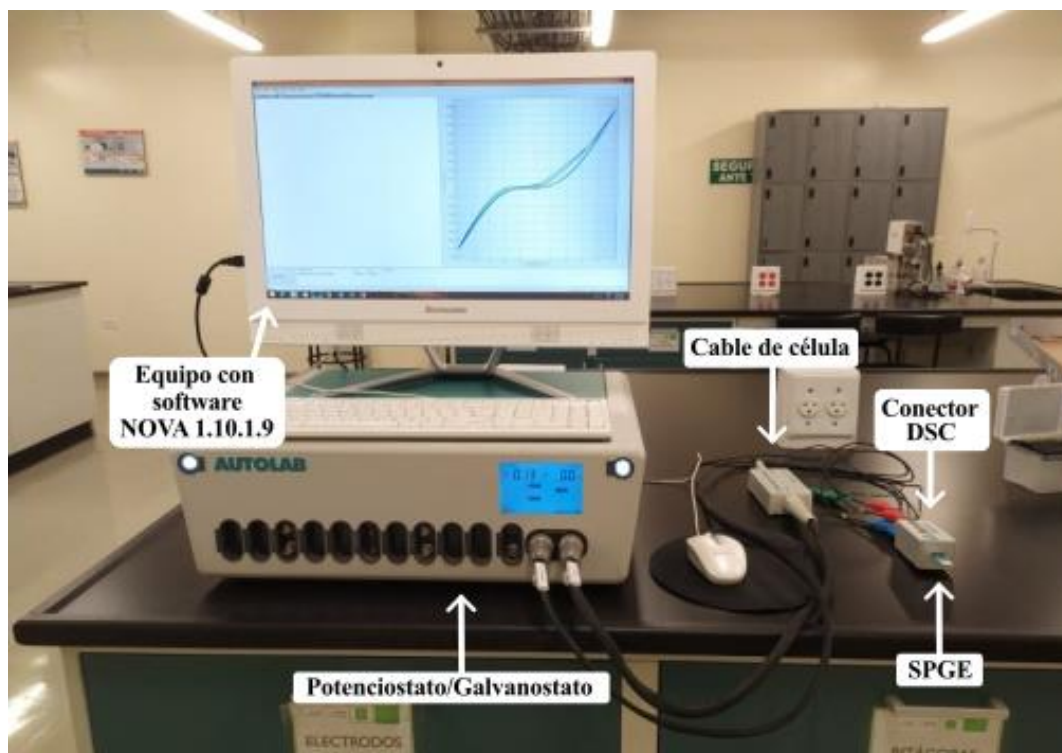
3.11 Inmovilización de la peroxidasa en electrodos serigrafados de carbono modificados con óxido de grafeno

La inmovilización de la peroxidasa en los electrodos serigrafados de carbono modificados con óxido de grafeno (SPGE) se realizó por medio de adsorción física. Se depositaron 10 μ L de extracto en el electrodo de trabajo del SPGE y se dejó secar por 24 horas en un lugar oscuro. En todos los ensayos de caracterización posteriores se utilizaron controles (electrodos sin modificar) para comparar la respuesta del electrodo modificado.

El potencióstato/galvanostato utilizado para los experimentos fue el AUTOLAB PGSTAT302N y el software para el procesamiento de datos fue el NOVA (NOVA 1.10.1.9 software para instrumentos Autolab). Los electrodos utilizados (110GPHOX Metrohm Dropsens) cuentan con el electrodo de trabajo de carbono modificado con óxido de grafeno, el electrodo auxiliar de carbono y el electrodo de referencia de Ag/AgCl, y fueron obtenidos de Metrohm. En la figura 11 se muestra el montaje utilizado para los ensayos electroquímicos.

Figura 11

Montaje experimental para las mediciones de voltamperometría cíclica



3.12 Caracterización de electrodos modificados por medio de voltamperometría cíclica con ferricianuro de potasio

Como electrolito modelo para la caracterización de los electrodos modificados se utilizó el ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en solución con 0,1 M KCl como electrolito de soporte. Se depositaron 40 μ L de la solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ en los electrodos modificados y sin modificar y se registraron los VCs a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} en un rango de potencial de 0.6 a -0.6 V.

3.13 Evaluación de la respuesta del electrodo modificado frente al peróxido de hidrógeno

Se evaluó cualitativamente la respuesta del SPGE/CYPOD-RB y SPGE/CYPOD-UF frente al peróxido de hidrógeno usando voltamperometría cíclica para comparar la señal del electrodo a diferentes concentraciones del H_2O_2 . Para ello se tomaron VCs de los electrodos previamente modificados en una solución de PBS 100 mM pH 6,0 con 0,1 M KCl y concentraciones de H_2O_2 en el rango de 0,5 a 5,0 mM. La medición se realizó a una velocidad de barrido 50 mVs^{-1} y en un rango de potencial de 1.0 V a -1.0 V. Con esto se determinó el potencial de reducción del H_2O_2 en el sistema.

3.14 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno

Se registraron los VCs de los electrodos modificados a diferentes velocidades de barrido, en 40 μL de solución PBS 100 mM pH 6.0 con 0.1 M KCl en presencia de 3.0 mM H_2O_2 en un intervalo de velocidades de barrido de 10 mVs^{-1} a 450 mVs^{-1} .

4. Análisis y resultados

4.1 Extracción y semi-purificación de la peroxidasa de limonaria

Para comparar la calidad de la extracción y de las etapas de semi-purificación se tomó como referencia la actividad enzimática de los extractos. Para calcularla, se utiliza la fórmula resultante de derivar la ecuación de la ley de Lambert-Beer (Ecuación 2) con respecto al tiempo, ya que esta relaciona la absorbancia con la concentración del analito en una muestra. Así, se obtiene la fórmula utilizada (Ecuación 3) donde V_T es el volumen total de la celda en mL, FD es el factor de dilución del extracto, dA/dt está en s^{-1} , ϵ en $mM^{-1}cm^{-1}$ y b en cm.

$$A = \epsilon bc \quad (2)$$

$$\frac{dA}{dt} = \epsilon b \frac{dc}{dt}$$

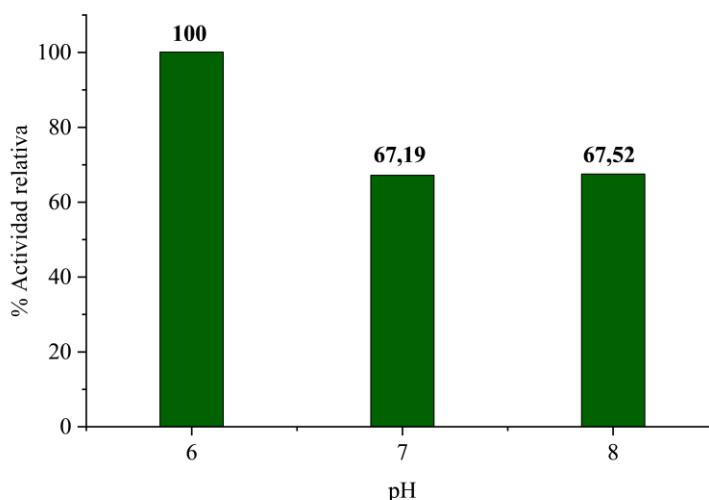
$$\frac{dc}{dt} = \frac{dA/dt}{\epsilon b}$$

$$Actividad\ enzimática = \frac{dA/dt}{\epsilon b} \times 60 \times FD \times V_T \quad [U] \quad (3)$$

En un ensayo preliminar se determinó el mejor pH de extracción en el intervalo de 6.0 a 8.0. Para esto se realizaron extracciones a diferentes pH (6.0, 7.0 y 8.0) y se compararon los valores de actividad enzimática de cada extracto. En la Figura 12 se evidencia que a pH 6.0 la actividad fue 33% mayor que a pH 7.0 y 8.0, por lo tanto, las extracciones de la peroxidasa de limonaria para los estudios de este proyecto se realizaron a pH 6.0.

Figura 12.

Actividad relativa a diferentes pH de extracción



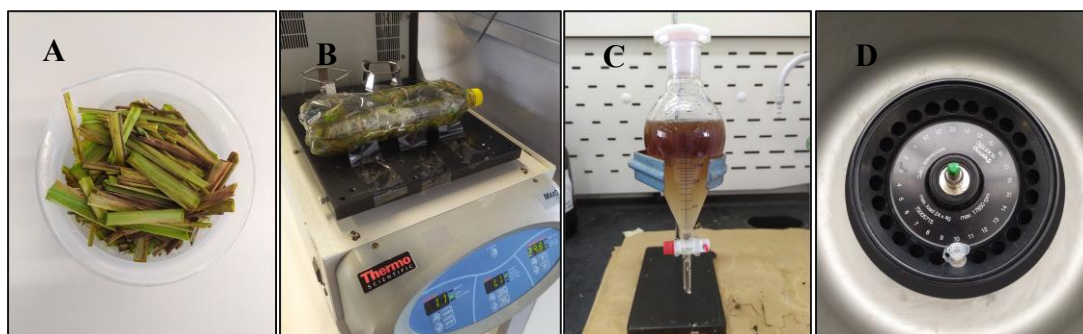
Nota. Se usó solución de sustratos con guayacol y H₂O₂ a pH 7.0

En la preparación de la extracción se escogieron hojas de la planta que mostraran estrés oxidativo para así obtener un extracto rico en la enzima (H. Zhu et al., 2017). Los tejidos de las plantas contienen compuestos como fenoles, lípidos, pigmentos, ácidos orgánicos, carbohidratos, etc. (Du et al., 2022), que pueden interferir en los análisis de la enzima que se desea extraer, por lo tanto, una vez obtenido el extracto concentrado en solución 100 mM de PBS a pH 6.0, se centrifugó a 5000 rpm y 4°C por 15 minutos para eliminar material particulado y restos celulares intactos. Seguidamente, se llevó a cabo el procedimiento de separación en sistema acuoso de dos fases (reparto bifásico) con PEG 12000 Da al 10% y (NH₄)₂SO₄ al 14 % (Centeno et al., 2017) en la que se recolectó la fase clara acuosa inferior (fase con actividad peroxidasa) tras una hora de separación. Por último, se llevó el extracto a centrifugación en filtros amicones de 30kDa por 30 minutos a 5000 rpm

y 4°C, y se reservó el concentrado que contenía las especies de mayor tamaño, que fue donde se detectó actividad enzimática. En la Figura 13 se muestran los procedimientos de las etapas de extracción y en la Figura 14 se presentan las imágenes del extracto en las distintas etapas de la purificación.

Figura 13

Etapas de obtención de la peroxidasa



Nota. (A) y (B) Extracción, (C) Reparto bifásico, (D) Ultrafiltración

En la tabla de purificación (Tabla 5) se observa que a medida que avanza la purificación, se concentra más la enzima, aumentando su actividad total, volumétrica y específica, y disminuyendo la cantidad de proteína total y el volumen. En la centrifugación, la actividad disminuye debido a que una pequeña fracción de la enzima se pierde en el precipitado. En el reparto bifásico, la separación se da debido a interacciones moleculares débiles entre la proteína y el PEG o el sulfato (Bonner y Bonner, 2007), permitiendo así, concentrar la enzima de interés mientras se mantiene su actividad catalítica, gracias a que no se encuentra en condiciones desnaturalizantes (Nadar et al., 2017). Además, se eliminan interferencias, de manera que el resultado de la separación es un aumento de la actividad total en el extracto enriquecido de CYPOD. Por último, la ultrafiltración separa las moléculas del

extracto a través de una membrana semipermeable según su tamaño, dejando pasar al filtrado las moléculas de peso molecular menor a 30k Da y concentrando las de mayor tamaño donde se encontró a la CYPOD.

Figura 14

Etapas de extracción y semi-purificación de la peroxidasa de limonaria (A) Extracción (B) Centrifugación (C) Fase clara del reparto bifásico (D) Concentrado de la ultrafiltración.

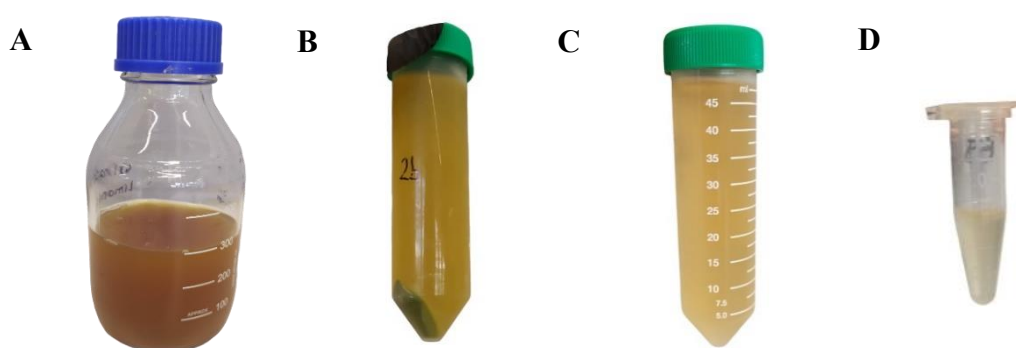


Tabla 5

Tabla de purificación para la peroxidasa extraída de las hojas de limonaria

Etapas de purificación	Volumen [mL]	Proteína total (mg/mL)	Actividad total [U]	Actividad volumétrica [U/mL]	Actividad específica [U/mg]	Factor de purificación	Rendimiento
Extracción	278	10,58	0,31	9,47	0,89	1	100
Centrifugación	268	8,93	0,31	9,56	1,07	1	101
Reparto bifásico	135	1,21	0,77	23,44	19,30	22	248
Ultrafiltración	98	1,20	4,92	149,09	124,37	139	1575

De un extracto inicial con proteína total de 10,58 mg/mL y actividad específica de 1,98 U/g, se obtuvo un extracto final con factor de purificación de 63, que presentó 1,20 mg/mL de proteína, 4,92 U de actividad total y 124,37 U/mg de actividad específica

En los últimos años, nuevas PODs de fuentes vegetales han sido extraídas, purificadas y caracterizadas, en la Tabla 6 se presentan las características más importantes de cada una de ellas en comparación con la CYPOD estudiada en este trabajo.

4.2 Caracterización bioquímica de la peroxidasa de limonaria

4.2.1 Estabilidad a diferentes pH

La CYPOD presentó un rango de pH óptimo de 4,0 a 6,0 como se muestra en la Figura 15; allí mantiene aproximadamente el 100% de su actividad enzimática. Por lo general, las peroxidasas de plantas muestran actividad en un rango de pH de 4,0 a 7,0, ya que fuera de este rango se pierde el grupo hemo del sitio activo debido a la desnaturalización de la proteína (Saikia et al., 2022)

Figura 15

Actividad enzimática de la CYPOD a diferentes pH

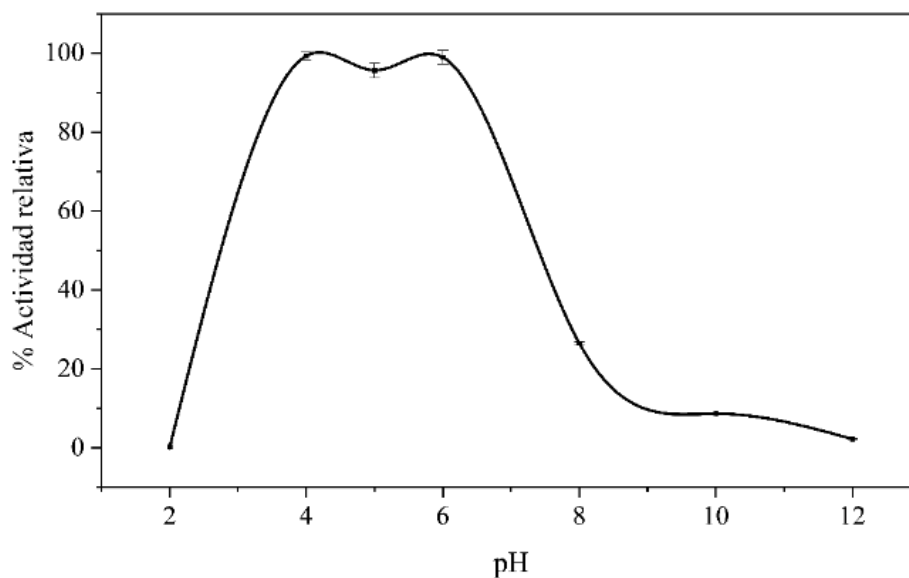


Tabla 6*Propiedades bioquímicas de peroxidasa extraídas recientemente*

Fuente	pH óptimo	Temperatura óptima	Rango de pH ²	Rango de temperatura °C	Peso molecular kDa	Referencia
<i>Panicum maximum</i>	6.0		4 a 12 (70%)	20 a 50	30	(Centeno et al., 2017)
<i>Lepidium sativum sub sp. Sativum</i>	5.0	50	-	50 a 62	44.02	(Altay et al., 2018)
<i>Cedrela fissilis</i>	6.0 a 7.5	-	-	25 a 50	-	(Fritzke et al., 2020)
<i>Zingiber officinale</i>	6.0	50	-	30 a 80	42	(El-Khonezy et al., 2020)
<i>Brassica rapa</i>	5.0	55	5 a 7 (85%)	25 a 40	58	(Dahdouh et al., 2022)
<i>Raphanus sativus</i> ¹	6.5	35	4.0 a 6.0	25 a 55	37.50	(Saikia et al., 2022b)
<i>Abelmoschus esculentus</i>	6.0	55	6.5 a 7 (55%)	30 a 60	43.651	(Ali y Shaker, 2023)
<i>Vernonia amygdalina</i>	6.0	40	5.0 a 7.5 (75%)	-	39	(Ilesanmi y Adedugbe, 2023)
<i>Zanthoxylum armatum</i>	8.0	-	-	-	-	(Yang et al., 2023)
<i>Festuca arundinacea</i>	6.0	25	-	25 a 40	-	(Langsdorf et al., 2023)
<i>Lolium perenne</i>	5.0 a 6.0	30	5.0 a 7.0	25 a 40	-	(Langsdorf et al., 2023)
<i>Luffa acutangula</i>	6.5	30	4.5 a 7.0 (70%)	30 a 60	37	(Basumatary et al., 2023)
<i>Citrullus colocynthis</i>	6.0	40	6.0 a 7.5	20 a 50	37.7	(Ahmad et al., 2024)
<i>Amoracia rusticana (HRP)</i>	7.0	30	6.0 a 7.5	25 a 42	40 a 44	(Lavery et al., 2010)
<i>Cymbopogon citratus</i>	4.0 a 6.0	-	4.0 a 7.0 (50%)	40 a 66	34	Este trabajo

¹ Con pirogagol como sustrato² Rango de pH en que la actividad enzimática fue mayor al porcentaje indicado

La HRP presenta un pH óptimo de 7,0 y a pH 8,0 ya ha perdido significativamente su actividad enzimática (Lavery et al., 2010), a otras peroxidases extraídas recientemente también se les ha estudiado su estabilidad en pH, por ejemplo, la *Brassica rapa*, el *Abelmoschus esculentus* y la *zanthoxylum armatum* presentan pH óptimo en 5,0 (Dahdouh et al., 2022), 6,0 y 8,0 (Yang et al., 2023) respectivamente. A pesar de que la CYPOD a pH 8,0 pierde el 70% de su actividad, en comparación con otras PODs se destaca por su alta estabilidad a pH 4.0, lo que permite su uso en medios ácidos.

Si bien el rango de pH en el que la CYPOD es estable es relativamente estrecho comparado con otras peroxidases estudiadas, mantiene el máximo de actividad uniformemente en todo el rango. Algunas peroxidases también presentan rangos de pH en donde la actividad se mantiene en su máximo como es el caso de la *Zingiber officinale* que conserva más del 90% de actividad de pH 6,0 a 7,5 (El-Khonezy et al., 2020) y la *Lolium perenne* que de pH 5,0 a 6,0 la mantiene por encima del 95% (Langsdorf et al., 2023).

4.2.2 Termoestabilidad

En el estudio de la termoestabilidad se calentó una solución de enzima y se midió la actividad enzimática una vez se alcanzaban las temperaturas determinadas entre 40 y 82°C. En la Figura 15 se presenta la actividad enzimática relativa para cada temperatura donde se muestra que la CYPOD se mantuvo estable y conservó el 80% de su actividad enzimática hasta los 66°C, después de esta temperatura la actividad enzimática se reduce notoriamente indicando que la enzima se desnaturaliza. PODs de diferentes fuentes vegetales han mostrado rangos de estabilidad similares, la *Luffa acutangula* se mostró estable hasta los 60°C

(Basumatary et al., 2023), la *Raphanus sativus* hasta los 55°C (Saikia et al., 2022) y la *Lepidium sativum sub sp. Sativum* hasta los 62°C (Altay et al., 2018).

Para estudiar el proceso de inactivación térmica de la CYPOD se calentó una solución de extracto hasta alcanzar 66°C y se dejó incubar por 15 minutos, seguidamente, cada 10 minutos se extrajeron alícuotas de 2 mL que se dejaron enfriar a temperatura ambiente para medir su actividad enzimática; la gráfica del porcentaje de actividad en función del tiempo se presenta en la Figura 17.

El proceso de inactivación térmica se puede analizar considerándolo como una transformación de un paso, en el que la enzima nativa se convierte en la enzima desnaturalizada debido a la acción de la temperatura (Aymard y Belarbi, 2000). Se puede estudiar como un proceso de primer orden cuya cinética se describe por la ecuación (3), en donde A_t es la actividad enzimática a un tiempo t , A_0 es la actividad enzimática inicial, t es el tiempo y k es la constante de inactivación térmica que sencillamente es la velocidad con la que se desactiva térmicamente la enzima.

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-kt} \quad (3)$$

Al aplicar logaritmo natural a esta ecuación podemos determinar la constante de inactivación graficando $\ln(A_t/A_0)$ en función del tiempo. En la Figura 18 se muestra la recta obtenida, cuya ecuación es $\ln(A_t/A_0) = -3,02794 - 0,00989t$ con $R^2 = 0,99468$. La constante de inactivación k es la pendiente ($0,00989 \text{ min}^{-1}$) e indica que la CYPOD pierde ese valor de unidades de actividad cada minuto al incubarse a 66°C.

Figura 16

Actividad relativa de la CYPOD a diferentes temperaturas

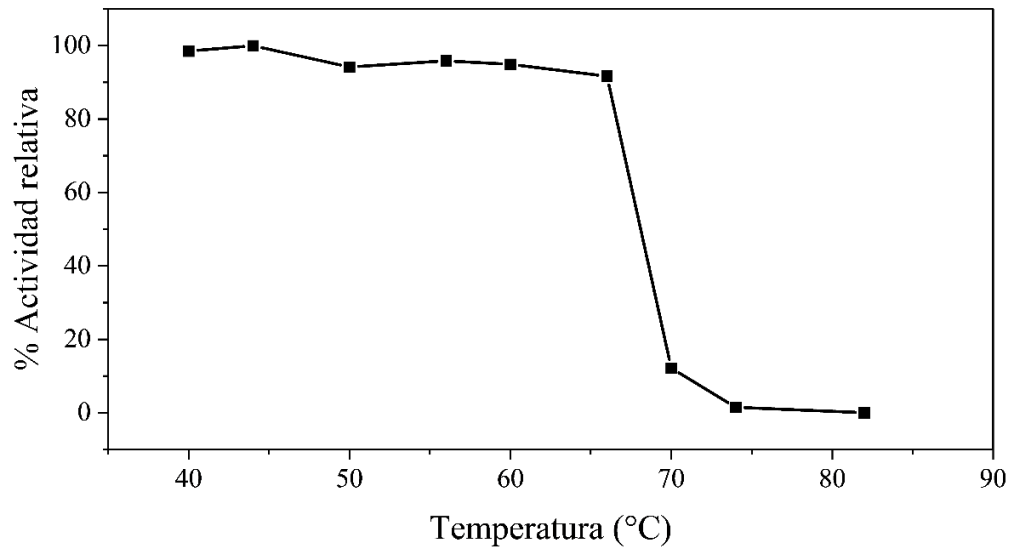
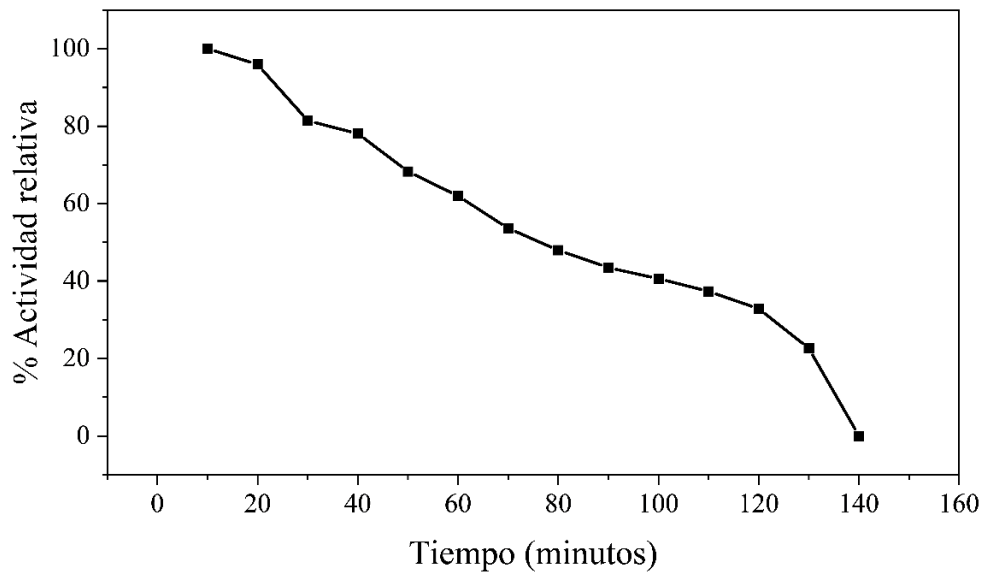


Figura 17

Actividad residual de la CYPOD en función del tiempo

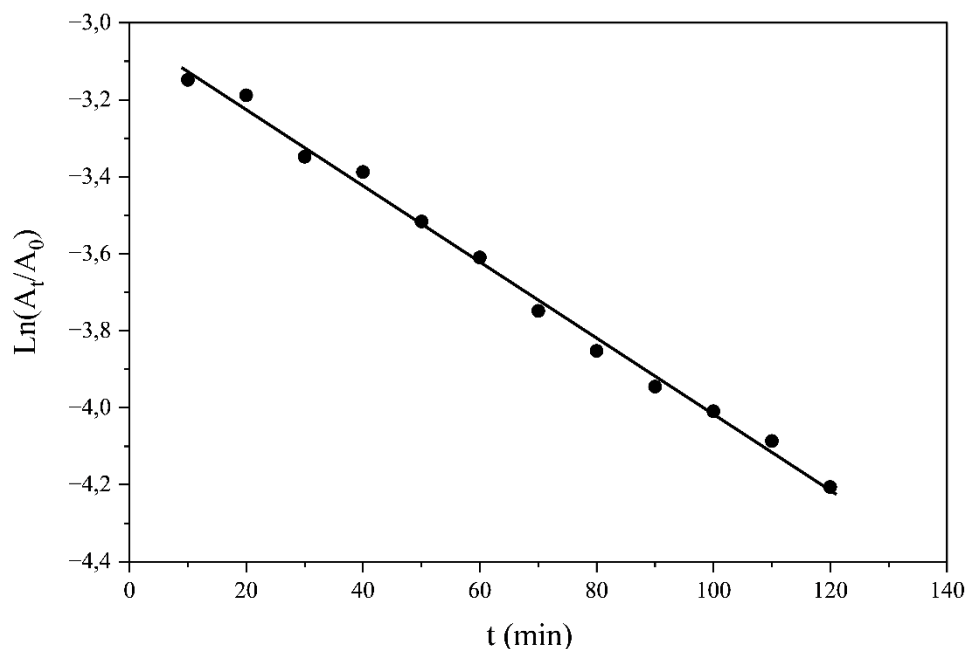


La POD del *Panicum maximum* presentó una constante de inactivación similar de $0,008 \text{ min}^{-1}$ tras incubarse a 65°C (Centeno et al., 2017), la de *Manilkara zapota* fue de

0.0384 min⁻¹ a 70°C (Vishwasrao et al., 2017), y la de *Brassica chinesis* 0.474 min⁻¹ a 60°C. Un valor bajo en la constante indica que la enzima se inactiva a menor velocidad a determinada temperatura, lo que corresponde a mayor estabilidad térmica, por lo que, en comparación con otras PODs, se podría decir que la CYPOD posee alta estabilidad térmica al tener una menor constante de inactivación.

Figura 18

Cinética de la inactivación térmica de la CYPOD



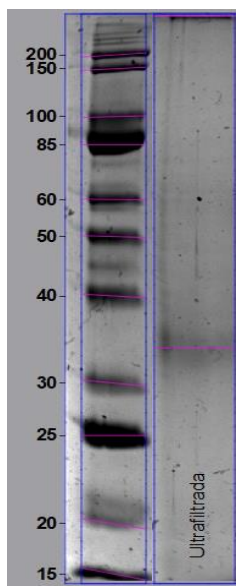
4.2.3 Determinación de la masa molecular por electroforesis

Se aplicó electroforesis SDS-PAGE al 10% al extracto de la última etapa de la semi-purificación (ultrafiltración con amicones de 30 kDa) para observar las posibles bandas presentes. En la Figura 19 se muestra el gel donde se puede observar una mancha en una masa de 33,4 kDa con respecto al marcador de tris-glicina, la cual podría ser la CYPOD. Las PODs por lo general se encuentran en un rango de masa de 30 a 150 kDa (Hamid y Khalil-

ur-Rehman, 2009), en la Tabla 6 presentan los pesos moleculares de algunas que han sido estudiadas recientemente.

Figura 19

SDS-PAGE al 10% del extracto final



Nota. Carril de la izquierda: marcador de peso molecular Tris-Glicina, carril de la derecha: extracto ultrafiltrado.

4.3 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD

La velocidad de reacción de las enzimas depende de la concentración de sustrato. Dicho fenómeno puede ser estudiado por medio de la cinética del estado estacionario, en la que se miden las velocidades iniciales (V_0) de la reacción en condiciones tales que, el intermedio enzima-sustrato se mantiene constante (Lorsch, 2014). La relación entre la velocidad inicial y la concentración de sustrato ($[S]$) se describe según la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 4) en donde V_{max} representa la velocidad máxima que alcanza

la reacción, es decir, cuando se satura de sustrato y K_m que es la concentración a la cual la velocidad de reacción es igual a $\frac{1}{2}V_{max}$ (Nelson y Cox, 2009).

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Esta ecuación también describe el comportamiento cinético de enzimas bisustráticas como las PODs si se mantiene constante uno de los sustratos mientras se varía el otro y viceversa (Pérez Galende et al., 2015). Los parámetros K_m y V_{max} son útiles para comparar la especificidad de una enzima frente a varios sustratos, sin embargo, determinarlos experimentalmente requiere de la medición de la V_0 en un rango adecuado, en el que se tomen concentraciones de sustrato menores y mayores a la K_m , y en condiciones de saturación del sustrato que permanece constante (Punekar, 2018).

Por lo anterior, en esta etapa se estudió la dependencia de la actividad enzimática, que es una medida de la velocidad de reacción, de la CYPOD con diferentes sustratos agentes reductores (guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina y ABTS) frente a variaciones de la concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de sustrato y pH. Esto con el fin de estimar los factores que más influyen en la cinética de la reacción y las condiciones para la determinación de los parámetros cinéticos de la CYPOD con cada sustrato.

4.3.1 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente al guayacol

En el estudio preliminar de la especificidad sustrática se analizaron los efectos de pH, concentración de H_2O_2 y concentración de guayacol en la actividad enzimática de la CYPOD. En la figura 20 se presenta la actividad enzimática en función de la concentración de guayacol

manteniendo constante la concentración de peróxido, aquí se observa que al aumentar la concentración de guayacol aumenta la actividad.

En la región de bajas concentraciones, el aumento de la actividad es grande respecto al aumento del guayacol, pero a medida que se avanza a concentraciones mayores, los cambios de actividad empiezan a disminuir, es decir, la pendiente va disminuyendo, esto indica que la enzima está próxima a alcanzar el punto de saturación, con guayacol, sin alcanzar su velocidad máxima, por lo que la concentración de saturación no se encontró en el rango estudiado. También se evidencia que al disminuir el pH disminuye la actividad enzimática, de modo que a pH 7.0 la actividad es aproximadamente el 50% de lo que era a pH 4.0.

Por otro lado, en la Figura 21 se muestra la actividad en función de la concentración de H_2O_2 manteniendo constante la concentración de guayacol. En este caso, adiciones de peróxido de 2 a 10 mM no generan grandes cambios en la actividad enzimática, por lo que se puede inferir que la peroxidasa ya se encuentra saturada de H_2O_2 a estas concentraciones. Sin embargo, para la determinación de los parámetros cinéticos sería necesario ampliar el rango a concentraciones menores para alcanzar a incluir a la K_m .

Figura 20

Actividad enzimática de la CYP0D en función de la concentración de guayacol

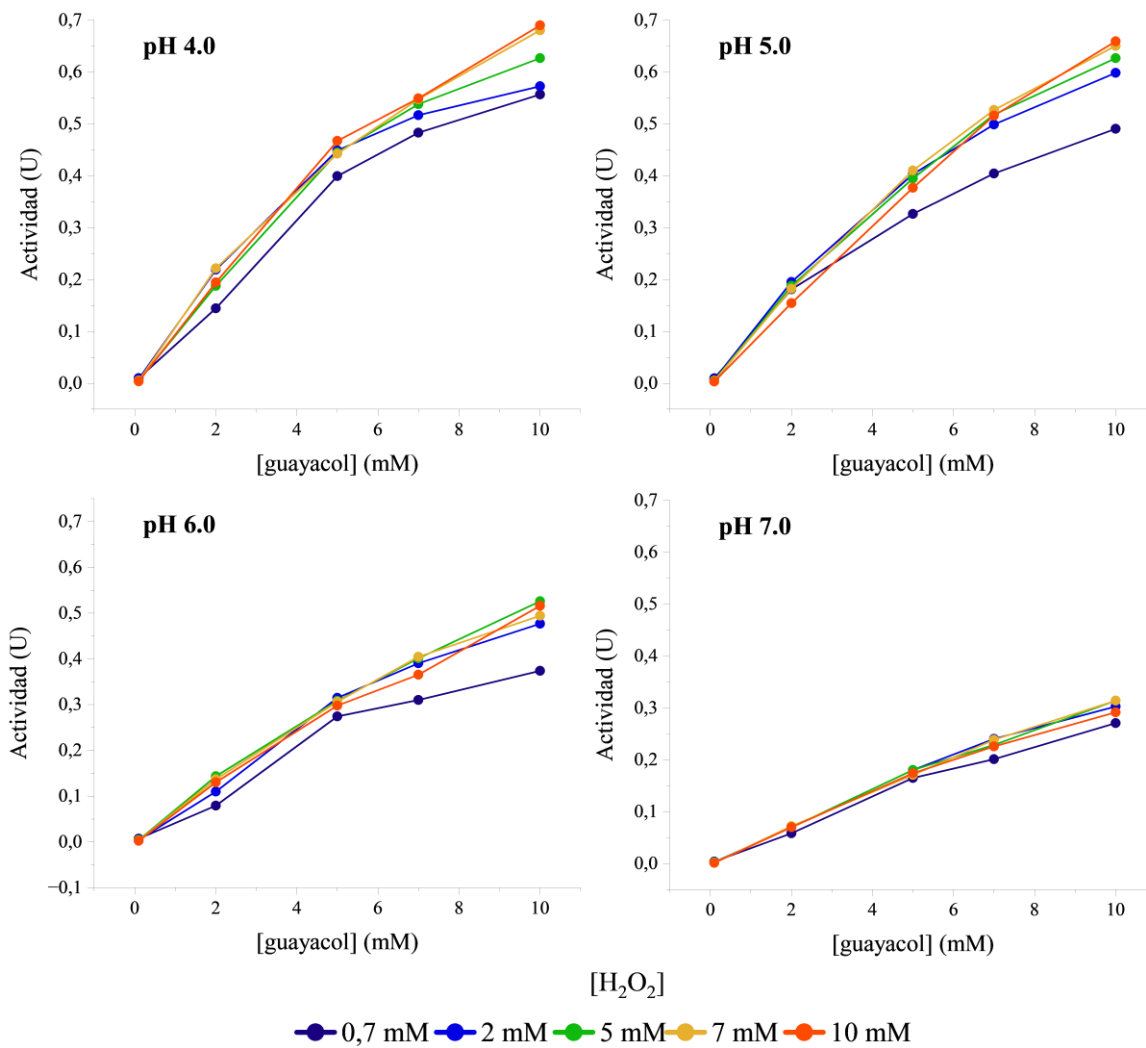
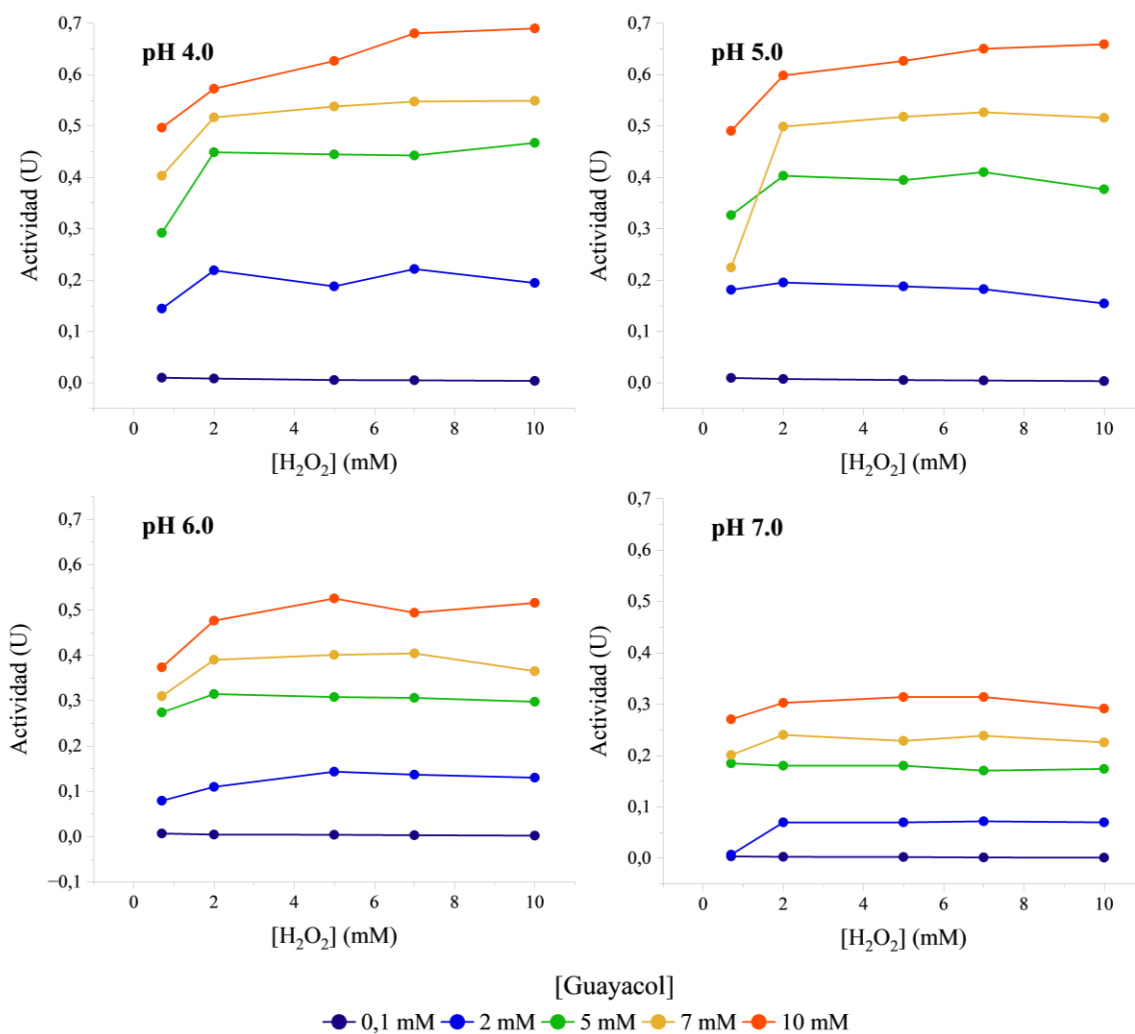


Figura 21

Actividad enzimática de la CYP0D en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con guayacol como segundo sustrato.

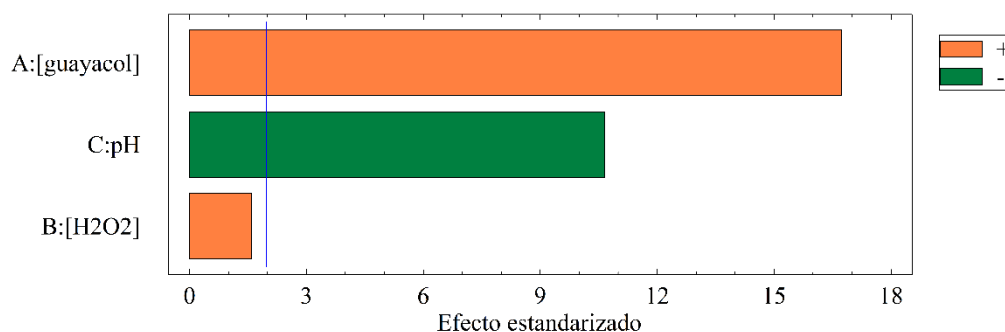


El diagrama de Pareto (Figura 22) presenta los efectos estimados y las interacciones más significativas, mostrando la contribución de cada factor a la variabilidad de la respuesta. Los signos representan el sentido del efecto, el (+) indica que al aumentar el factor aumenta la actividad enzimática, el (-) que disminuye. Al comparar el peso de la influencia de los

factores en la actividad catalítica de la peroxidasa se encontró que los que más efecto tienen sobre la CYPOD son la concentración de guayacol, que al aumentar favorece la acción catalítica, y el pH, que al aumentar disminuye la actividad.

Figura 22

Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H₂O₂ y guayacol.

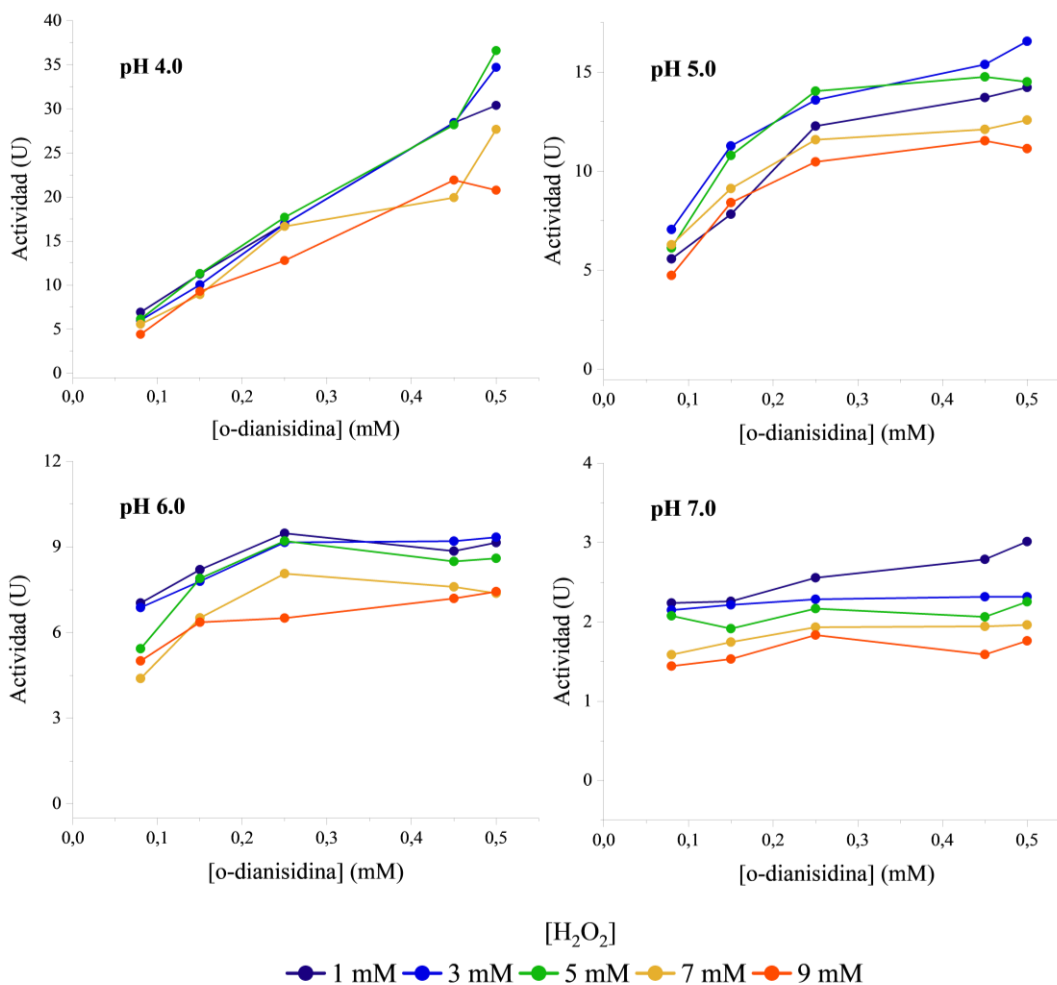


4.3.2 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente a la o-dianisidina

También se analizó la influencia de los factores mencionados sobre la actividad catalítica de la enzima en la reacción entre o-dianisidina, H₂O₂ y CYPOD. En la Figura 23 se presenta la actividad enzimática en función de la concentración de o-dianisidina manteniendo constante la concentración de peróxido. Se evidencia un aumento de la actividad al aumentar la concentración de o-dianisidina y disminuir el pH en los intervalos ensayados. El pH óptimo es 4,0 y en el intervalo de concentraciones de o-dianisidina no se alcanza la saturación, por lo que se propone explorar a concentraciones mayores a 0,5 mM.

Figura 23

Actividad enzimática de la CYP0D en función de la concentración de o-dianisidina



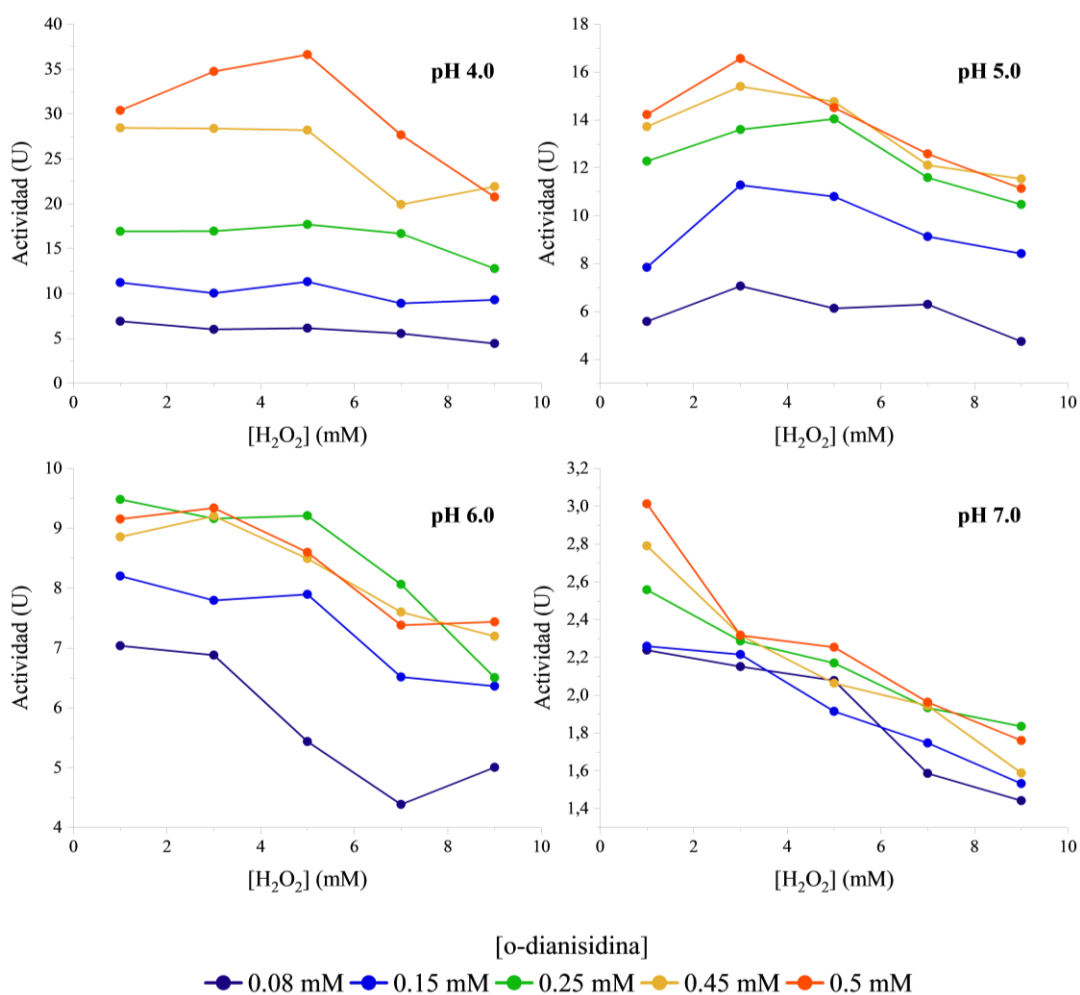
Nota. La concentración de H₂O₂ se mantiene constante según los colores indicados en la leyenda inferior.

En la Figura 24 se presenta la actividad enzimática en función de la concentración de H₂O₂ a concentración de o-dianisidina constante. De manera general, la actividad disminuye al aumentar la cantidad de peróxido, por lo que en este rango de concentraciones, el H₂O₂ ya alcanzó el umbral en el que empieza a desactivar la enzima, como se sabe que sucede con las peroxidasas (Cuadrado et al., 2011; Galende et al., 2015). Además, a medida que el pH

aumenta, la actividad disminuye más fácilmente con las mismas cantidades de peróxido, por lo que se podría decir que la inactivación de la CYPOD por exceso de pH es dependiente del pH, este efecto también se ha evidenciado y estudiado en otras peroxidetasas como la HRP (Malomo et al., 2011).

Figura 24

Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con o-dianisidina como segundo sustrato.



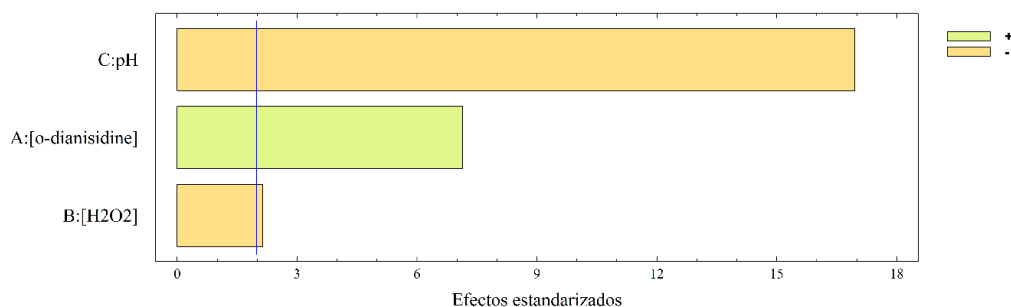
Nota. La concentración de o-dianisidina se mantiene constante según los colores indicados en la leyenda inferior.

También, puede que se esté dando un efecto de “protección” debido a la presencia del segundo sustrato, como lo han demostrado Arnao et al., (1990) y Hiner et al., (2000), porque a pesar de que va disminuyendo la actividad por el exceso de H₂O₂, se mantiene que, a mayor concentración de o-dianisidina mayor actividad, indicando que la inactivación depende de la relación de concentraciones de H₂O₂ y sustrato reductor simultáneamente. A 5 mM de peróxido se alcanza la saturación y se recomienda extender las concentraciones para ensayar a valores menores para incluir a la K_m en el intervalo de estudio.

En el diagrama de Pareto (Figura 25) en este caso, nuevamente se evidencia que los factores que más influyen en la actividad catalítica son el pH y la concentración del sustrato reductor (o-dianisidina), sin embargo, en comparación con el guayacol, la concentración de H₂O₂ presenta mayor influencia, además de ser negativa, esto puede ser por el rango de concentraciones de peróxido en las que se trabajó, que resultó ser en la zona de inactivación de la enzima.

Figura 25

Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H₂O₂ y o-dianisidina.

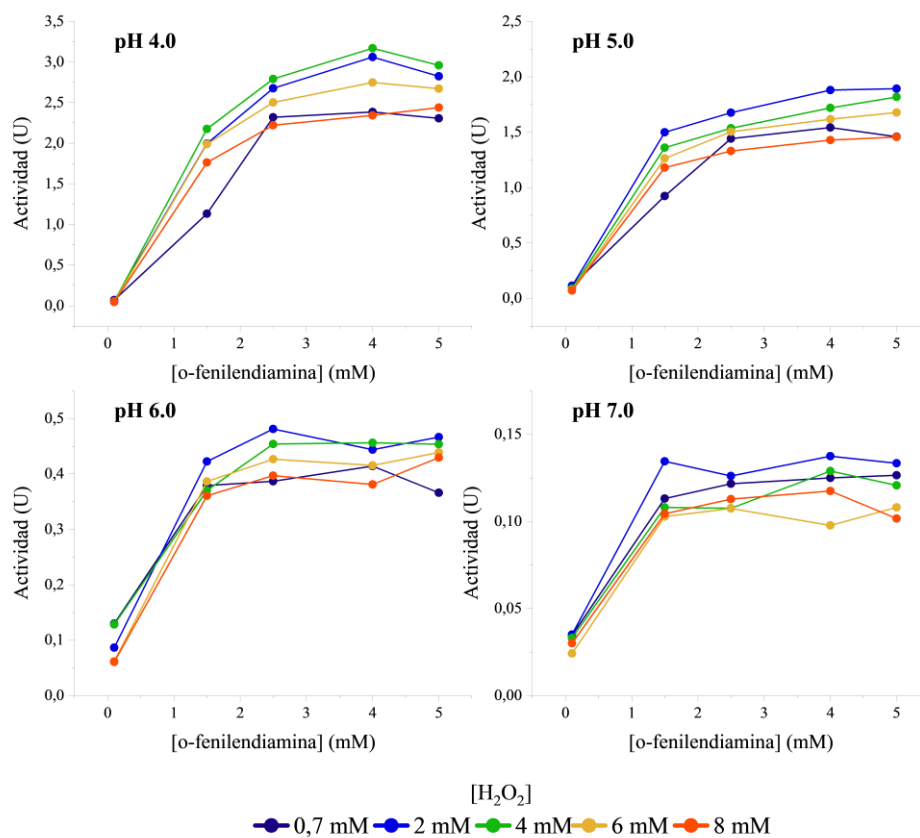


4.3.3 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente a la *o*-fenilendiamina

Para la *o*-fenilendiamina se observa un comportamiento similar a los anteriores sustratos, para los cuales, al aumentar la concentración de sustrato reductor, manteniendo constante el H_2O_2 aumenta la actividad, no obstante, para este sustrato se observa que a partir de 4mM de *o*-fenilendiamina alcanza la saturación, en donde añadir más sustrato no aumenta la velocidad de reacción (Figura 26). Además, a menores pH aumenta la actividad, presentando un máximo a pH 4,0, al igual que los anteriores sustratos.

Figura 26

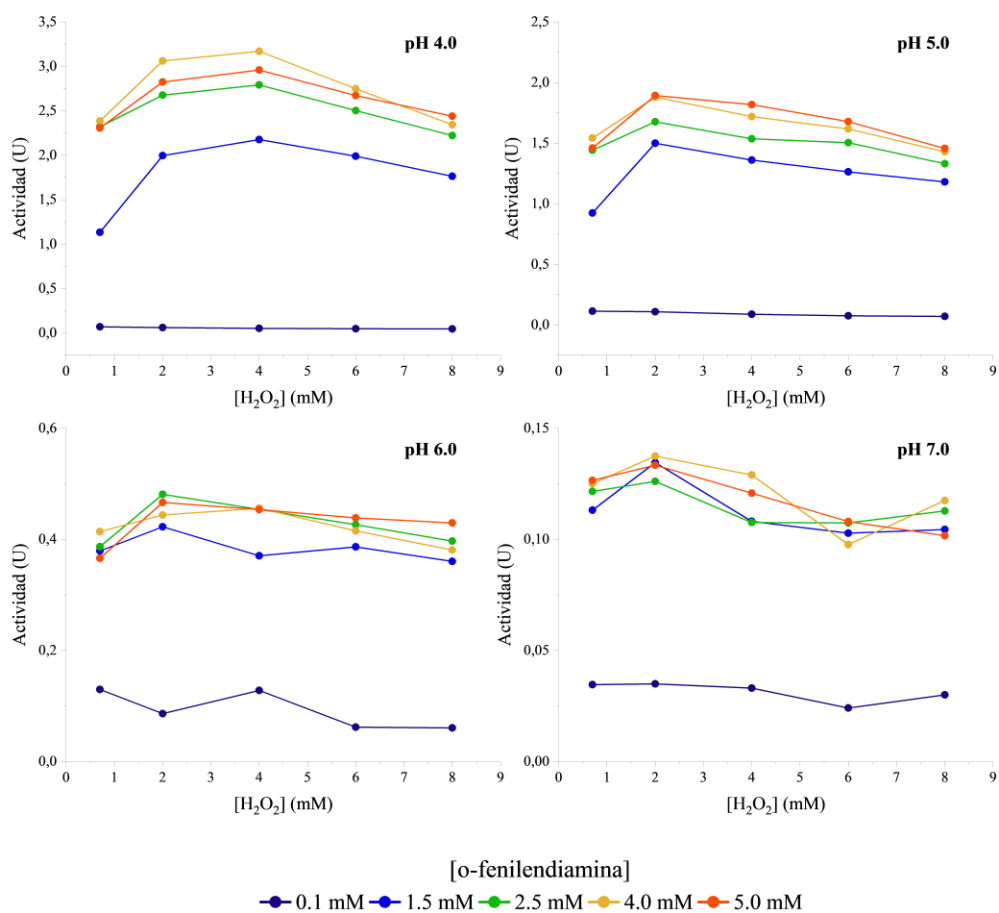
Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de o-fenilendiamina



Nota. La concentración de H_2O_2 se mantiene constante según los colores indicados en la leyenda inferior.

Figura 27

Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con o-fenilendiamina como segundo sustrato.



Nota. La concentración de o-fenilendiamina se mantiene constante según los colores indicados en la leyenda inferior.

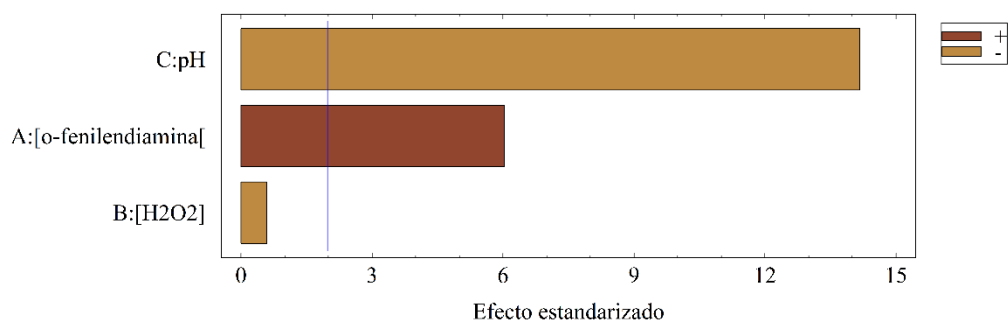
A su vez, en los ensayos de variación de la concentración de H_2O_2 con o-fenilendiamina constante se observa que la CYPOD se encuentra entre el límite de saturación

e inactivación por el peróxido (Figura 27) y que, en general, en 2 mM de H_2O_2 alcanza la saturación y más allá de esta concentración empieza la inactivación.

En el diagrama de Pareto (Figura 28) se muestra que el orden descendente de factores con mayor efecto en la actividad enzimática son: pH, concentración del sustrato reductor (o-fenilendiamina) y concentración de H_2O_2 , siendo negativos el primero y el último, y positiva solo la concentración de o-fenilendiamina.

Figura 28

Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H_2O_2 y o-fenilendiamina.



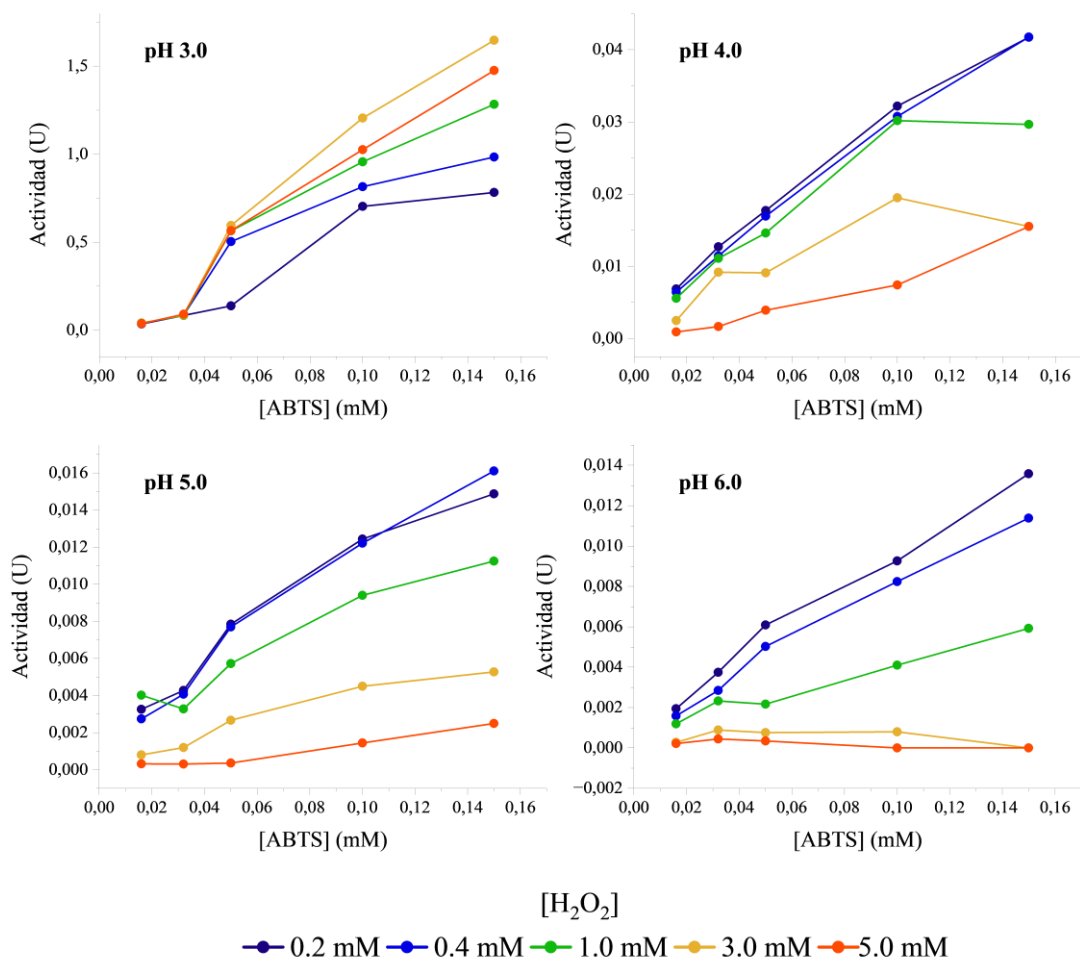
4.3.4 Estudio preliminar de la especificidad sustrática de la CYPOD frente al ABTS

En el estudio de la especificidad sustrática con el ABTS al variar la concentración de sustrato reductor manteniendo constante la concentración de H_2O_2 (Figura 29) se observa una relación aproximadamente lineal, indicando que, en el intervalo de concentraciones ensayadas, la CYPOD no se encuentra saturada por lo que se recomienda ensayar a concentraciones mayores a 0,15 mM. Esta reacción presenta alta sensibilidad al pH ya que a pHs diferentes a 3,0 la CYPOD posee apenas un 2% de la actividad que muestra a pH 3,0

bajo las mismas condiciones, esto se apoya de otros estudios en los que las reacciones de PODs con ABTS han demostrado mayor actividad en ambientes ácidos en estrechos rangos de pH (Drozd et al., 2016; Sáez-Jiménez et al., 2015).

Figura 29

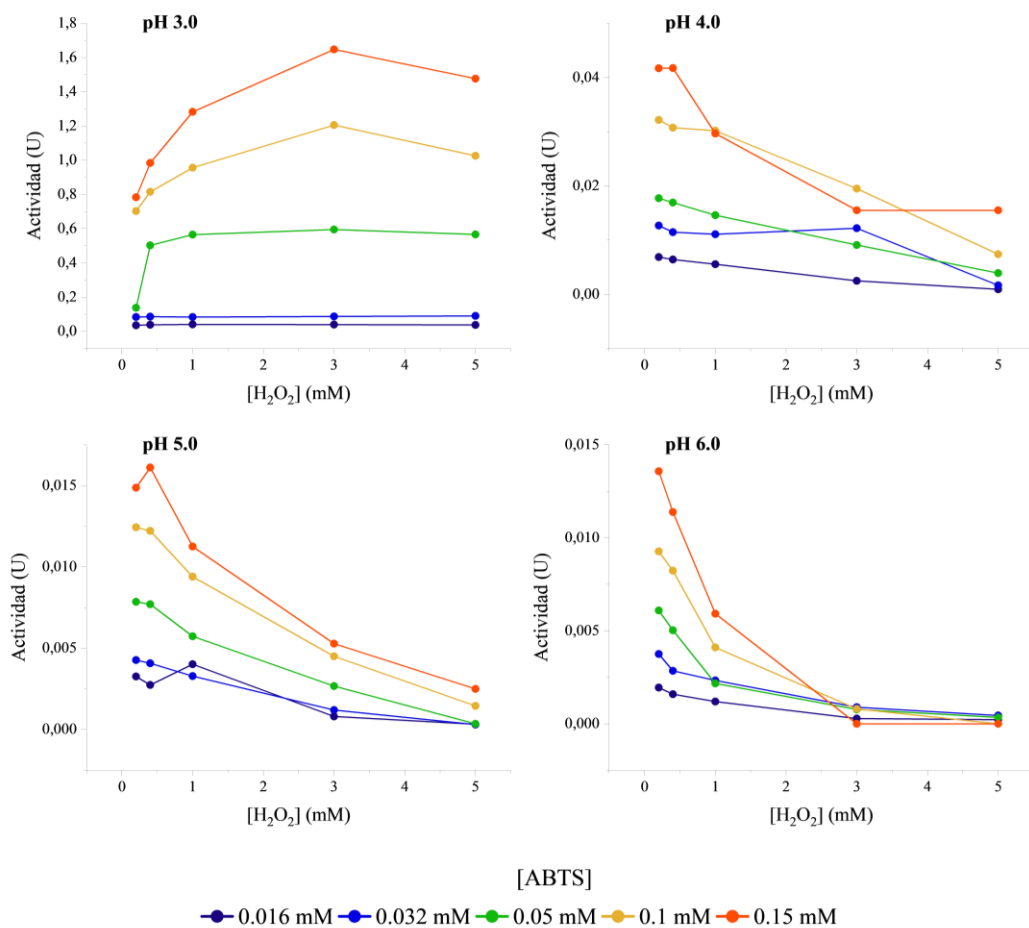
Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de ABTS



Nota. La concentración de H_2O_2 se mantiene constante según los colores indicados en la leyenda inferior.

Figura 30

Actividad enzimática de la CYPOD en función de la concentración de peróxido de hidrógeno con ABTS como segundo sustrato.



Nota. La concentración de ABTS se mantiene constante según los colores indicados en la leyenda inferior.

En la Figura 30 donde se grafica la actividad en función de la concentración de H₂O₂ a ABTS constante se evidencia que nuevamente la CYPOD se encuentra en la zona de inactivación por exceso de peróxido de pH 4,0 a pH 6,0 y que el ABTS también llega a ejercer cierto efecto de protección. A pH diferentes a 3,0, se presenta una mayor actividad catalítica a concentraciones de H₂O₂ más bajas, pero a pH 3,0 la tendencia cambia siendo más activa

con concentraciones de H₂O₂ más altas, de manera que, a dicho pH se estabiliza lo suficiente para ampliar el rango de concentraciones de H₂O₂ en el que posee actividad catalítica significativa. Adicionalmente, la CYPOD alcanza la saturación de H₂O₂ a 3mM. El diagrama de Pareto para el ABTS mostró tendencias similares a los otros sustratos y se observa en la Figura 31.

Figura 31

Diagrama de Pareto para los factores que influyen en la actividad enzimática de la CYPOD en presencia de H₂O₂ y ABTS.

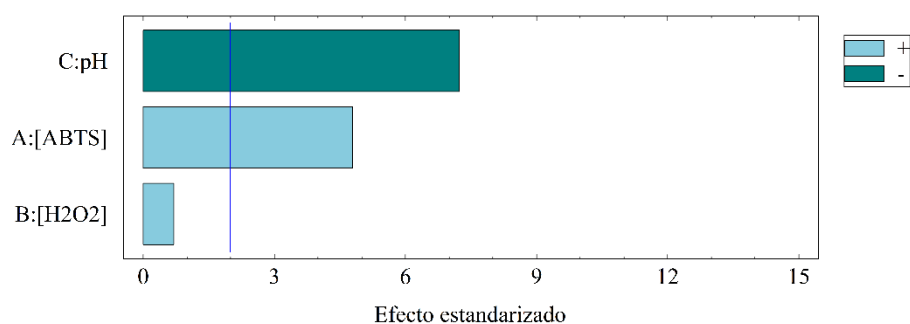


Tabla 7

Condiciones estimadas para obtener las curvas de Michaelis Menten

Sutrato	AH ₂ [mM]	H ₂ O ₂ [mM]	Rango AH ₂ [mM]	Rango H ₂ O ₂ [mM]
guayacol	>10	2 a 10	0,1 a >10	<2 a 7
o-dianisidina	>0,5	5	0,08 a >0,5	<2 a 5
o-fenilendiamina	4	4	0,1 a 5,0	<0,7 a 4
ABTS	>0,15	3	0,016 >0,15	<0,2 a 3

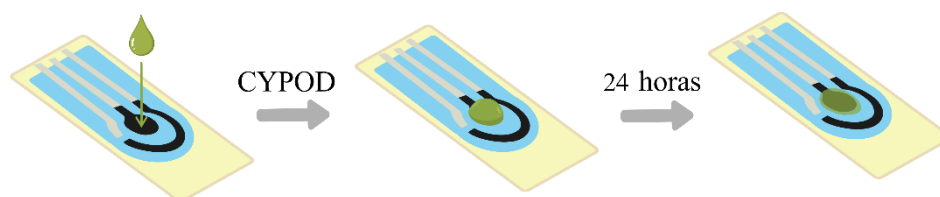
En la Tabla 7 se resumen las observaciones y estimaciones de las concentraciones y rangos de concentraciones apropiados para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima frente a los cuatro sustratos estudiados.

4.4 Modificación y caracterización de los electrodos por métodos electroquímicos

A través de adsorción física (Figura 32) se inmovilizó la peroxidasa de las hojas de limonaria (CYPOD) en electrodos serigrafados de carbono modificados con óxido de grafeno (SPGE). Esto se hizo depositando 10 μL del extracto enzimático sobre el electrodo de trabajo y dejando secar a la oscuridad y a temperatura ambiente por 24 horas. De esta manera se modificaron los electrodos SPGE/CYPOD-RB con el extracto tras el reparto bifásico y el SPGE/CYPOD-UF con el extracto ultrafiltrado.

Figura 32

Modificación de los SPGE con CYPOD



Para confirmar la adsorción de la peroxidasa al electrodo, se midieron los VCs de los SPGE/CYPOD en una solución 100 mM de PBS pH 6,0 y 0,1M KCl (Figura 33). Se observa que los electrodos modificados con peroxidasa presentan una pareja de picos catódico y anódico a 68,3 mV y 349,1 mV, respectivamente para ambos extractos (Tabla 8), que se pueden atribuir a la oxidación y reducción del hierro del grupo hemo de la peroxidasa, este par de picos presenta una ΔE_p de 280 mV.

Tabla 8

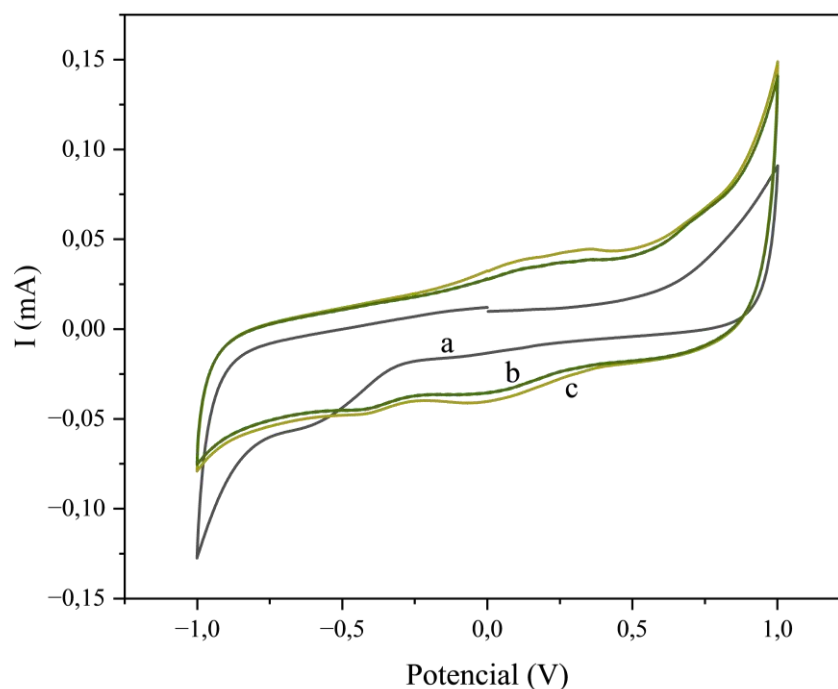
Valores de corriente y voltaje de los picos en los voltamperogramas cíclicos con PBS

Sistema	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	I_{pa} [μ A]	I_{pc} [μ A]	ΔE_p [mV]	I_{pc}/I_{pa}
SPGE/CYPOD-RB	349,1	68,3	-41,16	44,5	280,7	1,0811
SPGE/CYPOD-UF	349,1	68,3	-36,52	38,5	280,7	1,0542

Según la ecuación de Nernst, si una reacción con transferencia de un electrón es electroquímica y químicamente reversible la separación entre picos (ΔE_p) será de 59 mV (Bard y Faulkner, 2000), si es mayor, significa que la velocidad de transferencia de electrones es más lenta que la velocidad de transferencia de masa en el electrolito.

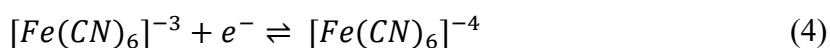
Figura 33

Voltamperogramas cíclicos medidos a 100mVs-1 en solución de PBS 100 mM pH 6.0 y 0,1M KCl en (a) SPGE (b) SPGE/CYPOD-UF (c) SPGE/CYPOD-RB



Seguidamente, para estudiar la reversibilidad de los electrodos modificados, estos se analizaron por medio de voltamperometría cíclica con ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), un electrolito modelo para la caracterización de sistemas electroquímicos, debido a la alta definición de sus picos redox y al carácter reversible de su reacción. En la Figura 34 se observan los VCs tomados para el electrodo modificado con la peroxidasa y para un electrodo sin modificar en una solución 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ y 0,1M KCl.

Los voltamperogramas presentan picos de oxidación y reducción bien definidos para ambos sistemas (Figura 34), el resumen de los parámetros identificados se muestra en la Tabla 9. Para el electrodo sin modificar aparece un pico anódico a 261 mV correspondiente a la reducción del $[Fe(CN)_6]^{-3}$, y un pico catódico a -27 mV correspondiente a la oxidación del $[Fe(CN)_6]^{-4}$ según la reacción de la ecuación 4. Por otro lado, los electrodos modificados los presentan a 173 mV y 81 mV para el SPGE/CYPOD-RB y a 322 mV y 285 mV para el SPGE/CYPOD-UF, respectivamente.



El ΔE_p para el SPGE fue de 285 mV, para el SPGE/CYPOD-RB 93 mV y para el SPGE/CYPOD-UF 58 mV. Los electrodos modificados presentaron menor separación de picos que el electrodo sin modificar, demostrando que la acción de la peroxidasa mejora la reversibilidad del sistema $[Fe(CN)_6]^{-3}/[Fe(CN)_6]^{-4}$ al facilitar la transferencia electrónica entre el electrodo y el electrolito.

Figura 34

Voltamperogramas cíclicos medidos a 100 mVs-1 en solución 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ y 0,1M KCl de (a) SCPE (b) SPGE/CYPOD-UF (c) SPGE/CYPOD-RB

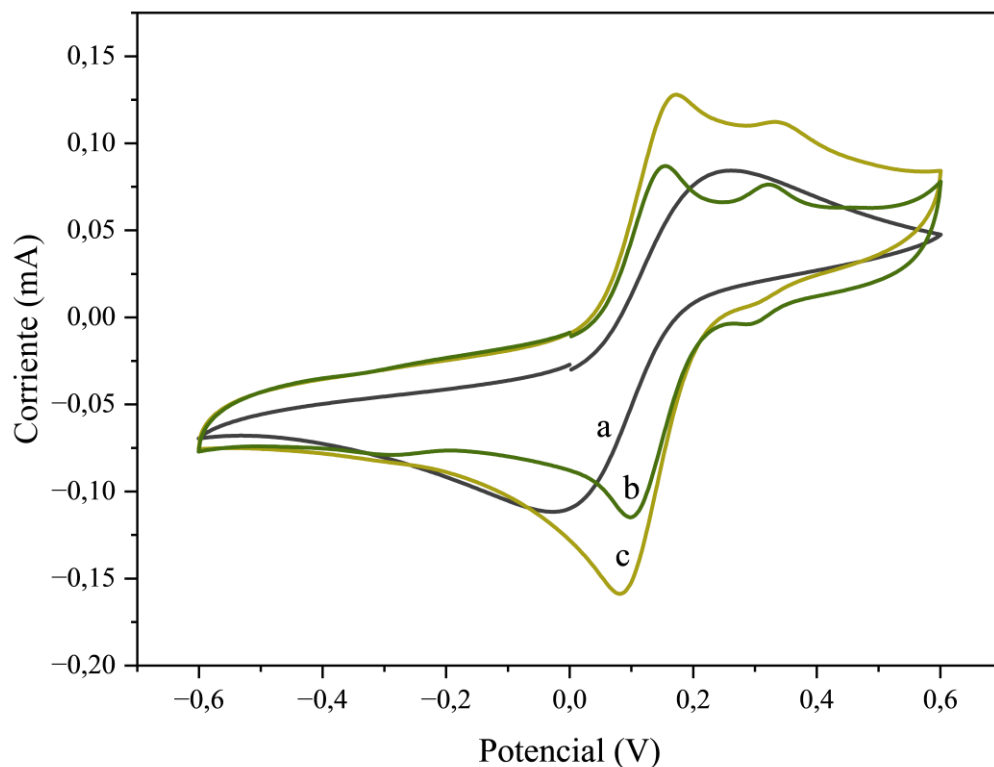


Tabla 9

Valores de corriente y voltaje de los voltamperogramas cíclicos con $K_3[Fe(CN)_6]$

Sistema	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	I_{pa} [μA]	I_{pc} [μA]	ΔE_p [mV]	I_{pc}/I_{pa}
SPGE	261	-27	84	-112	285	1,324
SPGE/CYP OD-RB	173	80	128	-159	93	1,241
SPGE/CYP OD-UF	156	97	87	-114	58	1,320

La relación de las corrientes de los picos anódicos y catódicos para el SPGE fue de 1,324, para el SPGE/CYPOD-RB 1,241 y para el SPGE/CYPOD-UF 1,320. En un proceso reversible la relación I_{pc}/I_{pa} es igual a 1, esto es debido a que los máximos de los gradientes de concentración en la superficie del electrodo, para las especies correspondientes en cada pico, son iguales y que, además, el transporte de masa no dirige el proceso (Yamada et al., 2022). De esta manera, se confirma que el proceso en los electrodos modificados, al tener valores cercanos pero diferentes a 1, es quasi-reversible y está controlado por el transporte de masa. Otra pareja de señales aparece para los dos electrodos modificados entre 250 mV y 400 mV, las cuales podrían ser interferencias electroactivas presentes en el extracto que no se lograron eliminar en el proceso de purificación.

4.5 Reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno

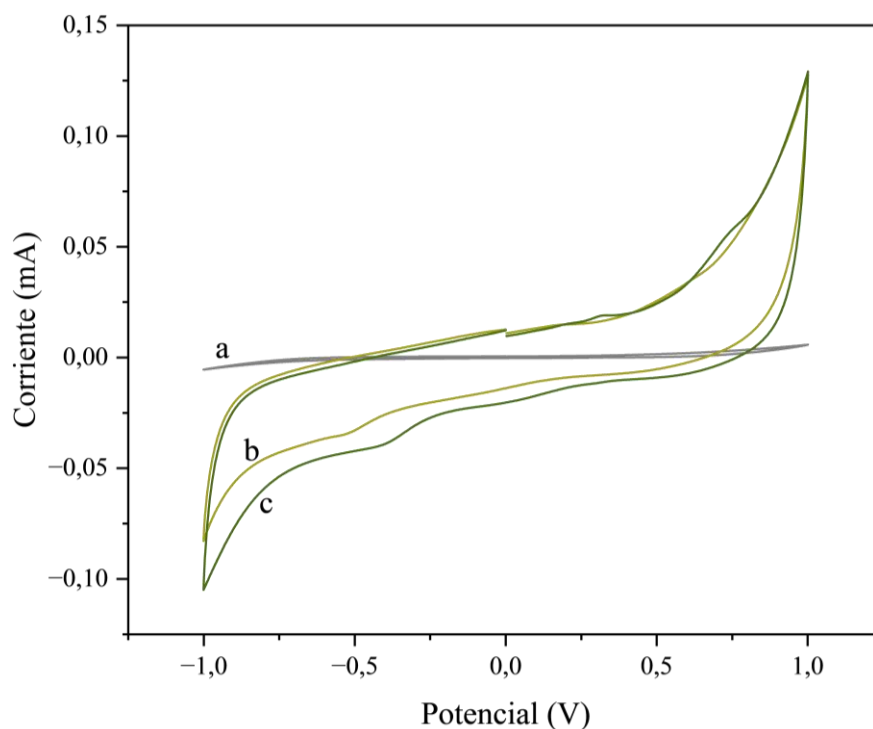
Se realizó un primer ensayo para evaluar si los electrodos modificados con los extractos de peroxidasa tenían respuesta frente al peróxido de hidrógeno, para esto se tomaron VCs de los electrodos modificados y el electrodo sin modificar en una solución de H_2O_2 1mM y 0,1M KCl a 50 mVs^{-1} (Figura 35). Se observa que en los electrodos modificados surgen unas señales a -0,42 V para el SPGE/CYPOD-UF y a -0,53 V para el SPGE/CYPOF-RB que no se presentan en el electrodo sin modificar por lo que se atribuyen a la reducción del H_2O_2 mediada por la enzima.

Lo anterior posiblemente se da a través del mecanismo de transferencia electrónica directa de las peroxidasas sobre electrodos (Figura 36), en el cual, durante un primer paso del ciclo catalítico, la enzima reduce al H_2O_2 y, a su vez, este oxida a la enzima mediante una reacción de transferencia de dos electrones. Seguidamente, la reducción del compuesto I, un complejo oxoferril unido a un catión de porfirina (estado de oxidación +5), al compuesto II

(estado de oxidación +4) genera la corriente catódica que se observa en la Figura 34 (Ruzgas et al., 1996).

Figura 35

Voltamperograma cíclico de los electrodos con solución 1.0 mM de H₂O₂ y 0.1 M KCl a 50 mV/s de (a) SPGE (b) SPGE/CYPOD-RB (c) SPGE/CYPOD-UF

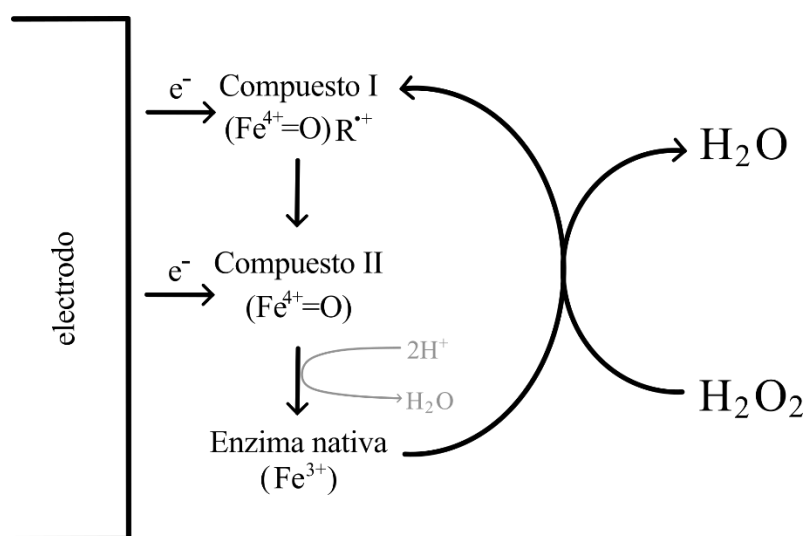


A mayor factor de purificación del extracto, el potencial de reducción del H₂O₂ en el sistema con la CYPOD se desplaza a potenciales menos negativos, reduciendo el sobrepotencial, lo cual representa una ventaja para la detección del peróxido de hidrógeno, puesto que se minimiza el riesgo de tener reacciones de interferencia, y la corriente de fondo y los niveles de ruido serán menores (Ghindilis et al., 1997). Por ende, el sistema SPGE/CYPOD-UF al mostrar un sobrepotencial menor que SPGE/CYPOD-RB presenta una mejor respuesta frente a la reducción del H₂O₂.

El potencial de reducción del H_2O_2 en los sistemas con CYPOD es prometedor comparando con otros estudios de electrodos modificados con peroxidasa, por ejemplo, con la *Lepidium sativum* se construyó un biosensor amperométrico modificado con BiFeO_3 que presentó el potencial de reducción a $-0,8 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Con un biosensor de POD de pasto guinea (*Panicum maximum*) sobre electrodos se obtuvo a $-0,65 \text{ V vs Ag/AgCl}$ (Uribe et al., 2019) y otro modificado con peroxidasa de tabaco redujo el peróxido a $0,65 \text{ vs SCE}$ (Ciogli et al., 2021).

Figura 36

Mecanismo de la reducción bioelectrocatalítica directa del peróxido de hidrógeno en electrodos modificados con peroxidasa



Nota. Adaptado de (Ruzgas et al., 1996)

Figura 37

Voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno a 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0

mM, 3.0 mM y 4.0 mM en KCl 0.1 M a 50 mVs-1 para (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF

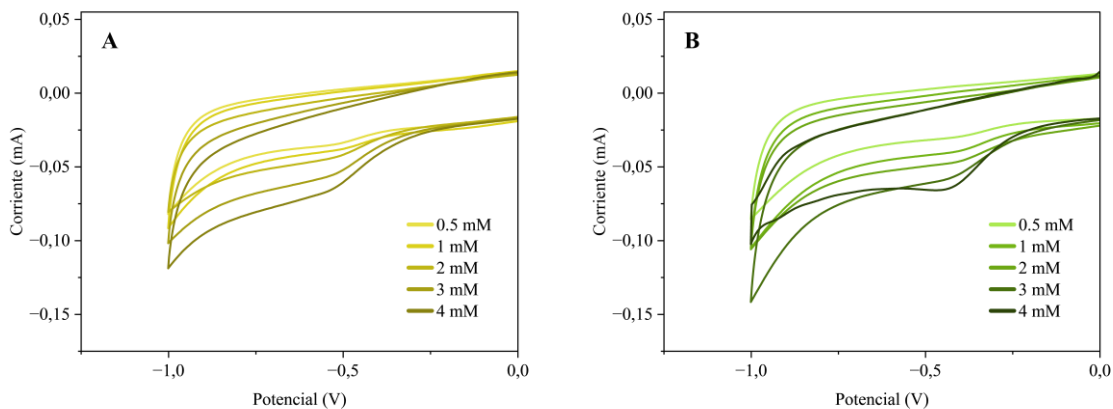
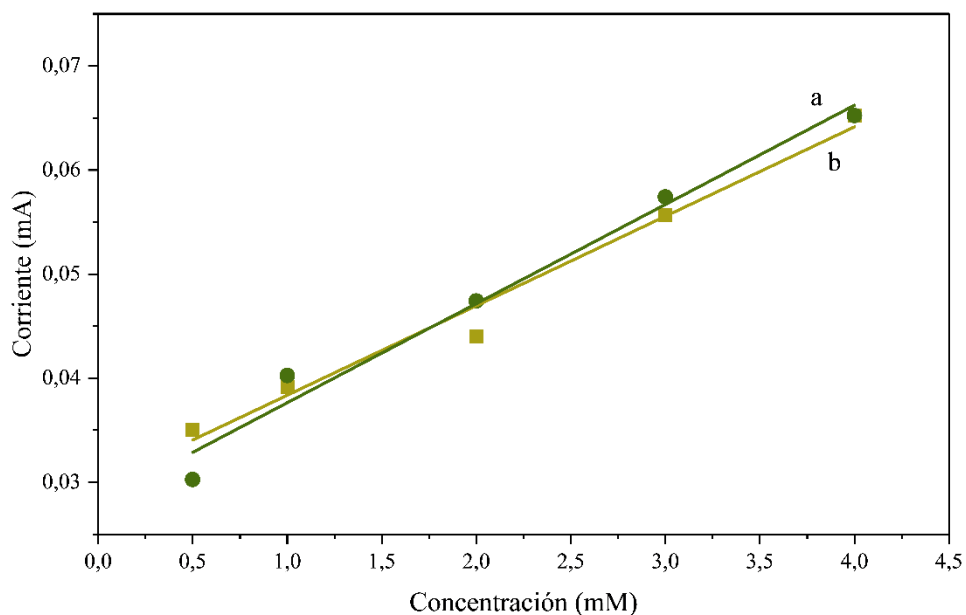


Figura 38

Curva de calibración para el peróxido de hidrógeno a 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM, 3.0 mM y 4.0 mM en KCl 0.1 M para (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF



Al ensayar midiendo los VCs de los electrodos modificados para diferentes concentraciones de H_2O_2 (Figura 36) se observó una relación lineal entre la corriente del pico

catódico y las concentraciones del peróxido, arrojando las ecuaciones presentadas en la Figura 38, $I_{pH_2O_2}=0,02976+0,0086[H_2O_2]$ para el CYPOD-RB con R^2 de 0,98128 y $I_{pH_2O_2}=0,0281+0,00953[H_2O_2]$ para el CYPOD-UF con R^2 de 0,98008. Ambos electrodos muestran resultados congruentes, con desviaciones estándar de 0,0012 y 0,0007 para el corte con y y la pendiente respectivamente. Esto demuestra que la peroxidasa de limonaria tiene potencial para la detección cuantitativa del peróxido de hidrógeno en soluciones acuosas.

4.6 Efecto de la velocidad de barrido sobre la respuesta bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno

Para evaluar las mejores condiciones para la detección de H_2O_2 con los SPGE/CYPOD se estudió el efecto de la velocidad de barrido midiendo los VCs de 10 a 450 mVs^{-1} como se muestra en la Figura 38.

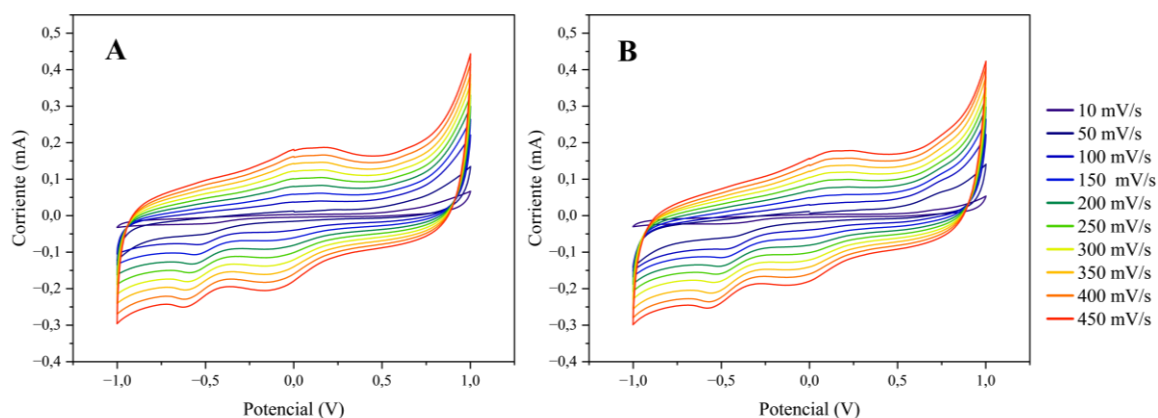
Al comparar los valores de corriente y voltaje de los VCs a diferentes velocidades de barrido para el SPGE/CYPOD-RB (Tabla 10) se evidencia que al aumentar la velocidad de barrido aumenta la separación de picos y disminuye la relación de corrientes. La relación I_{pc}/I_{pa} disminuye con el aumento de la velocidad de barrido porque el grosor de la capa de difusión cerca al electrodo se vuelve más pequeña, reduciendo el efecto de la velocidad del transporte de masa en las señales de corriente.

En la Tabla 11 se presentan las características de los VCs a diferentes velocidades de barrido para el SPGE/CYPOD-UF. En este sistema también se observa una disminución de la relación de corriente a medida que aumenta la velocidad de barrido, por otro lado, la separación de picos inicialmente en 806 mV a 10 mVs^{-1} en principio se reduce hasta alcanzar

un mínimo en 200 mVs^{-1} con 732 mV en el que se podría decir que se alcanza la mayor reversibilidad. A mayores velocidades la tendencia de la ΔE_p es aumentar, desviándose más del comportamiento reversible. Como para un proceso reversible ΔE_p se mantiene constante al variar la velocidad de barrido, y en ambos sistemas SPGE/CYPOD ΔE_p varía se infiere que son sistemas quasi-reversibles.

Figura 39

Voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido en solución 3 mM de H_2O_2 $0,1 \text{ M}$ KCl de (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF



La relación entre los picos catódico y anódico, y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido también brinda información importante de un sistema electroquímica. La ecuación de Randles-Sevick predice una dependencia lineal entre estas dos variables tanto para los sistemas reversibles como para los irreversibles.

Tabla 10

Valores de corriente y voltaje de los picos de los VCs a diferentes velocidades de barrido para el SPGE/CYPOD-RB

ν [mVs ⁻¹]	E _{pa} [mV]	E _{pc} [mV]	I _{pa} [μA]	I _{pc} [μA]	ΔE _p [mV]	I _{pc} /I _{pa}
10	107	-474	3,8	-21,1	581	5,624
50	242	-500	16,7	-50,3	742	3,019
100	137	-547	40,1	-79,4	684	1,979
150	149	-564	61,7	-106,8	713	1,730
200	156	-576	83,0	-132,6	732	1,597
250	156	-593	104,6	-156,4	750	1,496
300	156	-598	125,4	-180,7	754	1,441
350	159	-615	146,5	-203,7	774	1,390
400	168	-618	166,3	-228,8	786	1,376
450	171	-623	187,2	-250,6	793	1,339

Tabla 11

Valores de corriente y voltaje de los picos de los VCs a diferentes velocidades de barrido para el SPGE/CYPOD-UF

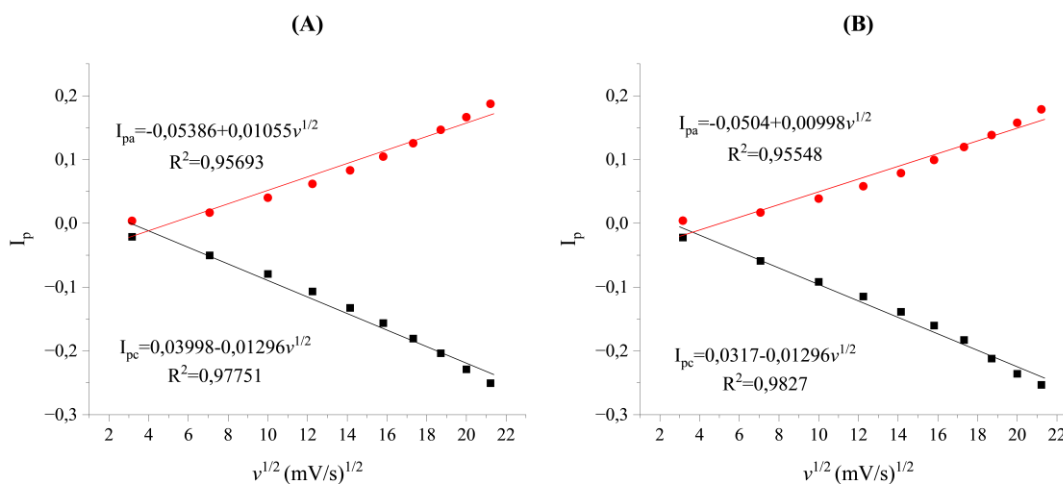
ν [mVs ⁻¹]	E _{pa} [mV]	E _{pc} [mV]	I _{pa} [μA]	I _{pc} [μA]	ΔE _p [mV]	I _{pc} /I _{pa}
10	315	-491	4,1	-22,1	806	5,406
50	315	-449	16,8	-59,0	764	3,510
100	315	-486	38,7	-91,7	801	2,367
150	225	-503	58,1	-114,8	728	1,976
200	215	-518	78,6	-138,6	732	1,764
250	222	-527	99,3	-160,3	750	1,615
300	220	-544	119,5	-182,8	764	1,530
350	222	-557	138,3	-212,0	779	1,533
400	234	-566	157,6	-235,8	801	1,497
450	237	-583	178,6	-253,2	820	1,418

Para el SPGE/CYPOD-RB, la linealización de la gráfica de I_{pc}/I_{pa} versus $\nu^{1/2}$ (Figura 40) tiene un R² de 0,95693 para los picos anódicos y 0,97751 para los catódicos; mientras

que el SPGE/CYPOD-UF presenta R^2 de 0,95448 y 0,9827 para los picos anódicos y catódicos respectivamente. Se observa que para ambos electrodos modificados no existe la tendencia lineal característica de procesos reversibles e irreversibles, permitiendo confirmar que la reducción del H_2O_2 mediada por la peroxidasa de limonaria sobre el SPGE es un proceso quasi-reversible.

Figura 40

Intensidad de corriente de los picos anódicos y catódicos en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en solución 3 mM de H_2O_2 0,1 M KCl de (A) SPGE/CYPOD-RB y (B) SPGE/CYPOD-UF



5. Conclusiones

Se logró extraer y semi-purificar la peroxidasa de las hojas de limonaria por medio de reparto bifásico y ultrafiltración obteniendo una actividad enzimática específica de 124,37 U/mg. Al estudiar la estabilidad en pH de la CYPOD se encontró que su pH es óptimo en el rango de 4,0 a 6,0 y mantiene hasta el 50% de su actividad hasta pH 7,0. En el estudio de termoestabilidad la peroxidasa mantuvo el 80% de su actividad de 40 a 60°C y se determinó que su constante de inactivación es de 0,00989 min⁻¹. Su masa molecular se determinó a través de electroforesis SDS-PAGE y fue de 30 kDa. Se analizaron los efectos de la concentración de sustratos y pH en la actividad enzimática de la CYPOD con diferentes sustratos y se determinó que el pH óptimo para guayacol, o-dianisidina y o-fenilendiamina es 4,0, mientras que para el ABTS fue de 3,0, por otro lado, la concentración de los sustratos reductores influyó más en la actividad enzimática que la de H₂O₂, además se observó un posible efecto protector de todos los sustratos en la inactivación de la POD por exceso de H₂O₂.

En el estudio de la respuesta electroquímica de la CYPOD frente al peróxido de hidrógeno en electrodos serigrafados de carbono modificados con óxido de grafeno (SPGE), por medio de voltamperometría cíclica, se encontró que la peroxidasa disminuye el sobrepotencial de la reducción del H₂O₂, presentándose en voltajes de 0,45 V vs Ag Ag/Cl para el extracto tras el reparto bifásico y 0,43 V vs Ag Ag/Cl para el extracto ultrafiltrado, por lo que en comparación el extracto más purificado y concentrado es más idóneo para la detección. También, el sistema SPGE/CYPOD mostró una respuesta lineal de la corriente frente a la concentración del peróxido en el intervalo evaluado de 0,5 a 4 mM. Finalmente,

la CYPOD favoreció la reversibilidad del proceso redox del $K_3[Fe(CN)_6]$ y se confirmó un proceso quasi-reversible en la reducción del H_2O_2 . En conclusión, la caracterización bioelectroquímica de la peroxidasa de las hojas de limonaria evidenció su potencial para aplicarse en biosensores para la detección de peróxido de hidrógeno y es un aporte para el estudio de peroxidasas provenientes de nuevas fuentes vegetales de plantas tropicales de la región.

6. Recomendaciones

- Complementar el proceso de semi-purificación para establecer un protocolo con el que obtenga un extracto con menos impurezas.
- A partir del estudio preliminar de la especificidad sustrática, determinar las constantes cinéticas V_{\max} , K_m y K_{cat} de la enzima purificada con guayacol, o-dianisidina, o-fenilendiamina, ABTS y H_2O_2 .
- Analizar la respuesta del electrodo frente a la reducción del H_2O_2 por medio de cronoamperometría, ya que esta técnica permite realizar una cuantificación más confiable con relación a las señales de corriente, y en presencia de interferencias, para evaluar el desempeño que el electrodo podría tener en muestras reales.

Referencias

- Ahmad, M. S., Shah, N., Akbar, Z., Khan, T., & Ali, A. (2024). Simple two-step purification and characterisation of peroxidase from *Citrullus colocynthis*. *Natural Product Research*, 38(19), 3374–3383. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2248644>
- Ali, H. K., & Shaker, K. A. (2023). Extraction, Purification and Characterization of Peroxidase from Okra (*Abelmoschus esculentus*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1158(9), 092009. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1158/9/092009>
- Alneyadi, A. H., Rauf, M. A., & Ashraf, S. S. (2018). Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water—a critical review. En *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 38, Número 7). <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1423275>
- Altay, A., Koktepe, T., Durmaz, L., Topal, F., Gülçin, İ., & Köksal, E. (2018). Purification and selected biochemical properties of peroxidase from cress (*Lepidium sativum* sub sp. *sativum*). *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2610–2621. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1540989>
- Arnao, M. B., Acosta, M., del Rio, J. A., & García-Cánovas, F. (1990). Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1038(1), 85–89. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(90\)90014-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(90)90014-7)
- Aymard, C., & Belarbi, A. (2000). Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity,

- irrespectively of the mechanism. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 612–618.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00258-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00258-1)
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, 53(2), 253–263. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01677-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01677-5)
- Banga, J. P. (1998). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-Page). En *Encyclopedia of Immunology* (pp. 2143–2144). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0541>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2000). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2a ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Basumatary, D., Yadav, H. S., & Yadav, M. (2023). Potential applications of peroxidase from *Luffa acutangula* in biotransformation. *Chemical Papers*, 77(6), 3181–3200.
<https://doi.org/10.1007/s11696-023-02696-5>
- Bhapkar, S., Choudhari, U., Jadhav, U., & Jagtap, S. (2023). Evaluation of soybean peroxidase - Copper phosphate mediated organic-inorganic hybrid for hydrogen peroxide biosensor application. *Sensors International*, 4, 100242.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100242>
- Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Bastida, J., & Máximo, M. F. (2006). Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemosphere*, 63(4), 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.007>
- Bonner, P., & Bonner, P. L. R. (2007). *Protein Purification*. Taylor & Francis.
<https://doi.org/10.4324/9780203967263>

- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). *One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE)* (pp. 151–159). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Burgess, R. R. (2009). *Chapter 4 Preparing a Purification Summary Table* (pp. 29–34). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63004-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63004-4)
- Caglar, B., İçer, F., Özdokur, K. V., Caglar, S., Özdemir, A. O., Guner, E. K., Beşer, B. M., Altay, A., Çırak, Ç., Doğan, B., & Tabak, A. (2021). A novel amperometric H₂O₂ biosensor constructed by cross peroxidase entrapped on BiFeO₃ nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, *262*, 124287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124287>
- Centeno, D. A., Solano, X. H., & Castillo, J. J. (2017). A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry*, *116*, 33–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.03.005>
- Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. (2000). Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: Effect of temperature and pH. *Biochemistry*, *39*(1), 263–270. <https://doi.org/10.1021/bi990729o>
- Ciogli, L., Zumpano, R., Poloznikov, A. A., Hushpulian, D. M., Tishkov, V. I., Andreu, R., Gorton, L., Mazzei, F., Favero, G., & Bollella, P. (2021). Highly Sensitive Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Tobacco Peroxidase Immobilized on p-Phenylenediamine Diazonium Cation Grafted Carbon Nanotubes: Preventing Fenton-like Inactivation at

- Negative Potential. *ChemElectroChem*, 8(13), 2495–2504.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/celc.202100341>
- Clark Jr, L. C., & Sachs, G. (1968). BIOELECTRODES FOR TISSUE METABOLISM*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 148(1), 133–153.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb20346.x>
- Compton, R. G., Laborda, E., & Ward, K. R. (2014). *Understanding Voltammetry*. IMPERIAL COLLEGE PRESS. <https://doi.org/10.1142/p910>
- Cuadrado, N. H., Zhadan, G. G., Roig, M. G., & Shnyrov, V. L. (2011). Suicide inactivation of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(5), 1078–1082.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.09.001>
- Dahdouh, A., Boucherba, N., Bouacem, K., Mechri, S., Amirouche, A., Aksas, A., Jaouadi, B., & Kati, D. E. (2022). A new peroxidase from the roots of the Algerian white turnip (*Brassica rapa*, variety *rapa*): extraction, purification, characterisation, and antioxidant potential. *Biocatalysis and Biotransformation*, 40(6), 432–449.
<https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1953485>
- Dave, B., & Sanghvi, G. (2022). Enzyme Action for Dye Degradation. En S. S. Muthu & A. Khadir (Eds.), *Dye Biodegradation, Mechanisms and Techniques: Recent Advances* (pp. 141–163). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5932-4_6
- Deepa, S. S., & Arumughan, C. (2002). Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. *Phytochemistry*, 61(5), 503–511. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00167-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00167-X)

- Drozd, M., Pietrzak, M., Parzuchowski, P. G., & Malinowska, E. (2016). Pitfalls and capabilities of various hydrogen donors in evaluation of peroxidase-like activity of gold nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(29), 8505–8513. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9976-z>
- Du, M., Hou, Z., Liu, L., Xuan, Y., Chen, X., Fan, L., Li, Z., & Xu, B. (2022). Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1028691>
- El Ichi, S., Miodek, A., Sauriat-Dorizon, H., Mahy, J.-P., Henry, C., Marzouki, M. N., & Korri-Youssoufi, H. (2011). Characterization of structure and activity of garlic peroxidase (POX1B). *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(1), 157–172. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0714-2>
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- El-Khonezy, M. I., Abd-Elaziz, A. M., Dondeti, M. F., Fahmy, A. S., & Mohamed, S. A. (2020). Purification and characterization of cationic peroxidase from ginger (*Zingiber officinale*). *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0264-x>
- Elmetwalli, A., Allam, N. G., Hassan, M. G., Albalawi, A. N., Shalaby, A., El-Said, K. S., & Salama, A. F. (2023). Evaluation of *Bacillus aryabhatai* B8W22 peroxidase for phenol removal in waste water effluents. *BMC Microbiology*, 23(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02850-9>

ExplorEnz - the Enzyme Database. (2024). ExplorEnz - the Enzyme Database.

https://www.enzyme-database.org/class.php?c=1&sc=*&ssc=0

Freitas, C. D. T., Costa, J. H., Germano, T. A., de O. Rocha, R., Ramos, M. V., & Bezerra, L.

P. (2024). Class III plant peroxidases: From classification to physiological functions.

International Journal of Biological Macromolecules, 263, 130306.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130306>

Fritzke, W., Salla, E. G., Bagatini, M. D., da Silva Rosa Bonadiman, B., Skoronski, E.,

Moroni, L. S., & Kempka, A. P. (2020). Peroxidase of *Cedrela fissilis* leaves:

Biochemical characterization and toxicity of enzymatically decolorized solution of textile

dye Brilliant Sky-Blue G. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101553.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101553>

Galende, P. P., Cuadrado, N. H., Kostetsky, E. Y., Roig, M. G., Kennedy, J. F., & Shnyrov, V.

L. (2015). Mechanism-based suicide inactivation of white Spanish broom (*Cytisus*

multiflorus) peroxidase by excess hydrogen peroxide. *International Journal of*

Biological Macromolecules, 81, 975–979.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.033>

Gamenara, D., Seoane, G. A., Saenz-Méndez, P., & de María, P. D. (2012). *Redox*

Biocatalysis. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118409343>

GBIF Secretariat. (2023). <https://doi.org/10.15468/39omei>

Ghindilis, A. L., Atanasov, P., & Wilkins, E. (1997). Enzyme-catalyzed direct electron

transfer: Fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis*, 9(9), 661–674.

<https://doi.org/10.1002/elan.1140090902>

- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>
- Hamid, M., & Khalil-ur-Rehman. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.035>
- Hiner, A., Rodríguez-López, J., Arnao, M., Raven, E., Canovas, G., & Acosta, M. (2000). Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *The Biochemical journal*, 348 Pt 2, 321–328. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480321>
- Ilesanmi, O. S., & Adedugbe, O. F. (2023). Novel peroxidase from bitter leaf (*Vernonia amygdalina*): Purification, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 49, 102662. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102662>
- Ivanec-Goranina, R. (2024). Kinetic Study of *Coprinus cinereus* Peroxidase-Catalyzed Oxidation of 2,2'-Dihydroxyazobenzene. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2). <https://doi.org/10.3390/ijms25020828>
- Krainer, F. W., & Glieder, A. (2015). An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 99, Número 4, pp. 1611–1625). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Langsdorf, A., Volkmar, M., Ulber, R., Hollmann, F., & Holtmann, D. (2023). Peroxidases from grass clippings for the removal of phenolic compounds from wastewater. *Bioresource Technology Reports*, 22, 101471. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101471>
- Lavery, C. B., MacInnis, M. C., MacDonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., Irwin, D. J. G., & D’Cunha, G. B. (2010). Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8471–8476. <https://doi.org/10.1021/jf100786h>
- Lawal, O. A., Ogundajo, A. L., Avoseh, N. O., & Ogunwande, I. A. (2017). *Cymbopogon citratus*. En *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 397–423). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00018-2>
- Lechuga, L. M. (2023). Biosensor. En M. Gargaud, W. M. Irvine, R. Amils, P. Claeys, H. J. Cleaves, M. Gerin, D. Rouan, T. Spohn, S. Tirard, & M. Viso (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 402–406). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-65093-6_190
- Longoria, A., Tinoco, R., & Torres, E. (2010). Enzyme Technology of Peroxidases: Immobilization, Chemical and Genetic Modification. En E. Torres & M. Ayala (Eds.), *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts* (pp. 209–243). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12627-7_9
- Lorsch, J. R. (2014). *Practical Steady-State Enzyme Kinetics* (pp. 3–15). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00001-5>

- Malomo, S., Adeoye, R., Babatunde, L., Ibraheem, S., Iniaghe, O., & Olorunniyi, F. (2011). Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess hydrogen peroxide: The effects of reaction pH, buffer ion concentration, and redox mediation. *Biokemistri*, *23*.
- Motoyama, T., Yamamoto, Y., Ishida, C., Hasebe, F., Kawamura, Y., Shigeta, Y., Ito, S., & Nakano, S. (2022). Reaction Mechanism of Ancestral l-Lys α -Oxidase from Caulobacter Species Studied by Biochemical, Structural, and Computational Analysis. *ACS Omega*, *7*(48), 44407–44419. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06334>
- Nadar, S. S., Pawar, R. G., & Rathod, V. K. (2017). Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *101*, 931–957. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger principios de bioquímica*. (5a ed.). Ediciones Omega.
- Octobre, G., Delprat, N., Doumèche, B., & Leca-Bouvier, B. (2024). Herbicide detection: A review of enzyme- and cell-based biosensors. *Environmental Research*, *249*, 118330. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118330>
- Pérez Galende, P., Hidalgo Cuadrado, N., Kostetsky, E. Ya., Roig, M. G., Villar, E., Shnyrov, V. L., & Kennedy, J. F. (2015). Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a Ping-Pong Bi–Bi mechanism with competitive inhibition by substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 1005–1011. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.042>
- Poulos, T. L. (2014). Heme Enzyme Structure and Function. *Chemical Reviews*, *114*(7), 3919–3962. <https://doi.org/10.1021/cr400415k>

- Poulos, T. L., Stephan Freer, S. T., Alden, R. A., Edwards, S. L., Skogland, U., Takio, K., Eriksson, B., Xuong, N., Yonetani, T., & Kraut, J. (1980). *The Crystal Structure of Cytochrome c Peroxidase** (Vol. 2).
- Punekar, N. S. (2018). Enzyme Kinetic Data: Collection and Analysis. En *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (pp. 193–211). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_17
- Rafaqat, S., Perveen, B., Raqba, Imran, W., Hussain, A., & Ali, N. (2024). Development of manganese peroxidase based voltammetric biosensor for detection of textile Azo dyes RR 195 & RB 221. *Materials Chemistry and Physics*, 312, 128647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.128647>
- RedOxiBase*. (2024).
- Regalado, C., García-Almendárez, B. E., & Duarte-Vázquez, M. A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. En *Phytochemistry Reviews* (Vol. 3).
- Rodionov, P. V, Alieva, E. A., Sergeeva, E. A., Veselova, I. A., & Shekhovtsova, T. N. (2016). Determination of hydrogen peroxide and organic peroxides in micellar and aqueous–organic media using a spectrophotometric biosensor based on horseradish peroxidase. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(9), 932–943. <https://doi.org/10.1134/S1061934816090148>
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/B714449K>

- Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L., & Marko-Varga, G. (1996). Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta*, *330*(2), 123–138. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670\(96\)00169-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670(96)00169-9)
- Sáez-Jiménez, V., Fernández-Fueyo, E., Medrano, F. J., Romero, A., Martínez, A. T., & Ruiz-Dueñas, F. J. (2015). Improving the pH-stability of Versatile Peroxidase by Comparative Structural Analysis with a Naturally-Stable Manganese Peroxidase. *PLOS ONE*, *10*(10), e0140984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140984>
- Saikia, S., Gogoi, R. D., Yadav, M., & Yadav, H. S. (2022). Isolation, purification and characterization of peroxidase from *Raphanus sativus* and its applications in biotransformation of cresols. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *46*, 102540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102540>
- Sakharov, I. Y., Bautista Ardila, G., & Sakharova, I. V. (1999). *Peroxidasa de plantas tropicales*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/31026>
- Saud Al-Bagmi, M., Shahnawaz Khan, M., Alhasan Ismael, M., Al-Senaidy, A. M., Ben Bacha, A., Mabood Husain, F., & Alamery, S. F. (2019). An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(2), 301–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.002>
- Sellami, K., Couvert, A., Nasrallah, N., Maachi, R., Abouseoud, M., & Amrane, A. (2022). Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological

- applications: A review. En *Science of the Total Environment* (Vol. 806). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150500>
- Singh, A. K., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Raj, A. (2021). Lignin peroxidase in focus for catalytic elimination of contaminants — A critical review on recent progress and perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 58–82.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.032>
- Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D. S., Datta, S., Prasad, R., & Singh, J. (2020). Biological Biosensors for Monitoring and Diagnosis. En J. Singh, A. Vyas, S. Wang, & R. Prasad (Eds.), *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications* (pp. 317–335). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2817-0_14
- Song, X., Liu, J., & Wang, B. (2022). Emergence of Function from Nonheme Diiron Oxygenases: A Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study of Oxygen Activation and Organophosphonate Catabolism Mechanisms by PhnZ. *ACS Catalysis*, 12(3), 2009–2022. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c05116>
- Songa, E. A., Arotiba, O. A., Owino, J. H. O., Jahed, N., Baker, P. G. L., & Iwuoha, E. I. (2009). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry*, 75(2), 117–123.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.02.007>
- Stryer, L., Berg, J. B., & Tymoczko, J. L. (2012). *Bioquímica con aplicaciones clínicas: Vol. I* (7a ed.). Editorial Reverté, S.A.

- Sukma, R. M., Iswantini, D., Nurhidayat, N., Rafi, M., & Ariyanti, D. (2023). Antioxidant Determining Using Electrochemical Method. *Chemistry*, 5(3), 1921–1941. <https://doi.org/10.3390/chemistry5030131>
- Tamborelli, A., López Mujica, M., Sánchez-Velasco, O. A., Hormazábal-Campos, C., Pérez, E. G., Gutierrez-Cutiño, M., Venegas-Yazigi, D., Dalmasso, P., Rivas, G., & Hermosilla-Ibáñez, P. (2024). A new strategy to build electrochemical enzymatic biosensors using a nanohybrid material based on carbon nanotubes and a rationally designed schiff base containing boronic acid. *Talanta*, 270, 125520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125520>
- Thermo Scientific. (2024). *Pierce™ BCA Protein Assay Kit User Guide*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- Uribe, P. A., Ortiz, C. C., Centeno, D. A., Castillo, J. J., Blanco, S. I., & Gutierrez, J. A. (2019). Self-assembled Pt screen printed electrodes with a novel peroxidase Panicum maximum and zinc oxide nanoparticles for H₂O₂ detection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 561, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.10.051>
- Villamizar, E. N., Ríos, C. A., & Castillo, J. 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. *En Chem. Soc* (Vol. 60, Número 3).

- Vishwasrao, C., Chakraborty, S., & Ananthanarayan, L. (2017). Partial purification, characterisation and thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase isolated from *Kalipatti sapota* (*Manilkara zapota*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(11), 3568–3575. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8215>
- Wang, T., Tian, J., Li, T., & Li, J. (2016, marzo). Enzyme properties and thermal stability of horseradish peroxidase (HRP-DL). *Proceedings of the 2016 International Conference on Engineering and Technology Innovations*. <https://doi.org/10.2991/iceti-16.2016.40>
- Wanjari, V. P., Reddy, A. S., Duttgupta, S. P., & Singh, S. P. (2023). Laser-induced graphene-based electrochemical biosensors for environmental applications: a perspective. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(15), 42643–42657. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21035-x>
- Watanabe, L., de Moura, P. R., Bleicher, L., Nascimento, A. S., Zamorano, L. S., Calvete, J. J., Sanz, L., Pérez, A., Bursakov, S., Roig, M. G., Shnyrov, V. L., & Polikarpov, I. (2010). Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of Structural Biology*, *169*(2), 226–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.10.009>
- Yamada, H., Yoshii, K., Asahi, M., Chiku, M., & Kitazumi, Y. (2022). Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals. *Electrochemistry*, *90*(10), 22–66082. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>
- Yang, S., Gao, Q.-L., Hu, L.-W., Chen, L., Liu, Y.-P., & Chen, H.-P. (2023). Obtaining peroxidase from *Zanthoxylum armatum* DC. fruit and application in detoxification of

phenol wastewater. *Industrial Crops and Products*, 193, 116265.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116265>

Yoo, S., Kim, S., Jeon, S., & Han, M. S. (2022). Aldehyde N,N-dimethylhydrazone-based fluorescent substrate for peroxidase-mediated assays. *RSC Advances*, 12(14), 8668–8673. <https://doi.org/10.1039/D2RA00087C>

Zhao, L. N., & Kaldis, P. (2022). The catalytic mechanism of the mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase (MTHFD2). *PLOS Computational Biology*, 18(5), e1010140-. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010140>

Zhu, H., Li, X., Zhai, W., Liu, Y., Gao, Q., Liu, J., Ren, L., Chen, H., & Zhu, Y. (2017). Effects of low light on photosynthetic properties, antioxidant enzyme activity, and anthocyanin accumulation in purple pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* Makino). *PLOS ONE*, 12(6), e0179305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179305>

Zhu, Y.-C., Mei, L.-P., Ruan, Y.-F., Zhang, N., Zhao, W.-W., Xu, J.-J., & Chen, H.-Y. (2019). Chapter 8 - Enzyme-Based Biosensors and Their Applications. En R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, & C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 201–223). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00008-X>