

Electrodos serigrafiados de nanopartículas de oro modificados con peroxidasa de planta dormidera (*mimosa pudica*) para la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno

Juan José Blanco Prada

Trabajo de Grado para optar al título de Químico

Director

John Jairo Castillo León

Químico, Doctor en Química

Codirector

Hermín Sul De Jesús Cano Calle

Químico, Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

Las palabras a veces se quedan cortas a la hora de agradecerle a todas las personas que hicieron parte de mi proceso profesional, pero por algo se ha de empezar.

Quiero agradecerle a mi familia inmediata mi papá José Francisco Blanco Arévalo mis hermanas Diana Milena y María Fernanda y una mención especial a mi mamá Elena Prada quien durante toda su vida me apoyó de diversas maneras y a pesar de que su ciclo vital se acabó antes de poder verme como un profesional, se que su sentimiento vivirá para siempre conmigo y la llevare en alto en todos mis futuros proyectos.

A mi pareja Daniela Sanmiguel Villacreses por acompañarme en los malos momentos, por estar conmigo cuando era momento de recoger las plantas y ser un motor de apoyo para culminar este proyecto, por ser la persona que llena de alegría mis días y la luz de mi vida.

A mis amigos mas cercanos de la carrera, Sebastián Quintero, Sofia Guzmán, Miguel Ángel Vega, Angie Rodríguez, Nicole Ortiz, Laura Guzmán, Santiago Ortiz, Catalina Melo y Camilo Cáceres. Quienes nos mantuvimos firmes ante la inmensa cantidad de estrés que nos generó estudiar, y con quienes siempre contaba para cuando teníamos que desestresarnos y tomarnos unas cervecitas donde Don Víctor, quienes serán unos grandes profesionales y representantes de la carrera.

A mis amigos de Física con quienes empecé la universidad, pero a mitad de camino los abandone para dirigirme a otros horizontes, Esteban Guerrero, Rafael Chona, Daniel, Jhan Lobo y Dennis con quienes siempre he podido contar y los considero personas muy especiales en mi vida.

Las personas con las que viví durante mi carrera, Josep, Romario, Mauricio, Cristian, Omar etc... Gracias por todos los momentos que compartimos mientras vivíamos y la gran amistad que me han brindado.

Mis amigos de toda la vida José Julian Mutis, Daniel Ríos, David Paredes, Diego Fiallo, Fidel Fiallo, Juan Fernando, Jesús Vargas, Pablo Carreño etc... Quisiera poder nombrarlos a todos, pero me gustaría más palabras en esto que en todo el proyecto en sí. Muchas gracias a ustedes por haber sido mi segunda familia y mi mayor apoyo durante toda mi vida, sé que nuestra amistad vas más allá que solo ser un grupo de amigos que se conocieron en el colegio o la universidad, si no va mas en unas personas que decidieron ser una familia que como toda tiene sus defectos, pero también hacen hasta lo imposible por salir adelante, a todos ustedes los llevo en mi corazón.

Al profesor John Castillo y el profesor Herminul gracias por toda la guía durante la carrera y el proyecto que me dieron, ayudarme a mejorar como profesional y a forjar un carácter ético y científico adecuado para los estándares de un profesional en Química.

Y sobre todo agradecer a la UIS por estos años de paciencia y enseñanza que me ha dado, por enseñarme que el mundo no es solo el pequeño pueblo del que venía, si no hay un sinfín de oportunidades y conocimientos por adquirir.

Tabla de contenido

Introducción	13
1. Objetivos	16
1.1 Objetivo general.....	16
1.2 Objetivos específicos	16
2. Marco de Referencia	17
3. Marco teórico	21
3.1 Enzimas.....	21
3.1.1 Oxidorreductasas.....	22
3.2 Peroxidasas.....	24
3.2.1 Clasificación de las Peroxidasas	25
3.2.2 Ciclo catalítico	28
3.3 Propiedades moleculares de las peroxidasas.....	29
3.3.1 Efecto del pH sobre la actividad de las peroxidasas	29
3.3.2 Estabilidad en temperatura.....	30
3.4 Generalidad de la dormidera (<i>Mimosa pudica</i>).....	30
3.5 Biosensores	31
3.5.1 Biosensores Amperométricos.....	34
3.5.2 Biosensores Catalíticos	34
3.6 Electrodo serigrafados	35

3.7 Técnicas electroquímicas	37
3.7.1 Cronoamperometría	38
3.7.2 Voltamperometría cíclica	38
4. Metodología	40
4.1 Reactivos.....	40
4.2 Extracción y purificación parcial de pmp	40
4.2.1 Extracción	40
4.2.2 Centrifugación y eliminación de pigmentos	41
4.2.3 Concentración del extracto enzimático	42
4.2.4 Determinación de proteínas mediante un Kit de cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinonónico (BCA) Pierce™	42
4.2.5 Determinación de actividad enzimática	43
4.3 Caracterización bioquímica parcial de la pmp.....	43
4.3.1 Estabilidad de la PMP a diferentes pH.....	43
4.3.2 Estabilidad a diferentes temperaturas	44
4.4 Modificación de la superficie de los electrodos con el extracto enzimatico.....	45
4.5 Caracterización por metodos electroquimicos	45
4.5.1 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica mostrando respuesta enzimática del electro con peróxido de hidrógeno y PBS	46
4.5.2 Efecto de diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ sobre el electrodo modificado	47

4.5.3 Caracterización del electrodo por voltamperometría cíclica usando ferricianuro de potasio	48
4.5.4 Efecto de velocidad de barrido sobre la respuesta del peróxido de hidrógenos del electrodo modificado	48
4.5.5 Efecto de posibles interferencias en la detección de Peróxido de Hidrógeno en los electrodos modificados	49
5. Análisis y resultados	49
5.1 Extracción y semi-purificación de PMP	49
5.2 Caracterización bioquímica de PMP.....	55
5.2.1 Estabilidad a diferentes pH	55
5.2.2 Termoestabilidad.....	59
5.3 Modificación de electrodos con el extracto enzimático y caracterización electroquímica.....	63
5.3.1 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados	64
5.3.2 Reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno.....	69
5.3.3 Efecto de velocidad de barrido sobre el electrodo modificado con PMP y su respuesta bioelectrocatalítica hacia el H ₂ O ₂	78
6. Conclusiones.....	83
7. Recomendaciones	84
Referencias.....	85

Lista de Tablas

Tabla 1 Estudios previos con biosensores electroquímicos a diferentes condiciones..... 19

Tabla 2 Clasificación Enzimas nomenclatura EC 21

Tabla 3 Clasificación Oxidorreductasas..... 23

Tabla 4 Clasificación Biosensores 32

Tabla 5 Electrodo serigrafiado modificado superficialmente con distintas fuentes de peroxidasa
..... 37

Tabla 6 Resultados de actividad enzimática volumétrica en función del pH..... 51

Tabla 7 Datos de actividades en las diferentes etapas de purificación de PMP 54

Tabla 8 Rango óptimo de pH y temperatura para la actividad de peroxidasas de origen vegetal 57

Tabla 9 Valores corrientes y voltaje de los picos en el CVs con PBS pH 8.0..... 65

Tabla 10 Valores de corriente y voltaje de los CVs con (K₃[Fe (CN)₆]) 68

Tabla 11 Diferentes estudios sobre reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno 71

Tabla 12 Valores de corriente y voltajes de los picos del VC a diferentes velocidades de barrido
..... 81

Lista de Figuras

Figura 1 Estructura tridimensional superpuesta de varias peroxidasas 18

Figura 2 Estructura del grupo hemo 26

Figura 3 Representación de la superfamilia de las hemo-peroxidasas 27

Figura 4 Esquema del mecanismo de reacción de las peroxidasas 28

Figura 5 Fotografía dormidera (Mimosa Pudica) 31

Figura 6 Clasificación de los Biosensores 33

Figura 7 Esquema más común para un SPE 36

Figura 8 Diferencia entre las 2 normas para reportar datos CV 39

Figura 9 Electrodo serigrafado instalado en el equipo sin y con solución electrolítica respectivamente..... 46

Figura 10 Extractos de PMP a diferentes pH de solución buffer de fosfatos 50

Figura 11 Relación entre la actividad relativa y el pH durante el proceso de extracción de PMP 51

Figura 12 Etapas en la extracción y semi-purificación de la PMP 53

Figura 13 Actividad enzimática de la PMP a diferentes pH 57

Figura 14 Actividad relativa de la PMP a diferentes temperaturas 61

Figura 15 Actividad de la PMP a una temperatura constante en función del tiempo 62

Figura 16 Cinética de la inactivación termica de PMP..... 63

Figura 17 Modificación superficial del electrodo de SPGE con PMP 64

Figura 18 Voltamperogramas cíclicos..... 66

Figura 19 VC en solución 10 mM de (K₃[Fe(CN)₆]) en electrodos modificados con PMP 68

Figura 20 Voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno modificado con PMP en diferentes etapas de purificación 70

Figura 21 Mecanismo de reducción directa bioelectrocatalítica de H₂O₂ en electrodos funcionalizados con peroxidasa 72

Figura 22 Voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno 74

Figura 23 Ampliación de voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno 75

Figura 24 Curva de calibración para H₂O₂ a diferentes concentraciones 76

Figura 25 Respuesta voltamperométrica de electrodos modificados con PMP en presencia de H₂O₂ y otras especies interferentes 77

Figura 26 Voltamperograma cíclico a diferentes velocidades de barrido en solución 1mM de H₂O₂ 80

Figura 27 Intensidad de corrientes entre los picos anódicos y catódicos en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido..... 82

Glosario

Albúmina de suero bovino (BSA): proteína derivada del suero de vaca, comúnmente utilizada en laboratorios como agente bloqueante para evitar la unión no específica en ensayos bioquímicos.

Buffer de fosfatos (PBS): solución amortiguadora compuesta de fosfatos que mantiene un pH constante, ideal para conservar la estabilidad de células o biomoléculas durante experimentos.

Electrodo serigrafiado de nanopartículas de oro (SPGE): tipo de electrodo impreso sobre una superficie plana que ha sido modificado con nanopartículas de oro para mejorar la conductividad y sensibilidad en sensores electroquímicos.

Voltamperograma cíclico (VC): técnica electroquímica que aplica un voltaje variable a un electrodo y mide la corriente resultante para estudiar las propiedades redox de un compuesto, útil en la caracterización de biosensores.

Resumen

Título: Electroodos serigrafados de nanopartículas de oro modificados con peroxidasa de planta dormidera (*Mimosa pudica*) para la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno*

Autor: Juan José Blanco Prada**

Palabras clave: Biosensor, Electroquímica, Peroxidasa, H₂O₂, Voltamperometría cíclica.

Descripción: En este trabajo se extrajo la peroxidasa de las hojas de la dormidera (*Mimosa pudica*) y fue parcialmente purificada utilizando el método de reparto bifásico con PEG (12000) 14% y (NH₄)₂SO₄ al 10%, se utilizaron amicones de 10000 KDa para concentrar la enzima. Este proceso consiguió aumentar el valor de la actividad específica y volumétrica hasta 4.1588 (U/mL) y 9.357 (U/mg) con un factor de purificación 15. La peroxidasa de dormidera (PMP) se caracterizó bioquímicamente, midiendo su estabilidad frente a pH en lo cual conservo un 60% de su actividad a pH 6. De igual manera se midió la actividad a diferentes temperaturas conservando su actividad en un 85% a una temperatura de 50 °C. Finalmente, se midió la respuesta electroquímica del Electrodo serigrafado de nanopartículas de oro (SPGE) modificado superficialmente con PMP con el peróxido de hidrógeno, utilizando voltamperometría cíclica (VC), utilizando el extracto purificado de ultrafiltrado. Redujo el H₂O₂ a potenciales de puntos catódicos de -0.535 v y una relación I_{pc}/I_{pa} de 8.318 y presento un comportamiento quasi-reversibles. Teniendo en estos resultados, estabilidad en rangos de pH en medios ácidos y no una temperatura tan alta, pero teniendo muy buenos resultados en su reducción del H₂O₂ al modificar los electrodos demostrando un alto potencial para aplicaciones en biosensores donde no sea un factor importante las altas temperaturas o el trabajo en medios básicos.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: John Jairo Castillo León, Doctor en Química. Codirector: Herminsul De Jesús Cano Calle, Doctor en Química.

Abstract

Title: Screen-printed electrodes with gold nanoparticles modified with peroxidase from the sleepy plant (*mimosa pudica*) for the electrochemical detection of hydrogen peroxide*

Author: Juan José Blanco Prada**

Key Words: Biosensor, Electrochemistry, Peroxidase, H₂O₂, Cyclic voltammetry.

Description: In this study, peroxidase was extracted from the leaves of *Mimosa pudica* (also known as “Sleepy”) and partially purified using the two-phase partitioning method (separatory funnel) with Polyethylene glycol (PEG) (12000) at 14% and ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ at 10%. Amikons filters of 10,000 KDa were used to concentrate the enzyme. This process increased the specific and volumetric activity values to 4.1588 (U/mL) and 9.357 (U/mg), respectively, with a purification factor of 15. The Sleepy peroxidase (PMP) was biochemically characterized, measuring its stability against pH, where it retained 60% of its activity at pH 6. Similarly, activity was measured at different temperatures, maintaining 85% of its activity at 50 °C.

Finally, the electrochemical response of the Screen-Printed Gold Electrode (SPGE) surface-modified with PMP was measured against hydrogen peroxide (H₂O₂) using cyclic voltammetry (CV) with the ultrafiltered purified extract. It reduced H₂O₂ at cathodic potentials of -0.535 V with an I_{pc}/I_{pa} ratio of 8.318, displaying quasi-reversible behavior. Based on these results, the enzyme demonstrated stability in acidic pH ranges and at moderate temperatures. However, it showed excellent performance in reducing H₂O₂ when modifying the electrodes, proving high potential for applications in biosensors where high temperatures or basic media are not critical factors.

* Bachelor Thesis

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: John Jairo Castillo León, *Doctor in Chemistry*. Codirector: Herminul De Jesús Cano Calle, *Doctor in Chemistry*.

Introducción

La detección precisa y sensible de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es crucial en diversas aplicaciones, influyendo el monitoreo ambiental y los diagnósticos médicos. En el ámbito ambiental, la cuantificación de H₂O₂ permite evaluar la eficiencia de los tratamientos de agua y gestionar la calidad de esta, mientras que en medicina es crucial comprender su fisiológico y patológico, como la señalización celular y estrés oxidativo (Gao et al., 2024; Meier et al., 2019). En la década de 1990 la tecnología de electrodos serigrafados comenzó a utilizarse ampliamente gracias a su bajo costo y dimensiones reducidas, en este contexto los electrodos serigrafados modificados han emergido como una herramienta prometedora gracias a su alta sensibilidad, selectividad. Estos biosensores, diseñados con materiales avanzados como nanopartículas de oro y enzimas específicas, ofreciendo tiempos de respuesta rápido y una especificidad para distintos compuestos (Gao et al., 2024; Grieshaber et al., 2008; Gutiérrez, 2015; Meier et al., 2019). Su desarrollo no solo mejora la precisión en la detección de H₂O₂, si no ha iniciado el desarrollo de dispositivos portátiles y desechables que se pueden utilizar en pruebas rápidas tanto de laboratorio como en campo (Song et al., 2006).

Las peroxidasas pertenecen a la familia de las oxidorreductasas, estas tienen una capacidad de emplear compuestos como el H₂O₂, peróxidos orgánicos o peroxiácidos para aceptar electrones. Estas enzimas facilitan la transferencia de hidrógeno, promoviendo la oxidación de una amplia gama de moléculas, tanto orgánicas como inorgánicas (Berg et al., 2010). Su uso es muy amplio en diferentes industrias y algunos ejemplos que muestran su utilidad son:

- En el sector de la biorremediación, la peroxidasa de las plantas ha sido efectivamente utilizadas para la degradación industrial de tintes y efluentes, contribuyendo a la desintoxicación del medio ambiente (Kalsoom et al., 2015).
- En biomedicina, las peroxidasas hacen parte integral para diagnósticos importantes, incluido los ensayos de inmunoabsorbente ligados a enzimas (ELISA), ya que estas facilitan la detección de biomoléculas específicas (Regalado et al., 2004).
- En la industria de la biotecnología, las peroxidasas se emplean en la síntesis de polímeros aromáticos mediante la polimerización oxidativa de fenoles y aminas aromáticas, lo que lleva a desarrollo de nuevos materiales (Regalado et al., 2004).

Todo lo anterior comprueba que las peroxidasas son enzimas altamente versátiles y útiles para aplicaciones claves en diversos campos científicos e industriales.

El rábano picante (*Armoracia rusticana*) es ampliamente reconocido como una de las principales fuentes de peroxidasa (HRP) debido a su elevada concentración en las raíces, lo que facilita su extracción a través de métodos mecánicos y químicos. Además, la HRP es una enzima extracelular que se encuentra en el apoplasto de las plantas, lo que simplifica el proceso de obtención al no requerir disrupción celular intensiva. Sin embargo, esta enzima presenta limitaciones en su estabilidad, ya que funciona de manera óptima en un rango de pH entre 5.0 y 9.0 y a temperaturas de hasta 30°C (Shannon et al., 1966; Tominaga, 2017). En condiciones más extremas, como temperaturas superiores a 70°C o pH menores a 3 y mayores a 9, puede perder su actividad biológica debido a la desnaturalización. Estas restricciones reducen su versatilidad en aplicaciones donde se requiere estabilidad en condiciones adversas, como en los biosensores. Esto limita su uso en aplicaciones que requieren estabilidad en entornos diversos, como los biosensores. Por ello, se están investigando alternativas en otras fuentes vegetales, como la dormidera (*Mimosa*

pubica.), que podrían ofrecer perfiles de estabilidad y especificidad de sustrato más adecuados para sensores electroquímicos.

Este trabajo de grado se enfocó en la semi-purificación de una nueva fuente vegetal de peroxidasa como lo es la de la dormidera, ya que no se han realizado estudios con esta variedad de la planta. En la primera etapa se extraerá y purificará la enzima en diferentes pH de buffer fosfato dipotásico y fosfato Mono potásico (PBS) para hallar el pH óptimo. En las siguientes fases se buscará su actividad enzimática correspondientes y se le realizaran pruebas de caracterización bioquímicas y electroquímica.

Y para el final, se evaluará su efectividad para reducir el H₂O₂ modificando superficialmente electrodos serigrafados de nanopartículas de oro (SPGE) con peroxidasa extraída de la planta dormidera para así medir la efectividad.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Modificar la superficie de electrodos serigrafiados de nanopartículas de oro mediante la inmovilización de peroxidasa extraída de la planta Mimosa pudica, con el fin de desarrollar un sistema electroquímico sensible y selectivo para la detección de peróxido de hidrógeno.

1.2 Objetivos específicos

- Obtener el extracto semi-purificado de la peroxidasa a partir de las hojas de la planta dormidera (Mimosa Pudica).
- Determinar la temperatura y pH óptimo de la peroxidasa extraída de dormidera.
- Caracterizar bioelectroquímicamente la peroxidasa inmovilizada sobre electrodos serigrafiados de nanopartículas de oro.
- Evaluar la eficiencia de los electrodos modificados frente a la presencia a diferentes concentraciones de H₂O₂.

2. Marco de Referencia

Hace 192 años en 1833 se descubrieron las enzimas cuando científicos empezaron a investigar los procesos biológicos encargados de la fermentación. Cuando Anselme Payen y Jean-François Persoz identificaron una sustancia en malta que convertía el almidón en azúcar, marcando así el primer descubrimiento de una enzima (Copeland, 2000). Tan solo 27 años después se descubrió la peroxidasa (POD) cuando científicos empezaron a estudiar enzimas relacionadas con procesos de oxidación en sistemas biológicos. Friedrich Schöbein, describió una actividad enzimática con peroxidasa durante su investigación sobre el Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) y sus reacciones (Urlacher, 2010).

Las peroxidasa de fuente vegetal son enzimas oxidativas que se encargan de catalizar la reducción de los peróxidos, como por ejemplo el H₂O₂, utilizando compuestos reductores como sustratos donantes de electrones. Es importante recalcar el grupo hemo como cofactor y están distribuidas en las plantas, siendo fundamentales en su metabolismo (Acosta et al., 2002) .

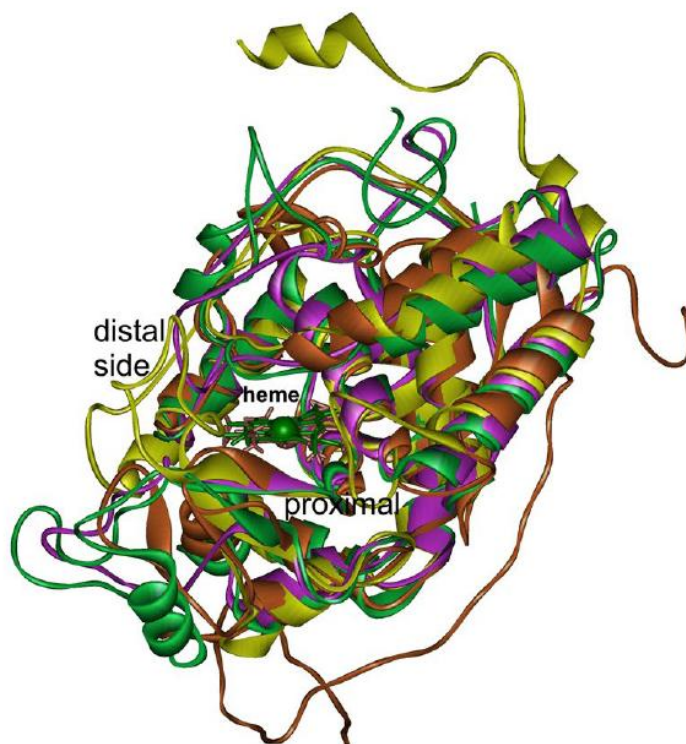
En las plantas estas participan en diversas funciones fisiológicas, resaltando la defensa contra el estrés oxidativo, la lignificación y respuesta a patógenos. A su vez están involucradas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, protegiendo las células vegetales de daños oxidativos, y desempeña un papel importante en la degradación de compuestos fenólicos y en la regulación del crecimiento celular mediante la modificación de las paredes celulares.

La Figura 1 muestra la estructura tridimensional superpuesta de varias peroxidasa que pertenecen a diferentes familias que hacen parte de la superfamilia de las peroxidasa-catalasa, destaca las similitudes como diferencias en sus dominios hemo. En el centro de la estructura se observa el grupo hemo, el cofactor activo responsable de la actividad catalítica de la enzima, la

cual se encuentra rodeado por hélices alfa. Con esto se puede resaltar la arquitectura estructural conservada entre estas peroxidasas, como los residuos críticos involucrados en su función catalítica (Acosta et al., 2002; Cuervo et al., 2009; Zámocký et al., 2017).

Figura 1

Estructura tridimensional superpuesta de varias peroxidasas



Nota. La figura muestra varias peroxidasas pertenecientes a diferentes familias (Familia II y Familia III) de la superfamilia peroxidasa-catalasa. Tomada de (Zámocký et al., 2017).

A lo largo de los años, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la POD y sus diversos usos en biosensores electroquímicos. Estos estudios han generado una gran cantidad de artículos que reportan resultados relevantes para la investigación y desarrollo de biosensores,

utilizando una variedad de materiales y métodos de producción. A continuación, se presenta en la tabla 1 se presentan algunos de estos estudios.

Tabla 1

Estudios previos con biosensores electroquímicos a diferentes condiciones

POD Utilizada	Analito	Tipo de Electrodo	Límite de detección (μM)	de	Sensibilidad (μA/ μM)	Referencia
HRP	H ₂ O ₂	Nano hojas de fosforeno negro y nanotubos de carbono de pared simple	330		No especifica	(De Sequeira et al., 2022)
HRP	H ₂ O ₂	Oro modificado con óxido de grafeno reducido	0.17		10	(Shin et al., 2020)
HRP	H ₂ O ₂	Nanotubos de polianilina	0.01		1.976 x 10 ⁻⁶	(Q. Wang et al., 2018)
HRP	Ácido cafeico	Carbono impreso modificado con azul de Prusia	0.9		0.72	(Trifan & Apetrei, 2023)

Nano	Dopamina y	De	pantalla	0.028	Alta	sensibilidad	(Thamilselvan
enzimas	Epinefrina	impresos	(Dopamina)	(No especifica)			et al., 2023)
con		modificados con	0.044				
actividad		Ce-MoS ₂	(Epinefrina)				
POD							
POD	de	Compuestos	Semiconductores	0.01	Varia	por	el (Cheraghi et
hemo	fenólicos				compuesto		al., 2022)
Glutación	Glutación	Carbono	vítreo	0.0015	No especifica		(Neumann &
peroxidasa		modificados con					Wollenberger,
(GSH-Px)		óxido de grafeno					2020)
		y nafion					

La tabla refleja una amplia variedad de aplicaciones para la detección de distintos analitos, que abarcan desde componentes orgánicos hasta pesticidas. Los progresos en la tecnología de biosensores, impulsados por innovaciones en materiales de electrodos y métodos de transducción, han resultado en la creación de dispositivos cada vez más avanzados y precisos. La habilidad de estos dispositivos para generar datos rápidos y exactos los posiciona como herramientas esenciales en diversas áreas de investigación y aplicaciones prácticas.

3. Marco teórico

3.1 Enzimas

Una enzima es una proteína altamente especializada que cumple el papel de catalizador biológico en reacciones químicas específicas dentro de los seres vivos. Su función principal radica en acelerar la velocidad de estas reacciones, reduciendo así la energía de activación requerida para su ocurrencia. Esto posibilita que las reacciones químicas se desarrollen a ritmos que son cruciales para los procesos metabólicos y diversas funciones biológicas, asegurando la vitalidad celular. Las enzimas se clasifican según el tipo de reacción que catalizan, basándose en el sistema de nomenclatura de la comisión de enzimas (EC, por sus siglas en inglés) se presenta la tabla 2 donde se muestra este tipo de clasificación (Berg et al., 2010).

Tabla 2

Clasificación Enzimas nomenclatura EC

Clase de enzima	Número EC	Tipo de reacción catalizada	Ejemplo
Oxidorreductasas	EC 1	Reacciones redox	Peroxidasa
Transferasas	EC 2	Transferencia de grupos funcionales entre moléculas	Hexoquinasa
Hidrolasas	EC 3	Ruptura de enlaces químicos mediante adición de agua	Amilasa

Liasas	EC 4	Ruptura de enlaces químicos sin la intervención de agua u oxidación	Piruvato descarboxilasa
Isomerasas	EC 5	Reordenamiento de átomos dentro de una molécula (Isomerización)	Fosfoglucosa isomerasa
Ligasas	EC 6	Formación de enlaces químicos acoplada a la hidrólisis de ATP u otro nucleótido	ADN Ligasa

Nota. Adaptado de (Berg et al., 2010).

3.1.1 Oxidorreductasas

Son una clase de enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción, es decir, transferencias de electrones entre sustratos. Estas enzimas pueden oxidar un sustrato mientras que simultáneamente reducen otro sustrato. Las oxidorreductasas son de vital importancia en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo el metabolismo energético, la detoxificación de compuestos tóxicos y la síntesis de biomoléculas. La nomenclatura y clasificación de estas enzimas suele basarse como en el sustrato principal como en el tipo de coenzima que requiere para

funcionar en la tabla 3 se aprecia como se subdivide según el tipo de donador y aceptor de electrones involucrados (Berg et al., 2010; Nelson & Cox, 2004).

Tabla 3

Clasificación Oxidorreductasas.

Subclase	EC	Reacción	Ejemplo
		Catalizada	
Oxidasas	EC 1.1	Catalizan transferencias de electrones al oxígeno molecular (O ₂)	Alcohol oxidasa
Deshidrogenasas	EC 1.2	Catalizan transferencia de hidrógeno a aceptores	la Lactato deshidrogenasa
Reductasas	EC 1.3	Catalizan reacciones de reducción en sustratos específicos.	Glutación Reductasa

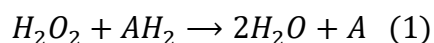
Peroxidasas	EC 1.11	Utilizan H ₂ O ₂ como aceptor de electrones	Peroxidasa de rábano picante
Oxygenassas	EC 1.13	Catalizan la incorporación de oxígeno molecular en el sustrato	Triptófano oxigenasa
Hidroxilasas	EC 1.14	Catalizan la adición de un grupo hidroxilo en una molécula	Fenilalanina hidroxilasa
Reductasas con nitrógeno o azufre	EC 1.7 y EC 1.8	Actúan sobre compuestos como nitrógeno o azufre como sustratos	Nitrato reductasa

Nota. Adaptado de (Berg et al., 2010; Nelson & Cox, 2004).

3.2 Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son enzimas que facilitan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, lo que ayuda a las células a protegerse contra el estrés oxidativo. Este tipo de estrés ocurre cuando se acumulan especies de reactivo de oxígeno que pueden dañar componentes celulares esenciales como proteínas, lípidos y ADN (Su et al., 2016). Estas enzimas

tienen la capacidad de descomponer el H₂O₂, el cual puede ser tóxico en concentraciones elevadas, por lo cual esta enzima interviene transformándolo en productos menos dañinos como H₂O y oxígeno molecular (O₂). Este proceso es fundamental para proteger las células contra el estrés oxidativo un proceso que puede dañar componentes celular importantes (Passardi et al., 2007). La ecuación general catalizada por una peroxidasa y dependiente del peróxido de hidrógeno es descrita por la ecuación:



3.2.1 Clasificación de las Peroxidasas

Las peroxidasas pueden tener diferentes tipos de cofactores redox en sus sitios activos. Sin embargo, las hemo-peroxidasas son las más representativas de este grupo de enzimas. Estas últimas poseen como grupo prostético un completo de hierro-hemo que se une a una histidina en posición proximal. Una excepción a esta regla sería las cloruro-hermoxidadas, en las cuales el hierro actual con un enlace a un residuo de cisteína en lugar de histidina. El grupo de las hemo-peroxidasas se clasifica en dos grandes superfamilias, estas agrupan las enzimas dependiendo de su origen, ya que pueden venir de animales, mientras la otra su origen es de origen vegetal que incluye hongos y bacterias (Passardi et al., 2007). Clasificándose así

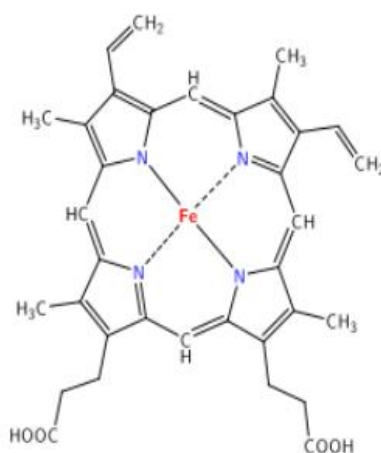
- **Clase I:** Esta clase está constituida por peroxidasas intracelulares que se encuentran en diferentes orgánulos subcelulares. Estas enzimas desempeñan un papel crucial para la eliminación de peróxidos generados dentro de las células de las plantas superiores, protegiéndolas de todo daño oxidativo (Everse et al., 1990).
- **Clase II:** Estas son secretadas por hongos y comprenden glicoproteínas monoméricas como la peroxidasa de lignina. Están directamente involucradas en la descomposición de la lignina (Everse et al., 1990).

- **Clase III:** Esta categoría está compuesta por las peroxidasas vegetales que son secretadas, como por ejemplo la peroxidasa del rábano picante. Son conocidas por sus funciones específicas en distintos tejidos vegetales y su implicación en procesos de defensa y desarrollo (Freitas et al., 2024).

El grupo hemo de las peroxidasas es una estructura clave que permite a estas enzimas cumplir su función catalítica. Este grupo prostético es una porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro tal como se observa en la Figura 2, el cual desempeña un papel fundamental en las reacciones de transferencia de electrones y de oxidación-reducción que catalizan las peroxidasas. El grupo hemo es esencial para la actividad catalítica de las peroxidasas. Su función principal es permitir la activación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para oxidar diversos sustratos (Henriksen et al., 2001).

Figura 2

Estructura del grupo hemo

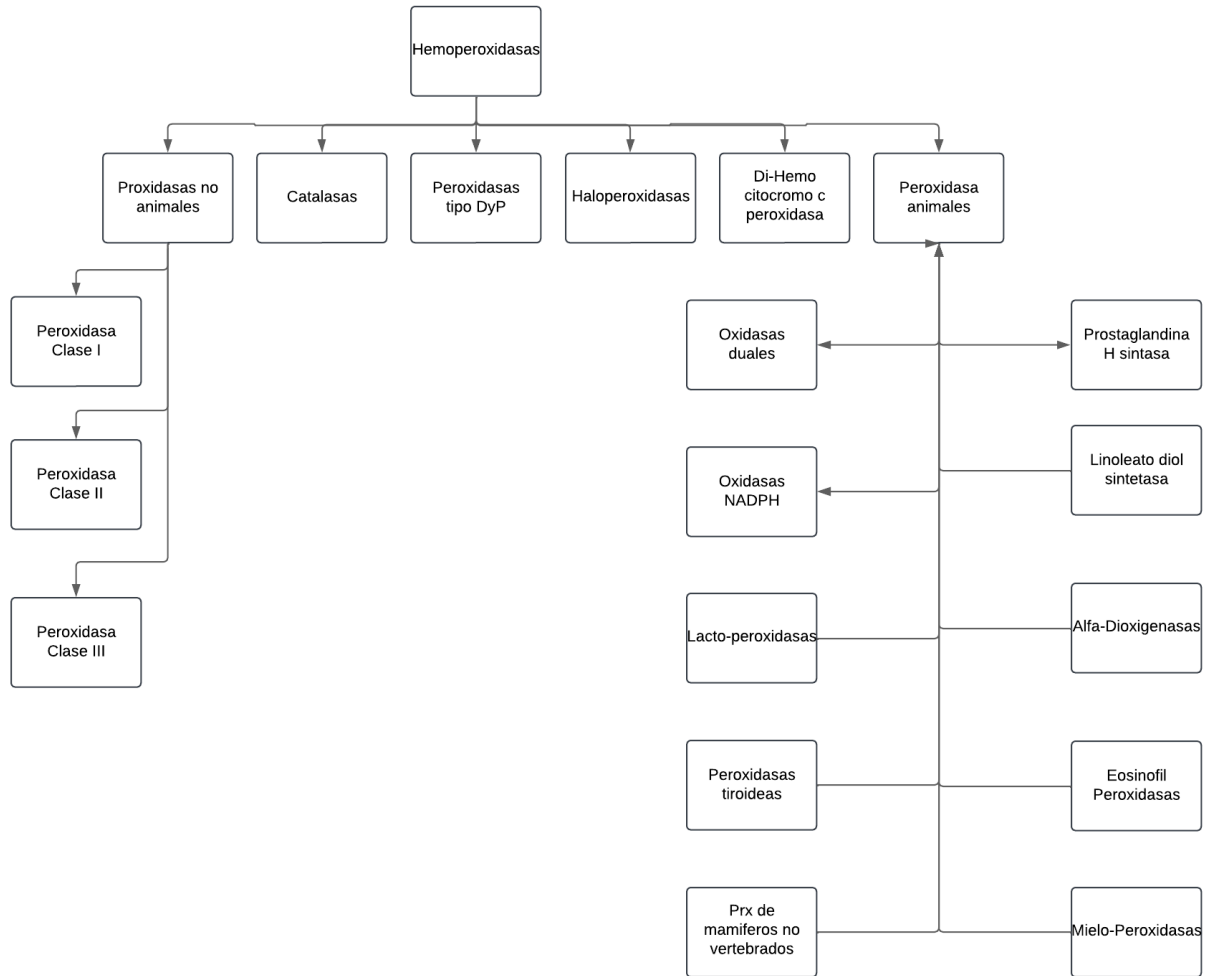


Nota. Tomado de (Henriksen et al., 2001).

El grupo hemo se puede clasificar de la siguiente forma:

Figura 3

Representación de la superfamilia de las hemo-peroxidasas

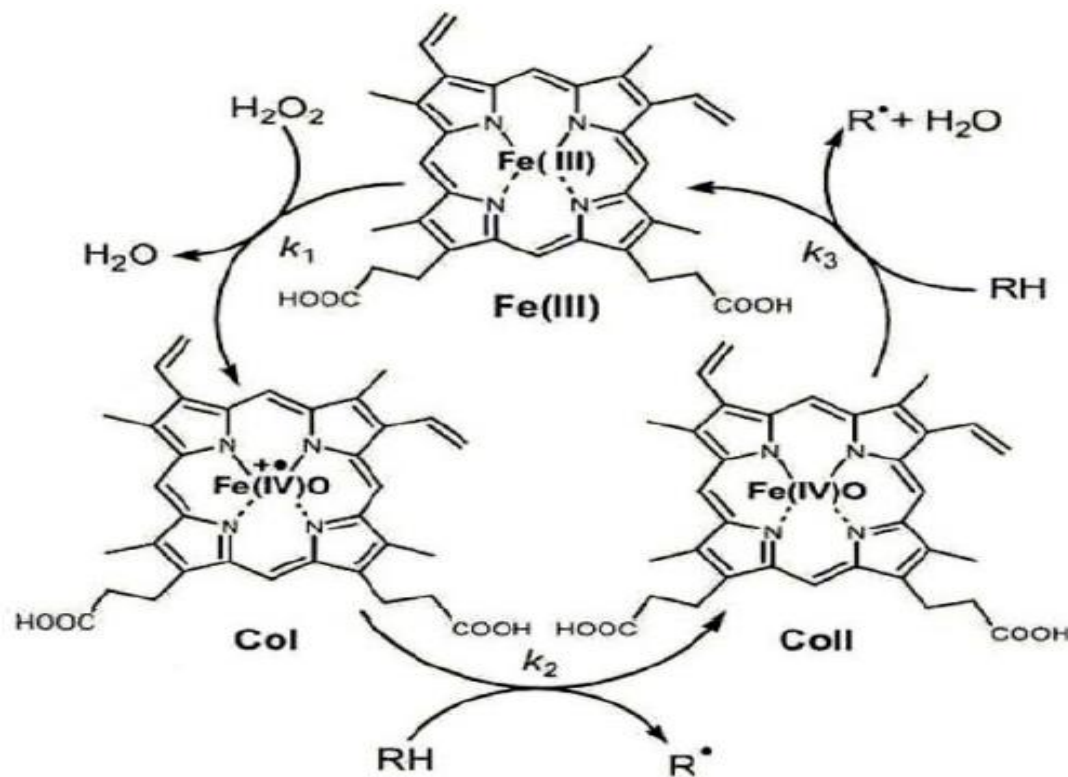


Nota. Adaptado de (Henriksen et al., 2001).

3.2.2 Ciclo catalítico

Figura 4

Esquema del mecanismo de reacción de las peroxididasas



Nota. Tomado de (Carretero, 2017).

La etapa inicial del proceso consiste en la incorporación de un sustrato adecuado [$R_{(H)}$] a través de los canales hidrofóbicos de la proteína. Estos canales están compuestos por residuos de aminoácidos apolares y conducen al sustrato hasta una posición lateralmente adyacente al grupo hemo. En esta ubicación, el sustrato experimenta un proceso de oxidación, generando un radical libre (R^\bullet). En este punto, el Compuesto I toma un electrón del sustrato, neutralizando el catión radical y transformándose en el Compuesto II. Este último conserva propiedades oxidantes, permitiendo la oxidación de una segunda molécula de sustrato, lo que a su vez regenera al

Compuesto I, completando así el ciclo de reacción (Carretero, 2017; Henriksen et al., 2001). El principal aspecto de este mecanismo es la catálisis ácido-base por la histidina distal, la estabilización de la carga producida por la arginina distal y la estabilización de los altos estados de oxidación del átomo de hierro también son parte importante de este (Henriksen et al., 2001).

3.3 Propiedades moleculares de las peroxidasas

La actividad biológica y funcional de una enzima se refiere a su capacidad para catalizar reacciones químicas, lo cual está intrínsecamente ligado a su estructura proteica. Esta estructura es sensible a factores ambientales como la temperatura, el pH y la concentración de sal del medio en el que se encuentra. Las peroxidasas, al ser enzimas, también son susceptibles a cambios en las condiciones del entorno. Por lo tanto, cada enzima posee condiciones óptimas bajo las cuales alcanza su máxima actividad catalítica (Timberlake, et al, 2008).

3.3.1 Efecto del pH sobre la actividad de las peroxidasas

Las peroxidasas, al ser proteínas, son sensibles a las variaciones de pH en el medio, esto llega a afectar su estabilidad estructural como su funcionalidad. Estos cambios de pH afectan la conformación tridimensional de la enzima, particularmente en el sitio activo, esto sucede porque se alteran estas interacciones no covalentes que mantienen su estructura, como los enlaces iónicos y de hidrógeno (Alneyadi et al., 2018). Cada peroxidasa tiene un rango de pH óptimo en el que alcanza su máxima actividad catalítica. Fuera de este rango, la eficiencia empieza a disminuir significativamente debido a los efectos ya mencionados. El pH óptimo varía según factores como el tipo de sustrato donador del hidrógeno y el buffer utilizado para el sistema, en un gran número de artículos se han reportado casos que oscilan entre 4 y 7.0, la capacidad de adaptación de la

enzima a diferentes condiciones de pH depende netamente de su estructura específica, pero cualquier cambio más allá del rango óptimo compromete su funcionalidad y se arriesga a reducir drásticamente su capacidad catalítica (Alneyadi et al., 2018; HALPIN et al., 1989; Saud Al-Bagmi et al., 2018).

3.3.2 Estabilidad en temperatura

La actividad de la peroxidasa está influenciada por la temperatura del entorno. A medida que la temperatura aumenta, la actividad enzimática también incrementa hasta alcanzar un punto óptimo. Sin embargo, temperaturas superiores a este óptimo suelen provocar desnaturalización de la enzima, resultando en una disminución o pérdida total de su actividad catalítica. Por ejemplo, en un estudio sobre la peroxidasa que se extrajo de la pitahaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), se concluyó que la actividad de la enzima se registró un rango entre 20 y 25 °C y por encima de estos valores se desnaturalizó (Alexander et al., 2006). Este comportamiento es consistente con el de otras peroxidases vegetales, donde la actividad aumenta hasta un punto óptimo, más allá del cual la actividad disminuye debido a la desnaturalización térmica (Alexander et al., 2006; Mendoza & Herrera, 2012).

3.4 Generalidad de la dormidera (*Mimosa pudica*)

La dormidera es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Fabaceae (leguminosas). También es conocida popularmente con varios nombres, como "sensitiva", "mimosa sensitiva" o "dormilona". Es conocida por su respuesta rápida al tacto o a otros estímulos, como la capacidad de plegar sus hojas cuando se las toca, un fenómeno llamado "seisimia". Esta planta es originaria de América tropical y se ha naturalizado en muchas regiones tropicales y

subtropicales de todo el mundo. Además de su capacidad para cerrar sus hojas, la dormidera también produce flores globosas rosadas o púrpuras y espinas en sus tallos (Mandal et al., 2022).

Figura 5

Fotografía dormidera (Mimosa Pudica)



A la fecha de este estudio no se han encontrado investigaciones similares sobre la extracción de peroxidasa en esta variedad en específicos, sin embargo, un previo estudio realizado en la universidad industrial de Santander de 1998 titulado “Peroxidasa de Plantas Tropicales” hizo practicas sobre una especie de mimosa conocida como *Mimosa Priga* cuyos resultados arrojaron un total 460 U/g por hoja de peroxidasa (Sakharov et al., 1999).

3.5 Biosensores

La división de fisicoquímica y química analítica de la IUPAC define un biosensor electroquímico como un dispositivo integrado autocontenido, capaz de proporcionar información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico conocido como receptor bioquímico que está en contacto espacial directo con un

elemento de transducción electroquímica (Thévenot et al., 2001). La creación de los biosensores está asociada con el nombre de Leland Clark quien sugirió la prueba de oxígeno en 1956 para medir la cantidad de oxígeno en la sangre y luego describió el electrodo enzimático que consistía en una sonda y dos membranas de diálisis que llevan a una pequeña porción de una solución acuosa de glucosa oxidasa entre ellas(Clark & Lyons, 1962).

Pero esto era solo el inicio ya que al popularizarse los biosensores e ir mejorando, con el tiempo el número de enzimas y anticuerpos utilizados como parte del ensamblaje de los biosensores aumento con rapidez, especialmente en combinación con transductores electroquímicos como electrodos de oxígeno o ISE sensibles al pH. La mayoría de las enzimas introducidas en las investigaciones durante el primer periodo de la historia de los biosensores estaban asociadas con protocolos particulares de ensayos bioquímicos ya utilizados en análisis clínicos (Evtugyn, 2014). Asi mismo ayudo a la creación de distinto tipos de biosensores los cuales se puede clasificar de la siguiente manera:

Tabla 4

Clasificación Biosensores

Componentes	Transductor	Analitos
Bioquímicos		
Enzimas	Electroquímica	Drogas y sus metabolitos
Anticuerpos	Ópticos	Biomarcadores de enfermedades

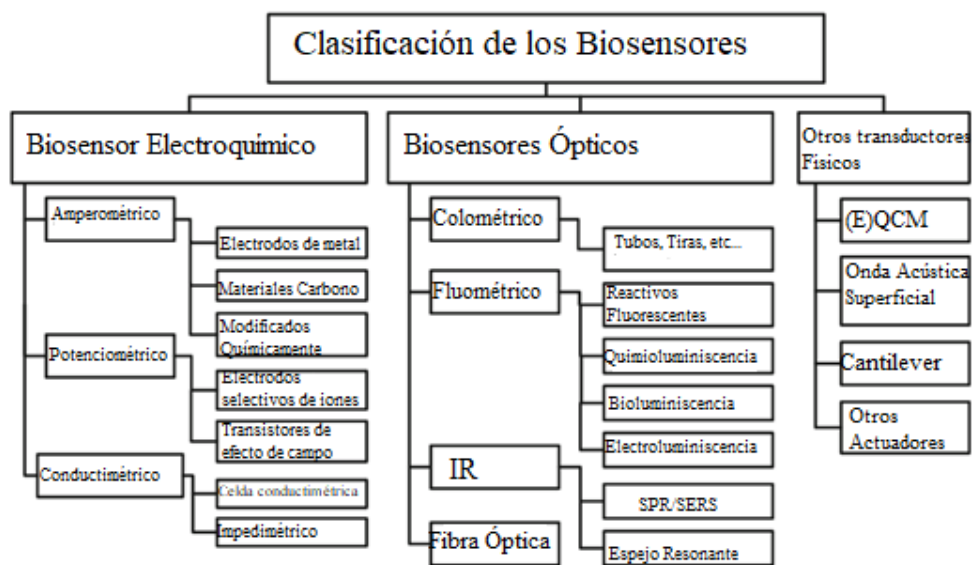
Ácidos Nucleicos	Microelectromecánicos	Vitaminas	y
		antioxidantes	
Receptores	Masa sensitiva	Metabolitos	
Tejidos	Entalpmétrico	Contaminantes	
		ambientales	
Células		Químicos industriales	

Nota. Adaptado de (Evtugyn, 2014).

La anterior tabla al ser efectiva no clasifica de una manera óptima la variedad existente de biosensores en la actualidad por lo tanto una diferente forma de clasificarla fue descrita en la misma fuente la cual sería la siguiente.

Figura 6

Clasificación de los Biosensores



Nota. Adaptado de (Evtugyn, 2014).

Por diversas razones, los biosensores comenzaron con transductores electroquímicos. Hasta hace poco, los biosensores amperométricos han sido los más populares, especialmente en varios dispositivos comerciales como los glucómetros o sensores de lactatos(Cho et al., 2020).

3.5.1 Biosensores Amperométricos

Un biosensor amperométrico es un dispositivo que utiliza la técnica amperométrica para detectar y cuantificar la presencia de un analito en una muestra biológica. Este tipo de biosensor se basa en la medición de la corriente eléctrica generada por una reacción química catalizada por un elemento de reconocimiento biológico, como una enzima, anticuerpo o ácido nucleico, en respuesta a la presencia del analito objetivo(J. Wang, 2008).

3.5.2 Biosensores Catalíticos

Los biosensores catalíticos son un tipo de biosensores que utilizan enzimas u otros catalizadores biológicos para amplificar la señal generada por la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. Estos catalizadores biológicos aceleran las reacciones químicas específicas que ocurren en presencia del analito objetivo, lo que aumenta la sensibilidad y la selectividad del biosensor (J. Wang, 2008). Estos biosensores pueden detectar una amplia gama de analitos, desde glucosa y colesterol hasta contaminantes ambientales y biomarcadores de enfermedades. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, los biosensores catalíticos tienen aplicaciones importantes en campos como el diagnóstico médico, la detección de alimentos y agua, y la monitorización ambiental (Shadman et al., 2019).

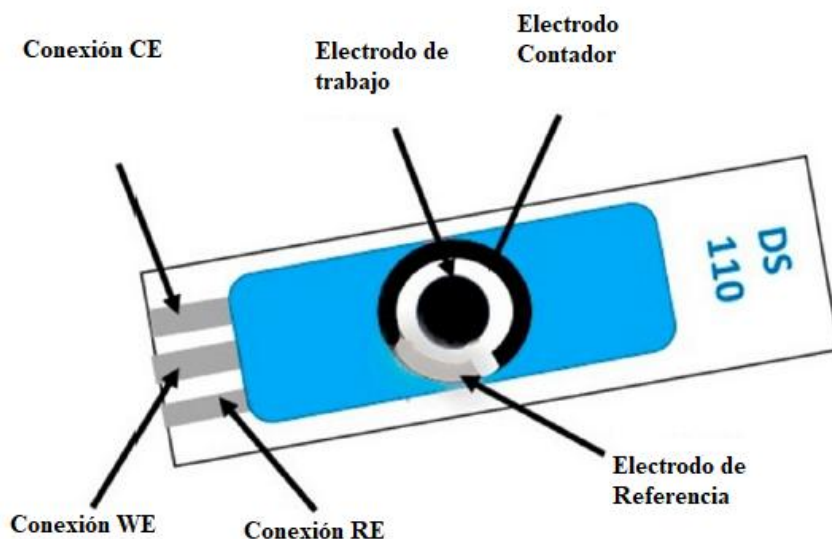
3.6 Electrodo serigrafado

Actualmente, los electrodos serigrafados están siendo una herramienta adecuada para el análisis electroquímico debido a sus propiedades únicas, como tamaño pequeño, bajo límite de detección, tiempo de respuesta rápido y alta reproducibilidad. Además, los electrodos serigrafados son plataformas adecuadas bien conocidas para el desarrollo de biosensores (Renedo et al., 2007). A lo largo de los años, los sensores basados en electrodos serigrafados (SPEs) han surgido como una de las principales ramas de la investigación electroquímica para análisis rápidos, específicos, portátiles, sensibles, de bajo costo y precisos, y se han destacado por tener aplicaciones innovadoras (Pérez et al., 2010).

Los electrodos serigrafados (SPEs) suelen estar compuestos por una celda electroquímica que consta de tres electrodos: el electrodo de referencia pseudo (RE), el electrodo contador (CE) y el electrodo de trabajo (WE), que están impresos en un sustrato sólido (Paimard et al., 2023), como se muestra en la Figura 7.

Figura 7

Esquema más común para un SPE



Nota. Adaptado de (Paimard et al., 2023).

3.6.1 Electrodos serigrafiados modificados superficialmente con peroxidasa

Los electrodos serigrafiados modificados con peroxidasa son dispositivos electroquímicos en los que la superficie del electrodo se funcionaliza con la enzima peroxidasa. Esta modificación permite la detección específica de compuestos como el peróxido de hidrógeno, aprovechando la actividad catalítica de la peroxidasa para mejorar la sensibilidad y selectividad del sensor. En la Tabla 5 se evidencian unos ejemplos de electrodos serigrafiados modificados superficialmente con peroxidasa.

Tabla 5

Electrodos serigrafiados modificados superficialmente con distintas fuentes de peroxidasa.

Tipo de Electrodo	Fuente	Referencia
Electrodo serigrafiado de grafeno	Peroxidasa extraída de pasto de guinea (<i>Panicum máximum</i>)	(Contreras, 2016)
Electrodo serigrafiado de carbono modificado con ferrocianuro potásico	Peroxidasa de rábano picante (HRP)	(<i>Electrodos Serigrafiados Modificados (SIPE) MicruX</i> , n.d.)
Electrodo serigrafiado de oro modificado con nanotubos de difenilalanina	Peroxidasa de palma real (<i>Roystonea regia</i>)	(Vargas, 2016)

3.7 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas son herramientas analíticas que aprovechan la interacción entre la electricidad y las reacciones químicas para investigar la composición, estructura y actividad de especies químicas en solución. Estas técnicas posibilitan la medición de corrientes eléctricas, potenciales o impedancias eléctricos relacionadas con diversas reacciones, como las redox, ionización, adsorción o desorción de especies químicas en la interfaz entre el electrodo y la solución (Zoski, 2007).

3.7.1 Cronoamperometría

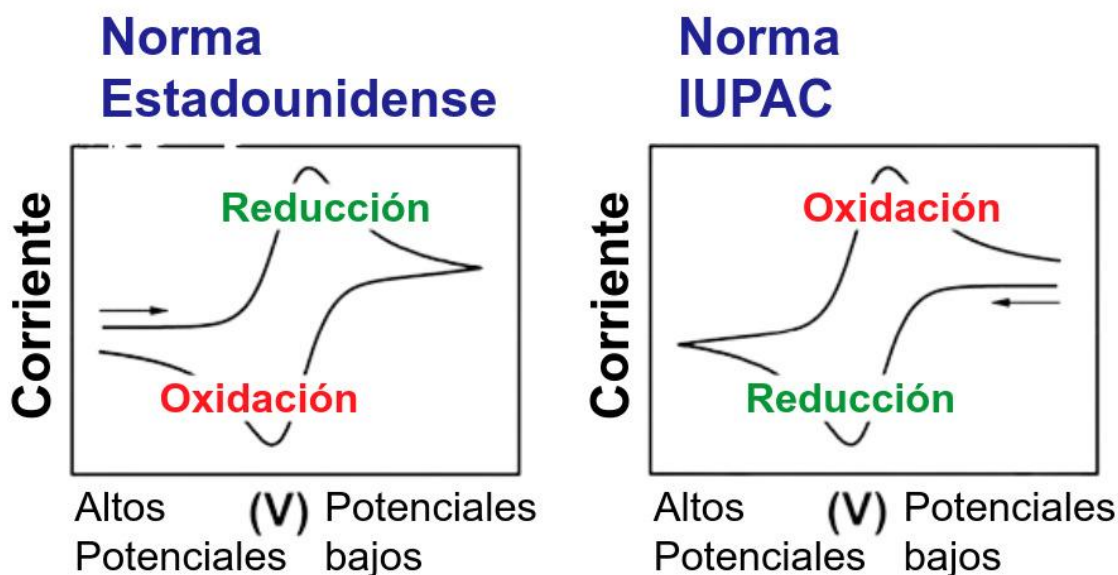
La cronoamperometría es un método electroquímico empleado para analizar la velocidad de las reacciones electroquímicas. En este procedimiento, se aplica un potencial constante a un electrodo y se registra la corriente eléctrica que pasa a través de él a lo largo del tiempo. Esta técnica resulta especialmente útil para examinar los procesos de difusión y para evaluar la rapidez de reacción de sustancias electroactivas en una solución. La cronoamperometría tiene diversas aplicaciones en áreas como la investigación electroquímica, la caracterización de materiales y el desarrollo de biosensores (Grieshaber et al., 2008).

3.7.2 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica electroquímica potente y popular comúnmente empleada para investigar los procesos de reducción y oxidación de especies moleculares. La CV también es invaluable para estudiar reacciones químicas iniciadas por transferencia de electrones, lo que incluye la catálisis. Dos normas son comúnmente utilizadas para reportar datos de CV, La norma americana y la norma IUPAC. Visualmente los datos reportados en las dos normas aparecen rotados 180°(Elgrishi et al., 2018) . Tal como se aprecia en la Figura 8.

Figura 8

Diferencia entre las 2 normas para reportar datos CV



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

La reversibilidad en VC es una característica clave ya que esta permite evaluar la eficiencia de las reacciones electroquímicas. Se puede dar de naturaleza química, como cuando el producto de la reacción es estable y puede reoxidarse tras su reducción, o de manera electroquímica, relacionada con la cinética de transferencia electrónica entre el electrodo y el electrolito. Los procesos que controlan esta propiedad es la velocidad de transporte de masa y la velocidad de transferencia de electrones (Bard & Faulkner, 2001). Dependiendo de la relación entre estas velocidades, se puede clasificar de la siguiente manera

- **Reversibles:** Cuando la velocidad de transferencia electrónica es mucho mayor que la velocidad de transporte de masa
- **Cuasi-reversibles:** Cuando ambas velocidades son comparables

- **Irreversibles:** Cuando la velocidad de transporte de masa supera significativamente a la transferencia electrónica.

4. Metodología

4.1 Reactivos

Los reactivos y materiales utilizados en este estudio fueron adquiridos en los siguientes fabricantes: Merck: sulfato de amonio, polietilenglicol (12000) (NH₄)₂SO₄ y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (30% p/v); J.T Baker: guayacol (C₇H₈O₂), ácido bórico H₃BO₃, ferricianuro de potasio K₃Fe (CN)₆.

La peroxidasa de dormidera (PMP) se extrajo y purifico parcialmente en el laboratorio del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de Universidad Industrial de Santander (UIS).

4.2 Extracción y purificación parcial de pmp

4.2.1 Extracción

Para la extracción de la peroxidasa de dormidera (*Mimosa pudica*) se empleó un método similar al descrito por Sakharov y colaboradores (Sakharov et al., 1999), con algunas modificaciones. Se recolectaron hojas de dormidera en los terrenos de la ladrillera Santander, ubicada en Provenza, y se lavaron con agua destilada. Una vez lavadas, se secaron y pesaron, usando un total de 100 g. Esta cantidad se dividió en dos partes iguales de 50 g cada una, que fueron colocadas en recipientes de plástico estériles.

Al recipiente se le añadieron 400 mL de solución buffer de fosfatos (fosfato dipotásico y fosfato monopotásico) conocido como PBS a 100mM, en una proporción de 1:4 respecto al peso de la muestra. Las soluciones fueron preparadas con tres valores de pH diferentes: 6.0, 7.0 y 8.0, con el objetivo de determinar el pH óptimo para la extracción, basado en la actividad enzimática obtenida. Las mezclas se agitaron en un shaker durante 24 horas a 150 rpm, a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, el extracto fue filtrado utilizando un filtro de algodón para café, y se midió el volumen obtenido. A continuación, se determinó la actividad enzimática, seleccionando el extracto con mayor actividad. Para la dormidera, el pH óptimo resultó ser 8.0. Posteriormente, este extracto fue mezclado con los 50 g de planta reservados previamente, con el objetivo de concentrar la POD en el extracto final. La mezcla fue nuevamente agitada en el shaker durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se filtró de nuevo, se midió el volumen y se evaluó la actividad enzimática del extracto concentrado.

4.2.2 Centrifugación y eliminación de pigmentos

Se realiza la centrifugación del extracto concentrado a 7000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, con el fin de eliminar los sólidos. Posteriormente, se mide la actividad enzimática del extracto centrifugado.

Siguiendo la metodología de reparto bifásico, se adiciona polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 12.000, en una concentración del 14% p/v, al extracto centrifugado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que los sólidos se disolvieron completamente. Una vez disueltos, se agregó sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 10% p/v, bajo agitación magnética constante, hasta que todos los sólidos se disolvieron.

La mezcla resultante se dejó reposar en un embudo de decantación a temperatura ambiente, hasta que se logró la separación completa de las dos fases, lo cual tomó aproximadamente 3 horas. La fase clara contenía la peroxidasa, mientras que la fase oscura contenía los pigmentos polifenólicos. Finalmente, se midió la actividad enzimática de la fase clara y oscura.

4.2.3 Concentración del extracto enzimático

Para concentrar el extracto enzimático, se utilizó la técnica de ultrafiltración empleando Amicones de 10 kDa. El extracto se centrifugó durante 30 minutos a 5000 rpm y a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se midió la actividad enzimática tanto del extracto concentrado como del sobrenadante. Tanto este extracto como los obtenidos en etapas anteriores se reservaron en un congelador a -20 °C, con el objetivo de asegurar la conservación de la proteína y permitir su uso en ensayos posteriores.

4.2.4 Determinación de proteínas mediante un Kit de cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinonínico (BCA) Pierce™

La determinación de la concentración de proteínas en las diferentes etapas de la semi-purificación de PMP se llevó a cabo utilizando el kit colorimétrico de BCA. Se siguieron todos los pasos estandarizados y explicados en el manual del kit, desde la preparación de la curva de calibración hasta el tratamiento adecuado de las muestras. Las mediciones se realizaron en el equipo de microplacas Multiskan Sky de Thermo Fisher Scientific, ejecutando cada lectura por triplicado para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados.

4.2.5 Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática de la PMP se determinó mediante la medición de las velocidades iniciales, utilizando guayacol como sustrato. La velocidad de aparición del producto fue evaluada, aprovechando que el guayacol tiene un coeficiente de absorción molar de 5200 M⁻¹cm⁻¹.

Se preparó un sustrato que contenía 40 µL de guayacol, 10 µL de H₂O₂ y 20 mL de PBS. De esta solución, se añadieron 3 mL a una celda de cuarzo, a la que posteriormente se agregaron 99 µL de extracto enzimático disuelto en una proporción 1:10 en PBS. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS, cuantificando la variación de absorbancia a 470 nm durante 2 minutos.

Una unidad de actividad peroxidasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de guayacol por minuto. La actividad específica se expresó en unidades de peroxidasa por miligramo de proteína (U/mg), mientras que la actividad volumétrica se reportó como U/mL de proteína.

4.3 Caracterización bioquímica parcial de la pmp

4.3.1 Estabilidad de la PMP a diferentes pH

Para evaluar la estabilidad de la enzima frente a diferentes pH, se preparó una solución de buffer universal compuesta por ácido bórico, ácido acético y ácido fosfórico (todos a 100 mM), además de hidróxido de sodio (10 mM). El buffer se ajustó a pH 2, 4, 6, 8, 10 y 12, respectivamente. Posteriormente, se tomaron 990 µL de cada solución de pH y se mezclaron con 10 µL de extracto enzimático, dejando las mezclas en incubación durante 2 horas.

Transcurridas las 2 horas, se procedió a medir la actividad enzimática como se describe en la sección 2.2.5, con la excepción de que el sustrato se preparó de la siguiente manera: 5 mL de la solución de cada pH, 2.5 µL de H₂O₂ y 10 µL de guayacol para medir la actividad enzimática.

4.3.2 Estabilidad a diferentes temperaturas

Para evaluar la termo estabilidad de la enzima, se llevaron a cabo dos ensayos diferentes. En el primer ensayo se buscó determinar la temperatura a la cual la enzima presenta el cambio de actividad significativo inicial, distinta de la temperatura ambiente (25 °C). En el segundo ensayo, se utilizó la temperatura óptima obtenida en el primer ensayo como constante, tomando alícuotas para medir la actividad enzimática a lo largo del tiempo.

En el primer ensayo, se prepararon 25 mL de una solución 1:10 del extracto enzimático con PBS pH 8.0 (100 mM), mezclando 0.25 mL de extracto con 24.75 mL de PBS. La solución se calentó gradualmente hasta alcanzar una temperatura de 40 °C. A partir de este punto, se tomaron alícuotas cada 5 °C (45 °C, 50 °C, 55 °C, etc.) hasta llegar a 80 °C. Cada alícuota fue enfriada a 25 °C antes de medir su actividad enzimática. Tras comparar las actividades enzimáticas, se determinó que la temperatura óptima era 50 °C, ya que a partir de esta temperatura se observó un decrecimiento significativo en la actividad respecto a la temperatura ambiente.

En el segundo ensayo, utilizando la temperatura óptima de 50 °C, se preparó una nueva solución 1:10 de extracto con PBS en las mismas condiciones. La solución se calentó de forma constante hasta alcanzar y mantener los 50 °C. Se tomaron alícuotas cada 10 minutos, las cuales se enfriaron a 25 °C antes de medir su actividad enzimática. Este procedimiento permitió evaluar la estabilidad de la enzima bajo condiciones de temperatura elevada a lo largo del tiempo, analizando cómo su actividad se ve afectada por la exposición prolongada al calor.

4.4 Modificación de la superficie de los electrodos con el extracto enzimático

La modificación de electrodo serigrafiado con nanopartículas de oro se llevó a cabo mediante la inmovilización de la PMP, para lo cual se depositó 10 µL de enzima y se dejó secar a temperatura ambiente por durante 24 horas.

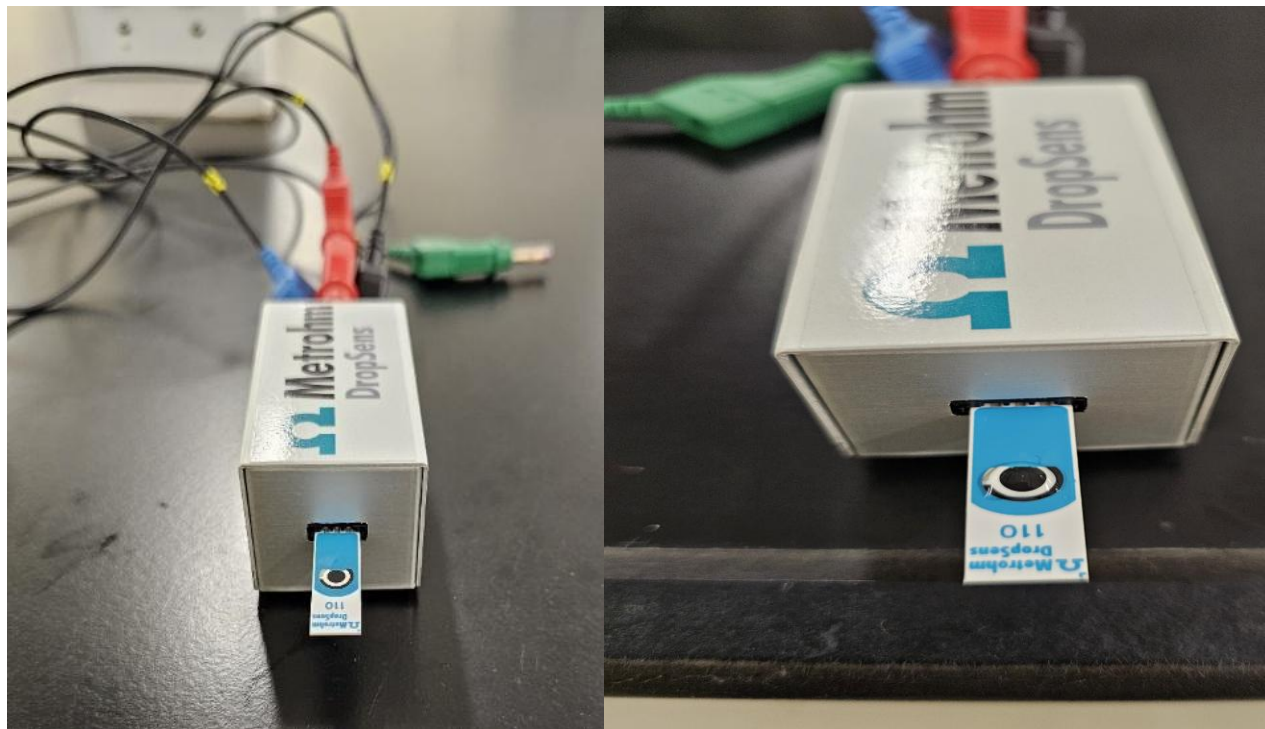
4.5 Caracterización por métodos electroquímicos

Para las mediciones electroquímicas se utilizó el equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT procesando los datos con el software NOVA (NOVA 1.10.1.9 software for autoklab instruments).

El montaje experimental implica conectar el equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOSTAT a los tres electrodos del electrodo serigrafiado (110), el electrodo debe permanecer en contacto con la solución electrolítica durante las mediciones como se observa en la Figura 9. Este sistema de medición está vinculado a una computadora donde se ejecuta el software NOVA en el cual se procesó todos los datos.

Figura 9

Electrodos serigrafados instalados en el equipo sin y con solución electrolítica respectivamente



4.5.1 Caracterización de los electrodos por voltamperometría cíclica mostrando respuesta enzimática del electrodo con peróxido de hidrógeno y PBS

Se utilizaron 8 electrodos, de los cuales 6 fueron modificados con diferentes extractos enzimáticos: 2 con extracto concentrado, 2 con extracto de reparto bifásico y 2 con extracto ultrafiltrado. Los extractos utilizados se habían reservado durante todas las etapas del proceso de extracción con el objetivo de seleccionar el más adecuado para continuar con los experimentos posteriores.

Tras un periodo de 24 horas de inmovilización, los electrodos se conectaron al equipo y se configuraron los parámetros de medición. Estos incluyeron un rango de voltaje de 1 a -1 V, una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Para las mediciones, se agregaron 10 µL de una solución de H₂O₂ a 1 mM a un electrodo de cada tipo de extracto modificado (tres en total) y a un electrodo sin modificar (control). Esto permitió comparar la respuesta electroquímica de los electrodos modificados frente a la solución de peróxido de hidrógeno. El procedimiento se repitió utilizando una solución buffer PBS en lugar de H₂O₂, con el mismo propósito de evaluar y comparar la respuesta de los electrodos.

Al analizar los resultados obtenidos, se decidió utilizar el extracto ultrafiltrado para los ensayos posteriores. Esto se debió a que presentó un buen potencial de reducción y, al mismo tiempo, una alta actividad enzimática en comparación con el extracto concentrado.

4.5.2 Efecto de diferentes concentraciones de H₂O₂ sobre el electrodo modificado

Utilizando la misma configuración mencionada previamente, se inmovilizaron 6 electrodos con 10 µL de extracto ultrafiltrado. Tras un periodo de 24 horas, los electrodos se conectaron al equipo de medición. A cada uno de ellos se les agregó 10 µL de solución de H₂O₂ con diferentes concentraciones: 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM, respectivamente. El objetivo de este experimento fue analizar cómo varía el pico de reducción del analito en función de la concentración de H₂O₂, observando si el incremento en la concentración del peróxido genera una mayor intensidad de corriente reductora, lo que indicaría una respuesta catalítica proporcional al aumento del analito.

4.5.3 Caracterización del electrodo por voltamperometría cíclica usando ferricianuro de potasio

El ferricianuro de potasio es un electrolito modelo ampliamente utilizado en la caracterización de electrodos debido a la claridad con la que se presentan los voltamperogramas cíclicos, lo que facilita la observación del proceso redox del par Fe²⁺/Fe³⁺. Para este experimento, se preparó una solución de 100 mM de K₃ [Fe (CN)₆], y las mediciones se realizaron con una velocidad de barrido de 50 mV/S en un rango de potencial de 0.6 V a -0.6 V. Este intervalo de potencial permitió visualizar de manera clara el proceso redox del ferricianuro sobre la superficie del electrodo.

El procedimiento consistió en inmovilizar 10 µL del extracto ultrafiltrado sobre la superficie del electrodo. Una vez que el extracto se secó, el electrodo se conectó al equipo de medición y se le añadieron 30 µL de solución de ferricianuro. Además, se utilizó un electrodo sin modificar al que también se le agregaron 30 µL de ferricianuro, funcionando como control. Posteriormente, se llevaron a cabo las mediciones necesarias para analizar el comportamiento electroquímico y comparar los resultados obtenidos.

4.5.4 Efecto de velocidad de barrido sobre la respuesta del peróxido de hidrógenos del electrodo modificado

Se inmovilizó un electrodo con 10 µL de extracto ultrafiltrado, al cual se le añadieron posteriormente 10 µL de H₂O₂ a 1 mM. Luego, se procedió a realizar mediciones utilizando diferentes velocidades de barrido, que incluyeron 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mV/s, dentro de un rango de potencial de 1 V a -1 V.

4.5.5 Efecto de posibles interferencias en la detección de Peróxido de Hidrógeno en los electrodos modificados

Se inmovilizaron 3 electrodos con 10 μL de extracto ultrafiltrado, a los cuales se les añadieron sustancias diferentes: glucosa, etanol y ácido cítrico, cada una a una concentración de 0.5 mM. Posteriormente, se llevó a cabo la medición de voltamperometría con el objetivo de identificar señales que pudieran indicar una posible interferencia en la respuesta electroquímica. Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos de la sección 2.5.2, utilizando como referencia los valores registrados para una concentración de H₂O₂ a 5 mM.

5. Análisis y resultados

5.1 Extracción y semi-purificación de PMP

La actividad enzimática de los extractos fue utilizada como criterio para comparar la eficiencia de la extracción y las etapas de semi-purificación. Este cálculo se realiza a partir de la derivada de la ecuación en base a la ley de Lambert-Beer (Ecuación 2) respecto al tiempo, gracias a que vincula la concentración del analito con la absorbancia. Obteniendo la formula aplicada (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 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y b en cm.

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

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

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

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

Con base a estudios (Caicedo et al., 2009; Cuervo et al., 2009) realizados con diferentes productos como el fruto del lulo (*Solanum Quitoense*) y la flor del clavel (*Dianthus Caryophyllus*) para la extracción de peroxidasa se decidió realizar un ensayo a diferentes pH esto para seleccionar el óptimo para realizar la extracción, los pH utilizados fueron 6, 7 y 8 respectivamente. Al realizar las mediciones, se obtuvieron los resultados los cuales fueron tabulados en la Tabla 6 y comparados bajo % de actividad relativa en la Figura 10. Como se evidencia tanto en la tabla como en la gráfica el pH optimo es 8 ya que es el que ofrece una mayor actividad en comparación con los valores de pH 6 y 7 respectivamente.

Figura 10

Extractos de PMP a diferentes pH de solución buffer de fosfatos

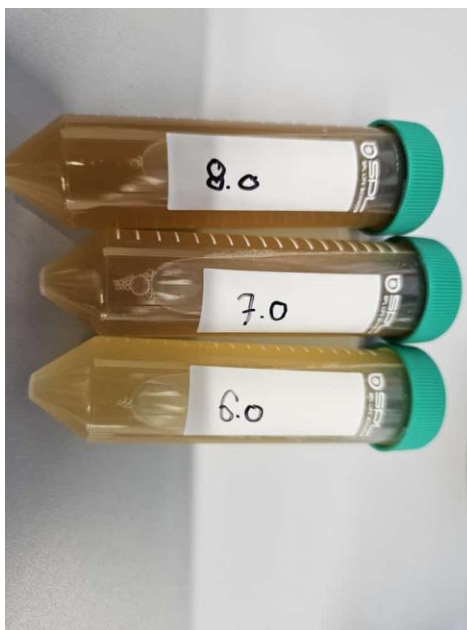


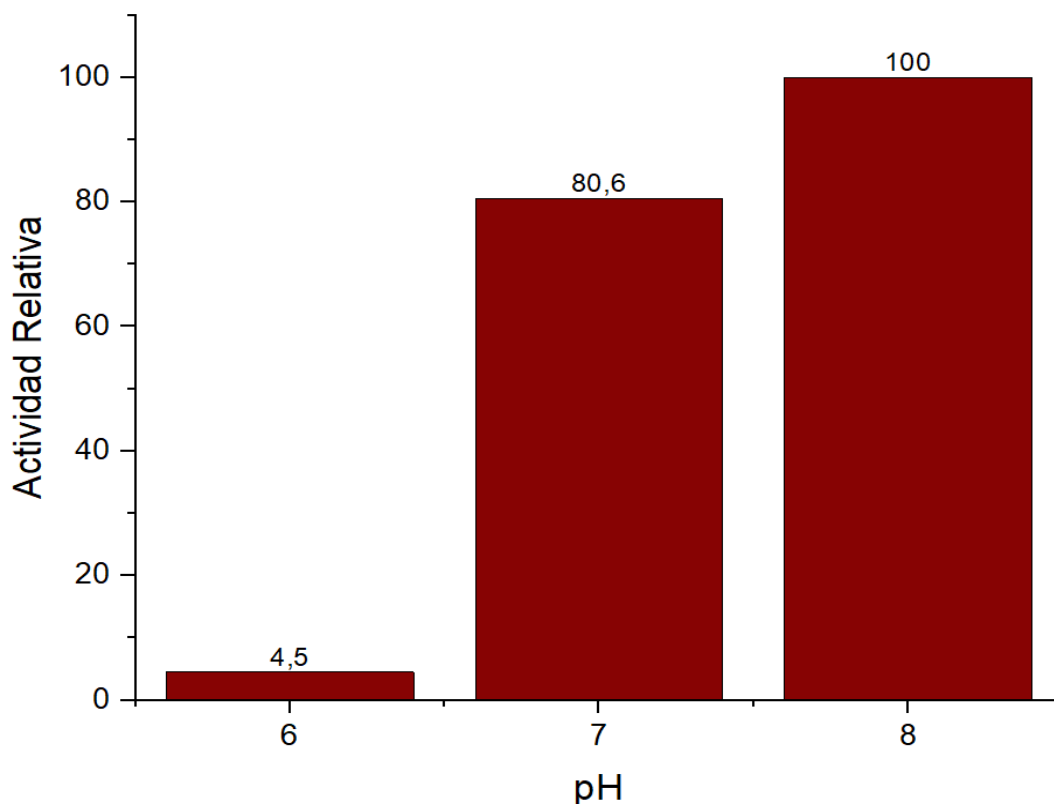
Tabla 6

Resultados de actividad enzimática volumétrica en función del pH

pH	Actividad enzimática volumétrica (U/mL)
pH 6	0.0243
pH 7	0.438
pH 8	0.543

Figura 11

Relación entre la actividad relativa y el pH durante el proceso de extracción de PMP

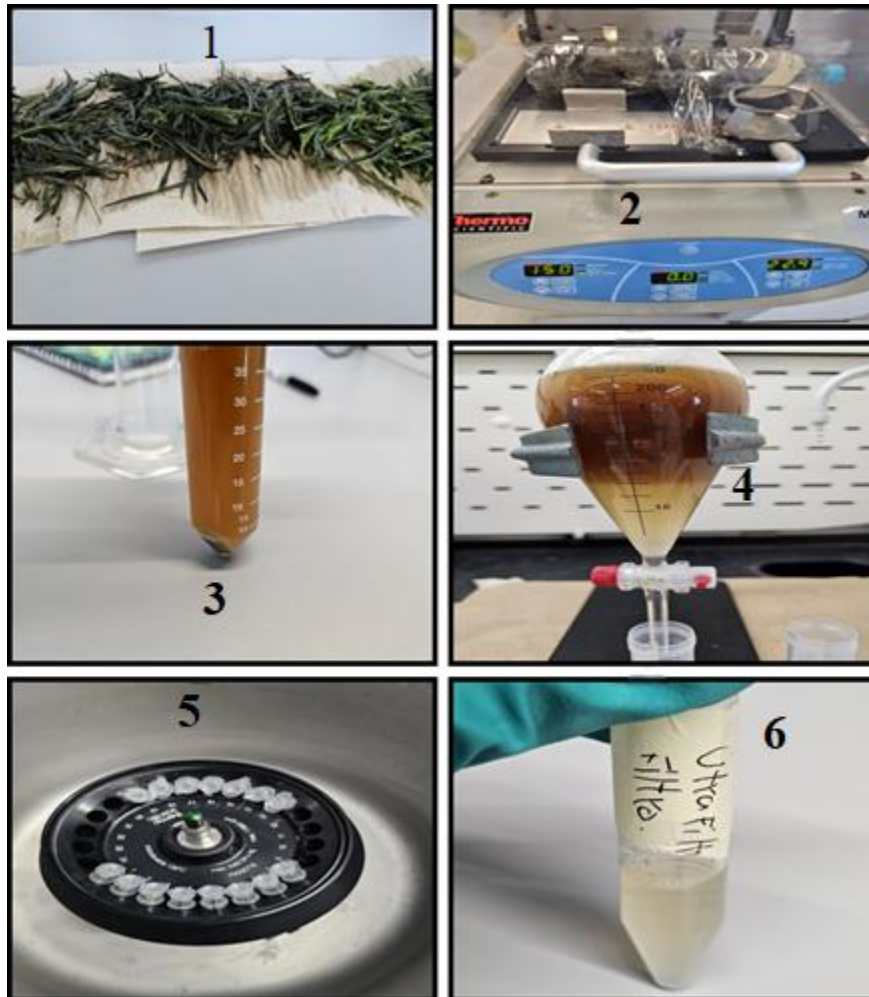


Nota. El sustrato utilizado fue guayacol y H₂O₂ para todos los parámetros.

Las plantas fueron recolectadas cuidadosamente utilizando guantes para evitar cualquier interferencia o contaminación de los pigmentos presentes. Los tejidos de las plantas suelen contener compuestos como lípidos, pigmentos, fenoles, etc. (Du et al., 2022). Los cuales pueden interferir en la enzima a la hora de ser extraída, por lo tanto, una vez se obtiene el extracto concentrado en la solución 100mM de PBS a 8.0 se procede a centrifugar a 5000 rpm a 4°C por 15 minutos para eliminar material particulado. Seguidamente, se lleva a cabo el reparto bifásico con PEG 12000 y (NH₄)₂SO₄ al 14% (Centeno et al., 2017) en la cual se recolecto la fase clara y se descartó la oscura esto tras dos horas de separación. Finalmente se llevó a cabo una última filtración utilizando amicones de 30kDa por 30 minutos a 5000 rpm y a 4°C, y se reservó el extracto que probablemente contenga la POD con un valor de actividad más alto en comparación con las otras etapas. En la Figura 12 se observa todos los procedimientos que se llevaron a cabo para la extracción final de la PMP.

Figura 12

Etapas en la extracción y semi-purificación de la PMP



Nota. Siguiendo la numeración: 1 hojas después de lavado, 2 y 3 extracción y centrifugación, 4 reparto bifásico, 5 ultrafiltración y 6 producto final.

Tabla 7

Datos de actividades en las diferentes etapas de purificación de PMP

Etapa	Volumen [mL]	Actividad Volumétrica [U/mL]	Actividad Específica [U/mg]	Actividad total [U]	Proteína total [mg/mL]	Rendimiento	Factor de Purificación
Extracción	365	2,03	0,621	0,0671	3,27	100	1
Reparto bifásico	265	5,40	10,1	0,178	0,533	265	16
Ultrafiltrado	4,50	4,16	9,36	0,137	0,444	204	15

En la Tabla 7, se presentan los datos correspondientes a las etapas de purificación de PMP. Durante el proceso, el contenido total de proteínas disminuye de un valor inicial de 3,27 mg/mL en la etapa de extracción a 0,444 mg/mL después del ultrafiltrado. Esto refleja la eliminación de proteínas no deseadas, logrando un aumento en la pureza relativa de la enzima. A medida que avanza la purificación, se observa un incremento significativo en la actividad específica, que aumenta de 0,621 U/mg en la etapa de extracción a 10,1 U/mg tras el reparto bifásico, y a 9,36 U/mg después del ultrafiltrado.

El rendimiento global del proceso es un parámetro crítico, que indica la proporción de la actividad enzimática total recuperada al final de cada etapa, tomando como referencia la actividad inicial. En este caso, el rendimiento disminuye progresivamente, alcanzando 204% después del ultrafiltrado. Este fenómeno puede explicarse por pérdidas inevitables de enzima durante los pasos de separación, especialmente en la etapa de ultrafiltración, donde una fracción de la enzima puede quedar retenida en la membrana o en residuos del sistema. Por otro lado, el factor de purificación

evalúa la eficacia del proceso, definiendo cuántas veces se ha incrementado la pureza de la enzima respecto a la muestra inicial(Andrade et al., 2021). En este estudio, el factor de purificación aumenta significativamente, pasando de 1 en la extracción a 16 tras el reparto bifásico, y se mantiene alto en 15 después del ultrafiltrado. Este incremento refleja la capacidad del sistema para eliminar proteínas no deseadas mientras concentra la enzima.

Es importante destacar que el reparto bifásico es un método altamente eficaz para la separación de proteínas gracias a las interacciones moleculares específicas entre la enzima y compuestos como el PEG o el sulfato, según lo descrito por Rito-Palomares(Rito-Palomares et al, 2017). Este sistema permite la conservación de la actividad catalítica, ya que no expone a la enzima a condiciones desnaturalizantes. Finalmente, la etapa de ultrafiltración, que utiliza una membrana semipermeable, clasifica las moléculas según su tamaño, concentrando aún más la enzima deseada para obtener una preparación de alta pureza(Benavides & Rito-Palomares, 2008).

5.2 Caracterización bioquímica de PMP

5.2.1 Estabilidad a diferentes pH

La estabilidad frente al pH es un parámetro crítico en el estudio de enzimas, ya que proporciona información sobre las condiciones óptimas para su actividad y conservación. Las enzimas, al ser proteínas, dependen de su estructura tridimensional para llevar a cabo su función catalítica, y esta estructura puede verse alterada en entornos con valores extremos de pH. Conocer el rango de pH en el cual una enzima mantiene su actividad permite optimizar su uso en aplicaciones industriales, como procesos agroalimentarios, de biocatálisis y de tratamiento ambiental, además de proporcionar datos útiles para su almacenamiento y formulación. Adicionalmente, esta información es clave para el diseño de procesos donde las enzimas son

utilizadas en condiciones específicas de pH, asegurando su máxima eficiencia y reduciendo costos operativos (Illanes, 1999; Stepankova et al., 2013).

Al realizar mediciones de actividad enzimática de la PMP en un rango de pH de 2 a 12, como se observa en la Figura 13 se determinó que esta enzima mantiene su máxima estabilidad a un pH de 4, donde conserva el 100% de su actividad original. Sin embargo, cuando el pH se aleja de este valor, hacia extremos ácidos o básicos, se observa una pérdida significativa de actividad, siendo 60% a pH el último valor importante antes de desnaturalizarse. Este comportamiento está alineado con otras peroxidasas de origen vegetal, cuya actividad óptima se encuentra generalmente en un rango de 4.0 a 7.0 (Galende, 2016). Esta pérdida de actividad en pH extremo puede atribuirse a la desnaturalización de la estructura proteica, especialmente en el grupo hemo, que es esencial para la funcionalidad del sitio activo. Cambios de pH pueden alterar las interacciones electrostáticas y la ionización de residuos clave en la proteína, afectando tanto la afinidad por los sustratos como la capacidad catalítica (Illanes, 1999; Kalsoom et al., 2015; Regalado et al., 2004).

Figura 13

Actividad enzimática de la PMP a diferentes pH

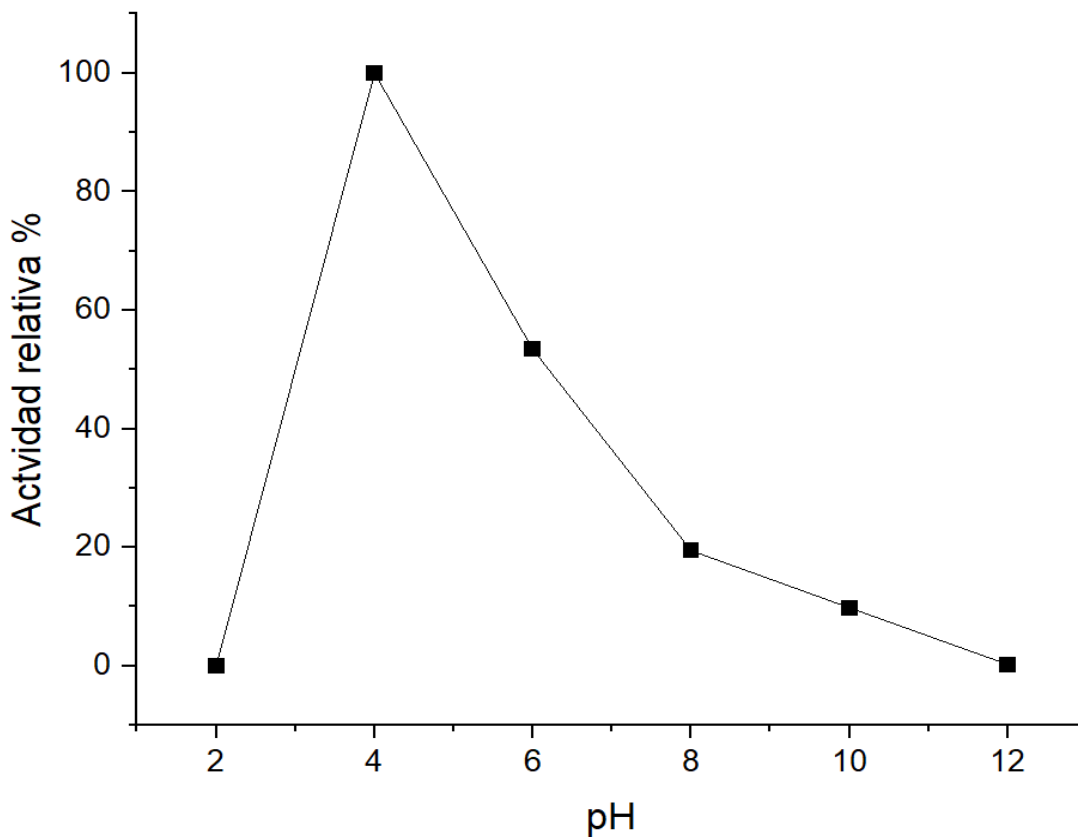


Tabla 8

Rango óptimo de pH y temperatura para la actividad de peroxidasas de origen vegetal

Fuente de POD	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Referencia
Rabano Picante (<i>Armoracia rusticana</i>)	7.0	30	(Lavery et al., 2010)

Rabano negro turco	6.5	30	(Kalin et al., 2014)
<i>(Brassica oleracea</i>			
<i>var. Capitata f. rubra)</i>			
Nabo	(<i>Brassica</i> 6.0	45	(Rodríguez., 2011)
<i>napus)</i>			
Jengibre	(<i>Ziingiber</i> 6.0	50	(El-Khonezy et al.,
<i>Officinale)</i>			
2020)			
Pasto de Guinea	6.0	*	(Centeno et al., 2017)
<i>(Panicum máximum)</i>			
Dormidera	(<i>Mimosa</i> 4.0	30-50	Este texto
<i>Pudica)</i>			

El pH óptimo de la HRP se encuentra en un rango de 7.0 a 8.0 (Lavery et al., 2010), lo que indica que esta enzima funciona eficientemente en condiciones cercana a la neutralidad de pH. Sin embargo, más allá de este rango, la HRP pierde significativamente su actividad enzimática debido a alteraciones estructurales asociadas a cambios en el entorno iónico, que afectan la funcionalidad del grupo hemo en el sitio activo. Por otro lado, la PMP muestra un comportamiento diferente, ya que mantiene un alto porcentaje de actividad en medios ácidos, lo que podría explicarse por una mayor estabilidad en su estructura proteica en condiciones, posiblemente debido a la presencia de interacciones electrostáticas que estabilizan la conformación activa de la enzima (Illanes, 1999). En medios básicos, la PMP pierde progresivamente su naturaleza catalítica debido a la

desestabilización de su estructura tridimensional, lo que genera la desnaturalización parcial o total del grupo hemo, reduciendo significativamente su actividad enzimática. Este contraste entre la HRP y la PMP resalta las diferencias estructurales y adaptativas entre peroxidasas de origen vegetal, lo cual es relevante para sus posibles aplicaciones industriales.

5.2.2 Termoestabilidad

Para realizar este estudio se calentó una solución con la enzima, se midió la actividad en diferentes alícuotas entre 40 y 80 °C cada 5 grados. En la Figura 14 se presenta la actividad relativa para cada temperatura que se midió la PMP donde se muestra que esta se mantuvo estable hasta los 50 grados que aún conservaba el 80% de su actividad. Después la actividad se reduce drásticamente desnaturalizándose.

Estudiando el proceso de inactivación térmica se tomó la misma solución y se calentó hasta llegar a 50 °C que fue la temperatura optima se dejó incubar e inmediatamente se tomó alícuotas cada 10 minutos las cuales se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se midió la actividad para ver cuál era su cambio en función del tiempo como se muestra en la Figura 15.

El análisis del proceso de inactivación térmica puede interpretarse como una conversión de un solo paso, en el cual la enzima en su estado nativo se transforma en una forma desnaturalizada como consecuencia de la exposición a altas temperaturas.(Aymard & Belarbi, 2000) Para analizar el proceso como una reacción de primer orden, se utiliza la ecuación (4) conocida como ecuación cinética de primer orden que permite modelar la inactivación de la actividad enzimática en función del tiempo, 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.

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-kt} \quad (4)$$

La constante de inactivación térmica (k) es un parámetro que describe la velocidad a la cual una enzima pierde su actividad bajo condiciones de calor (Cerón et al., 2016). Esta constante se obtiene al ajustar los datos experimentales de la actividad enzimática residual a lo largo del tiempo a un modelo cinético de primer orden, donde la pendiente de la gráfica del logaritmo natural de la actividad residual frente al tiempo corresponde al valor de k . Un valor alto de k indica una inactivación más rápida de la enzima, mientras que una más bajo sugiere una mayor estabilidad térmica.

En base a esto al realizar el ajuste lineal de la ecuación de $\text{Ln}(A_t/A_0) = -0.746 - 0.178t$ con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.9824$ demuestra que el modelo cinético de primer orden describe adecuadamente el proceso de inactivación como muestra la Figura 16. Obteniendo un valor de constante de inactivación térmica de $k = 0.178 \text{ min}^{-1}$, esto no significa directamente que la enzima pierde una cantidad fija de actividad por minuto, sino que cuantifica la fracción de actividad enzimática que pierde se pierde en función del tiempo.

Figura 14

Actividad relativa de la PMP a diferentes temperaturas

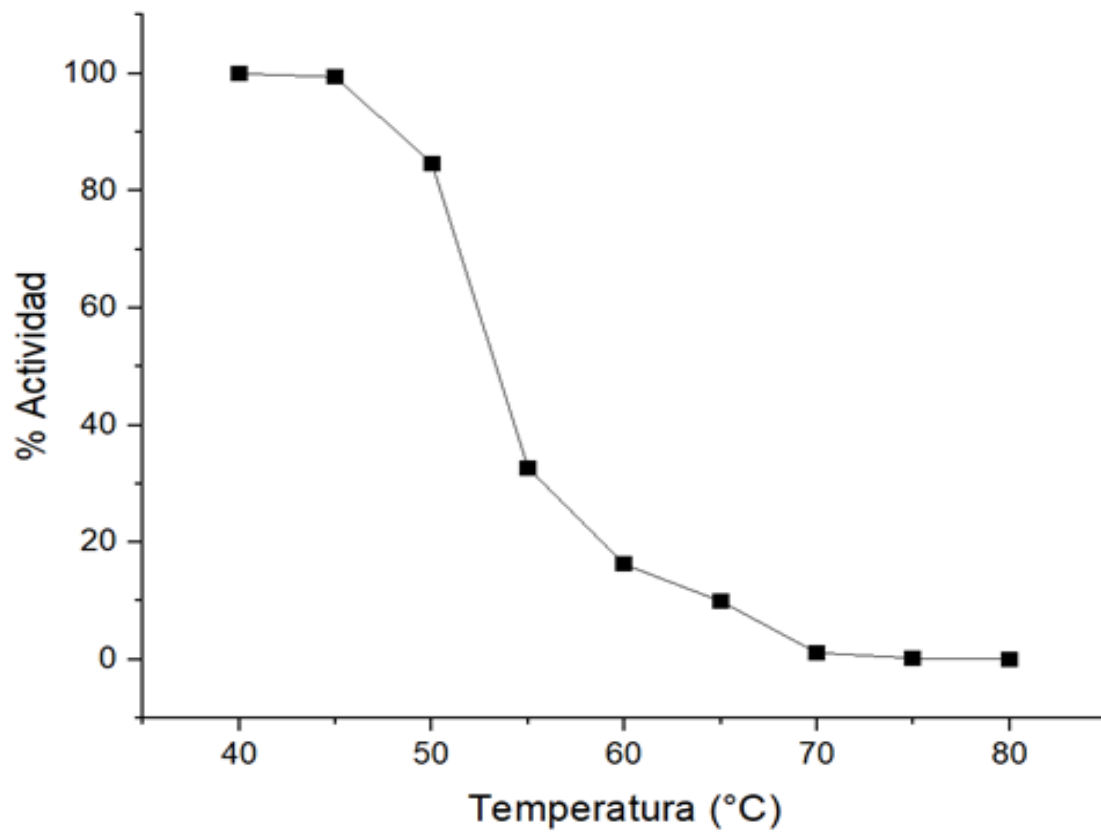
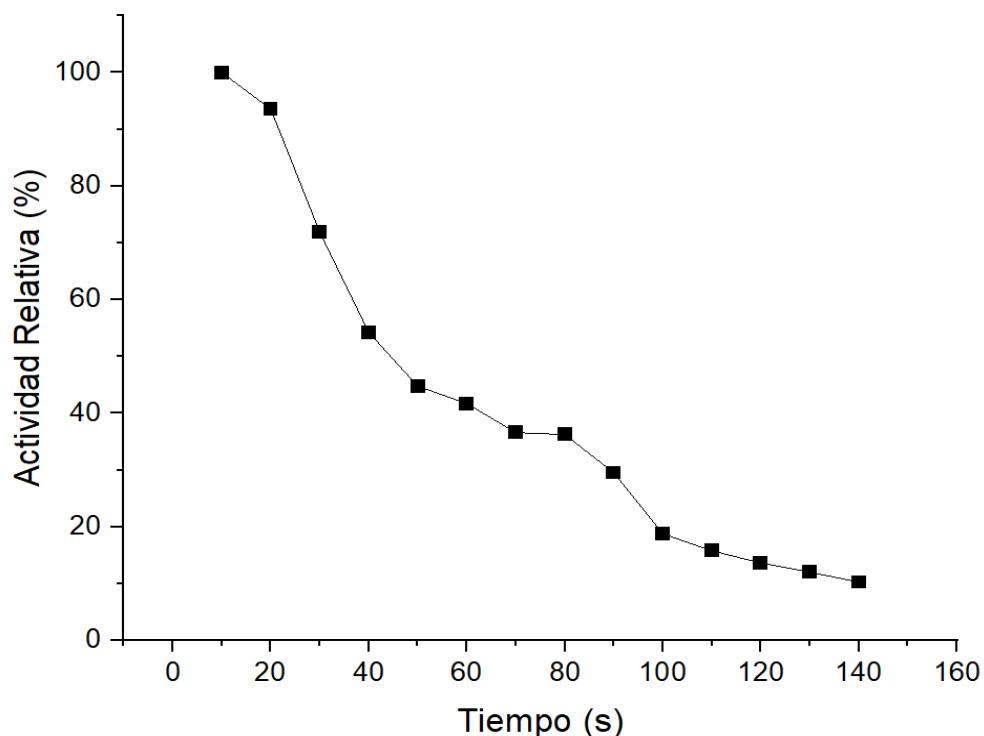


Figura 15

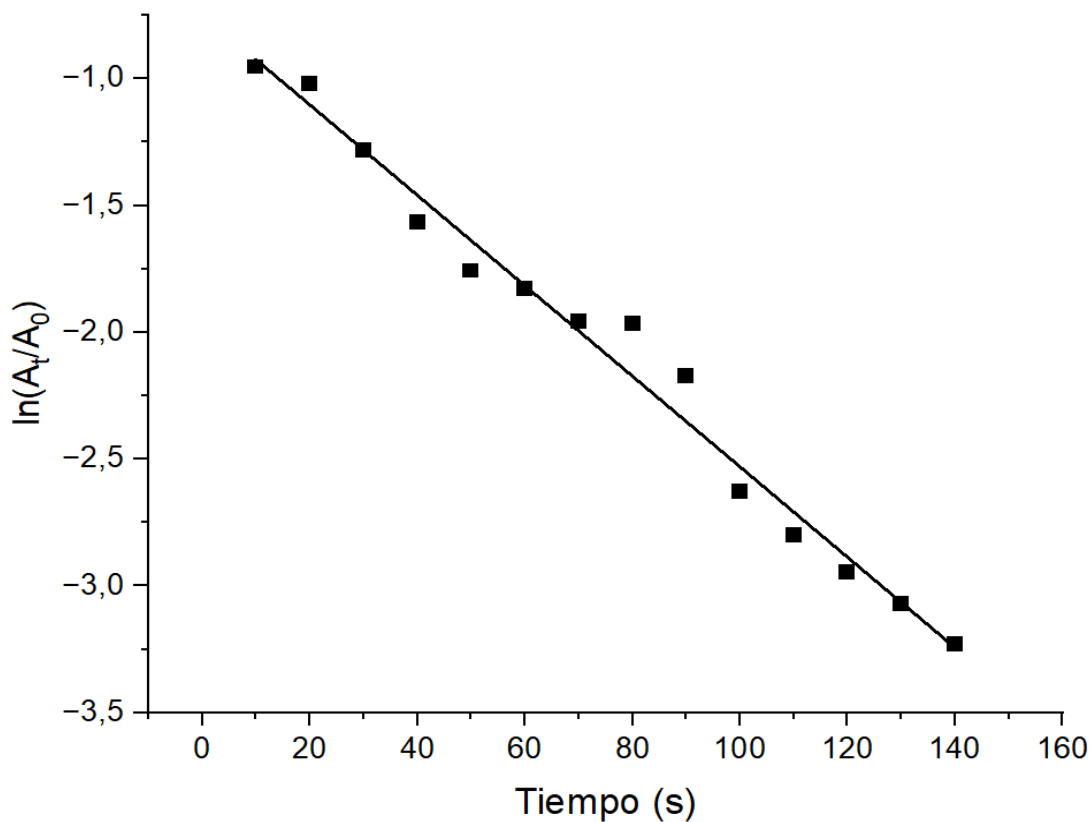
Actividad de la PMP a una temperatura constante en función del tiempo



La PMP tiene una constante de inactivación similar a la de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*) cuya k es 0.1466 min^{-1} y 0.4230 min^{-1} a partir de los $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (Aronaca H. et al., 2022). Estos valores relativamente altos indican que la enzima experimenta una rápida pérdida de actividad catalítica cuando se incrementa la temperatura por encima de este umbral. Esto sugiere que la PMP, al igual que la peroxidasa de mashua, tiene una estabilidad térmica limitada, lo que restringe su aplicación en procesos industriales o biotecnológicos que requieren condiciones de operación a temperaturas elevadas.

Figura 16

Cinética de la inactivación termica de PMP

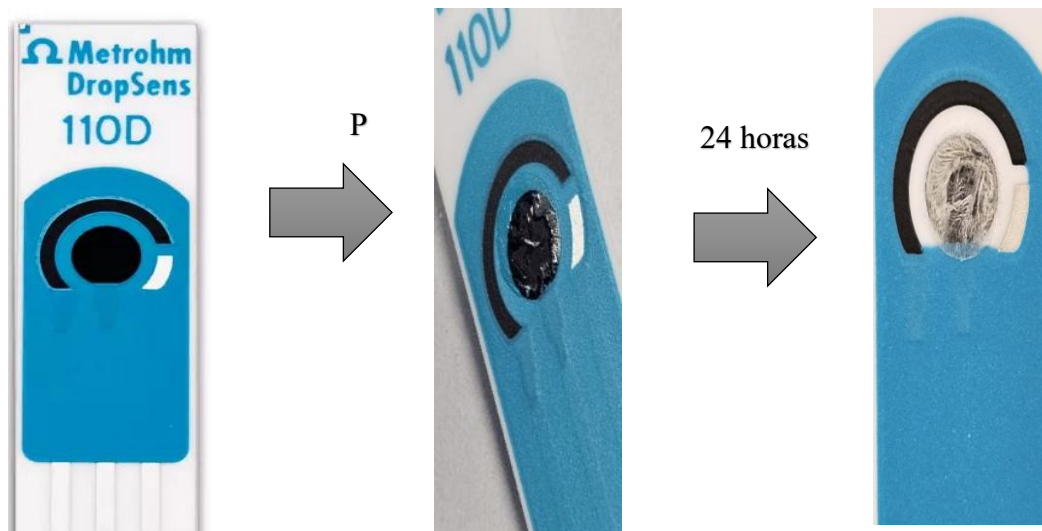


5.3 Modificación de electrodos con el extracto enzimático y caracterización electroquímica.

Posteriormente, se deja la PMP secar sobre la superficie del electrodo a temperatura ambiente durante 24 horas para permitir su completa adsorción como lo muestra la Figura 17.

Figura 17

Modificación superficial del electrodo de SPGE con PMP



5.3.1 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados

En las mediciones de VC realizadas para las tres etapas de purificación como se observa en la Figura 18, se encuentran diferencias significativas en los parámetros electroquímicos, la etapa concentrada presentó un comportamiento más favorable, con corrientes anódicas y catódicas de $I_{pa} = 48.2 \mu A$ e $I_{pc} = -42.5 \mu A$ más cercanas a la reversibilidad ideal $I_{pc}/I_{pa} = 0.881$ y un ΔE_p de 1160 mv, reflejando una interacción eficiente entre la enzima y el electrodo. En contraste, la etapa de reparto Bifásico mostró un mayor $\Delta E_p = 1250 \text{mv}$ y un menor $I_{pc}/I_{pa} = 0.474$ indicando una mayor irreversibilidad en la transferencia de electrones, probablemente debido a una menor estabilidad de la enzima. Finalmente, en la etapa de Ultrafiltrado, se observó un deterioro significativo en los parámetros electroquímicos, con una corriente anódica reducida de $I_{pa} = 38.2 \mu A$ y un cociente

anormalmente alto de 8.32, sugiriendo una posible desorción de la enzima o acumulación de producto de reacción(Bard & Faulkner, 2001).

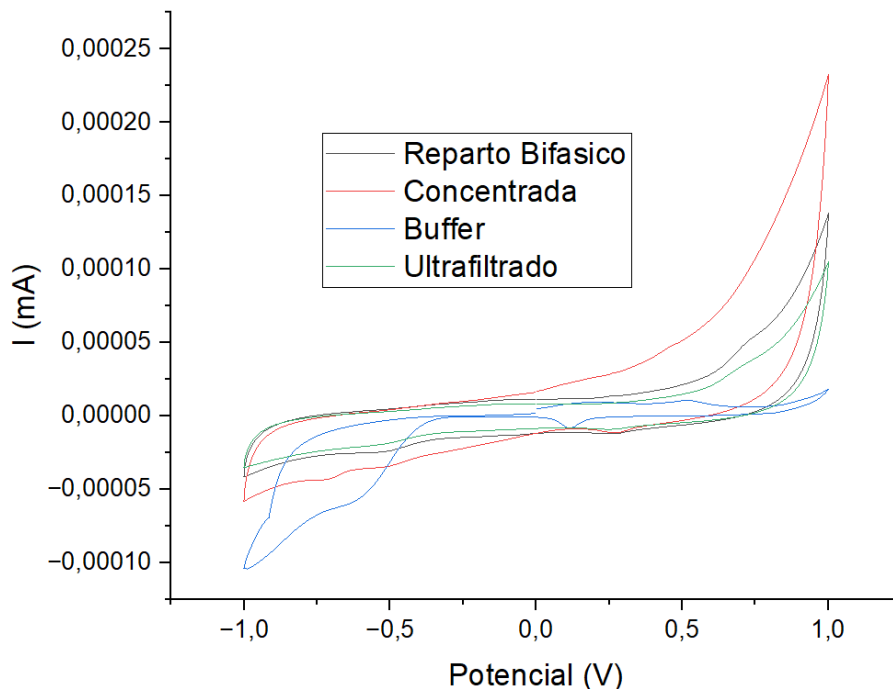
Tabla 9

Valores corrientes y voltaje de los picos en el CVs con PBS pH 8.0

Etapa	Epa [mV]	Epc [mV]	Ipa [μ A]	Ipc [μ A]	Δ Ep [mV]	Ipc/Ipa
Purificación						
Concentrada	468	-690	48,2	-42,5	1160	0,881
Bifásica	711	-542	50,1	-23,8	1250	0,474
Ultrafiltrado	748	-479	38,2	-318	1230	8,32

Figura 18

Voltamperogramas cíclicos

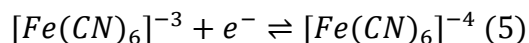


Nota. Las muestras fueron sometidas en solución de PBS a pH 8.0 modificados con diferentes etapas de purificación de PMP.

Para evaluar la reversibilidad de los electrodos modificados, se emplea un CV utilizando ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$) como electrolito modelo. Este compuesto es ampliamente utilizado para la caracterización de sistemas electroquímicos debido a la claridad de sus picos redox y la naturaleza reversible de su reacción (Pérez-Cordoves et al., 2016). En la figura 19 se observa los VCs que se obtuvieron para el electrodo modificado con PMP y otro para el electrodo sin modificar en una solución 10 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$.

Los voltamperogramas obtenidos presentan picos bien definidos de oxidación y de reducción para los dos sistemas analizados (Figura 19), y los parámetros claves se pueden observar en la Tabla 10. En el caso del electrodo sin modificar su pico anódico a 282 mV,

correspondiente la reducción del [Fe(CN)₆]³⁻ y un pico catódico a -151 mV, asociado para la oxidación del [Fe(CN)₆]⁴⁻ (Martinez & Alvarez, 2018; J. Wang et al., 2023), conforme a la ecuación descrita en la ecuación (5). Por otro lado, para los electrodos modificados con PMP, los picos se presentan a 203 mV y -119 mV, respectivamente, reflejando cambios en las interacciones del sistema redox con la superficie de electrodo.



La diferencia de potencia ΔE_p fue de 433 mV para el electrodo sin modificar y se redujo a 332 mV para el electrodo modificado con PMP. Esta disminución en ΔE_p sugiere que la modificación mejora la reversibilidad del sistema [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ al facilitar la transferencia electrónica entre el electrodo y el electrolito (Geleta, 2024). Además, las corrientes asociadas mostraron cambios significativos, con un I_{pa} de 845 μA y un I_{pc} de -939 μA para el electrodo modificado.

Figura 19

VC en solución 10 mM de (K₃[Fe(CN)₆]) en electrodos modificados con PMP

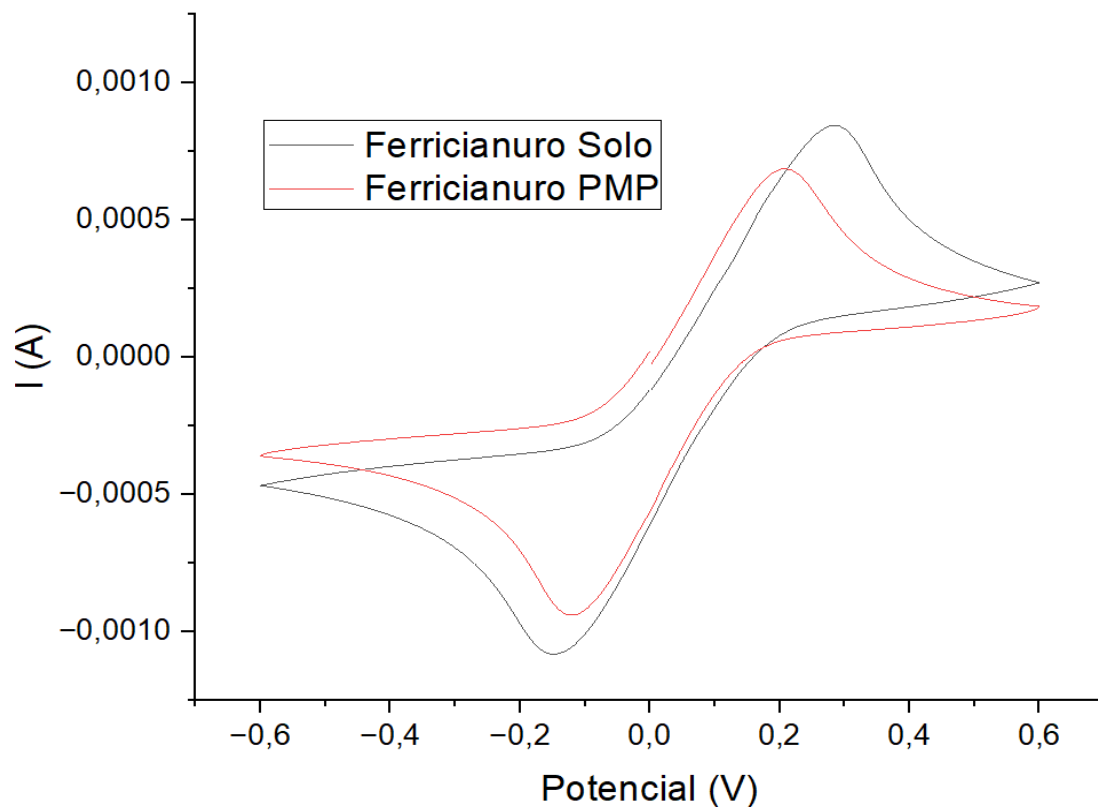


Tabla 10

Valores de corriente y voltaje de los CVs con (K₃[Fe (CN)₆])

Electrodo	Epa [mV]	Epc [mV]	Ipa [μ A]	Ipc [μ A]	Δ Ep [mV]	Ipc/Ipa
Ferri solo	282	-151	845	-1080	433	1.28
Ferri+PMP	203	-119	686	-939	322	1.23

Como se observa en la tabla 10 la relación entre los picos anódicos y catódicos para el Ferri solo fue de 1.28 y para el electrodo modificado fue de 1.23. Para que un proceso sea reversible la relación de I_{pc}/I_{pa} debe ser igual cercana al 1, ya que esto sugiere que estas especies son similares

en magnitud, sugiriendo que la especie electroactiva se oxida y se reduce de manera eficiente en ambas direcciones, manteniendo un equilibrio dinámico durante el ciclo de potencial aplicado.(Sánchez Calvo, 2014). Esto quiere decir que el proceso llevado a cabo con el electrodo modificado, al estar en un valor cercano a 1, es una reacción idealmente reversible o cuasirreversible, ya que no la tasa de los electrones no es lo suficientemente rápido para mantener el equilibrio Nernstiano.(Bagoëtiskiaei, 2006)

5.3.2 Reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno

La reducción del H₂O₂ es un proceso que se estudia ampliamente gracias a su relevancia en diversos campos, entre los más importantes destacan la biotecnología, la química analítica y la medicina. El peróxido de hidrógeno es un compuesto clave en reacciones enzimáticas catalizadas por peroxidasas, las cuales están involucradas en la desintoxicación de compuestos reactivos de oxígeno, así como en aplicaciones industriales y ambientales, tales como aguas residuales y la biosíntesis de compuestos de interés. Además, el H₂O₂ se utiliza como indicador en sensores electroquímicos para la detección de biomoléculas, ya que su reducción genera señales electroquímicas detectables que permiten cuantificar su concentración con alta sensibilidad y especificidad (Tiwari et al., 2012; Xing et al., 2022).

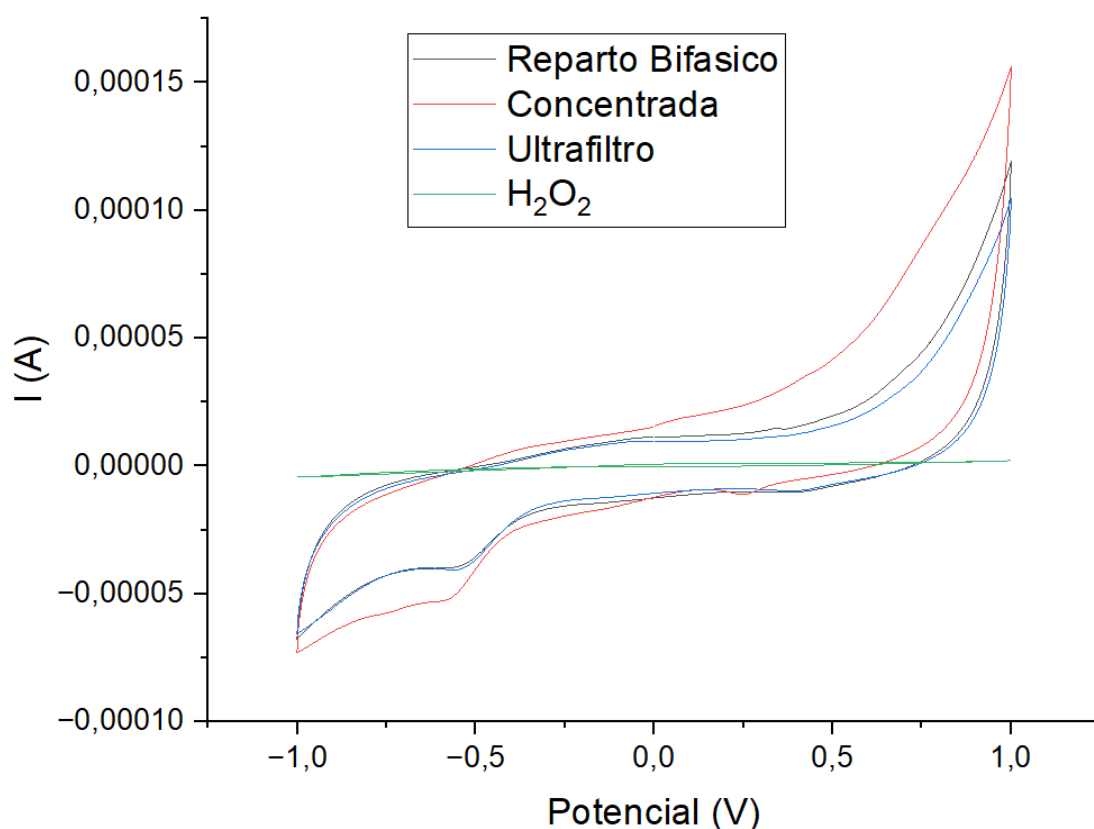
Es importante estudiar este proceso mediante el uso de electrodos serigrafiados ya que estos ofrecen una alternativa económica, reproducible y versátil para aplicaciones electroquímica, debido a que estos pueden realizar análisis en pequeñas cantidades de muestra y en condiciones de campo(Wongkaew et al., 2019).

Se prepararon cinco electrodos: cuatro se modificaron con PMP y uno se utilizó sin modificar, al momento de realizar las mediciones se les adiciono 10 µL de H₂O₂ 1 mM. Este

enfoque experimental permite evaluar la actividad catalítica de la enzima inmovilizada y la eficiencia de la modificación del electrodo (Centeno et al., 2017).

Figura 20

Voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno modificado con PMP en diferentes etapas de purificación



Los valores de potencial para los picos catódicos de reducción fueron de -0.0581 V para la fase de extracción concentrada, -0.540 V para la fase de reparto bifásico y -0.535 V para la fase de ultrafiltrado. Esta disminución sobre el potencial es beneficioso para la detección del H₂O₂, ya que reduce la posibilidad de reacciones interferentes, disminuye la corriente de fondo y los niveles de ruido. Al facilitar la detección del H₂O₂, mejora significativamente la precisión y exactitud de las

mediciones, lo cual es crucial en muchos puntos para aplicaciones analíticas.(Centeno et al., 2017; Higuera & Tristancho, 2006).

Tabla 11

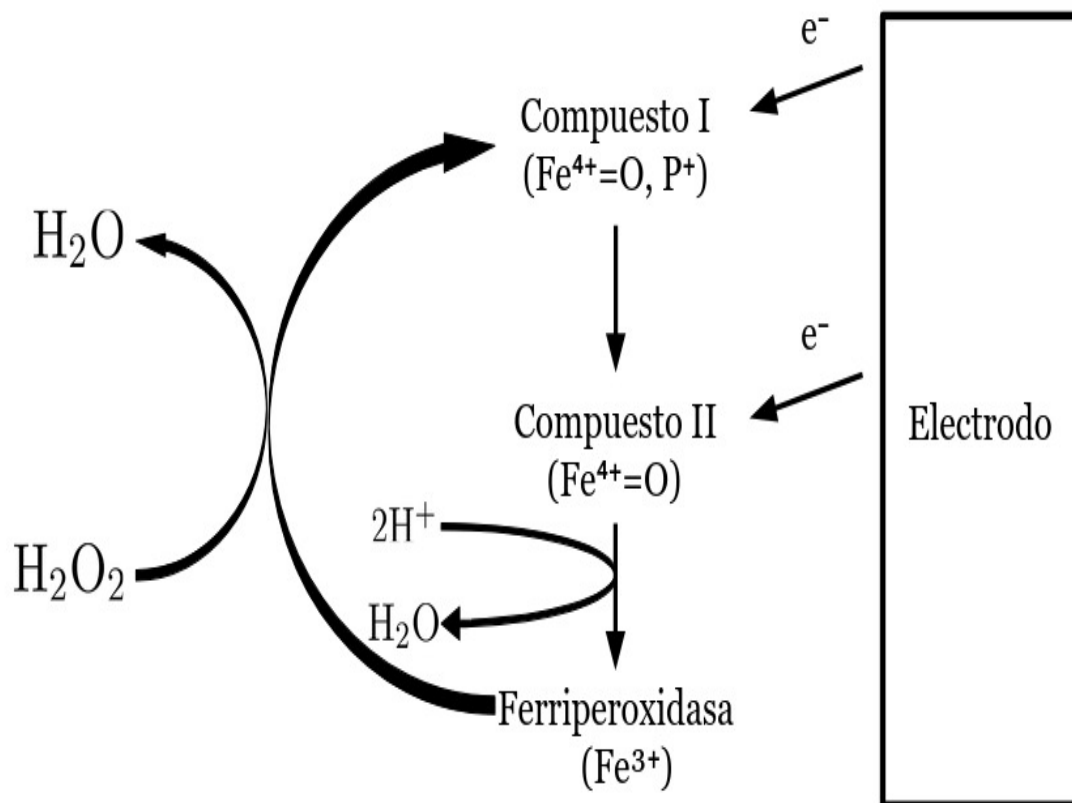
Diferentes estudios sobre reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno

Fuente de POD	Electrodo	Pico catódico	Referencia
HRP	Calomelanos Saturado (SCE)	-0.6 V vs SCE	(Matheus et al., 2007)
Microperoxidasa-11	Grafito-epoxi	-0.3 V vs Ag/AgCl	(Antonio, 2022)
Pasto de Guinea (<i>Panicum Maximum</i>)	Serigrafados grafeno (ESG)	de -0.5 vs Ag/AgCl	(Contreras, 2016)
Pasto de Guinea (<i>Panicum Maximum</i>)	ESG y Óxido grafeno (ESOG)	de -0.6 V ESG y -0.5 ESOG	(Castillo et al., 2022)

Como se observa en la Tabla 11, al comparar los valores de potencial de reducción del H₂O₂, los resultados obtenidos en este estudio con la PMP muestran valores cercanos o incluso mejores que los reportados en estudios previos. Los potenciales de reducción de -0.581 V para la fase de extracción concentrada, -0.540 V para la fase de reparto bifásico y -0.535 V para la fase de ultrafiltrado son más positivos en comparación con los valores reportados para otras peroxidasa, como la HRP (-0.6 V vs SCE) y la Microperoxidasa-11 (-0.3 V vs Ag/AgCl). Esto resalta la eficiencia de la PMP como un biocatalizador prometedor para la detección del peróxido de hidrógeno, ya que su menor sobrepotencial mejora la sensibilidad y selectividad del sistema, reduciendo posibles interferencias y optimizando el desempeño analítico.

Figura 21

Mecanismo de reducción directa bioelectrocatalítica de H₂O₂ en electrodos funcionalizados con peroxidasa



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

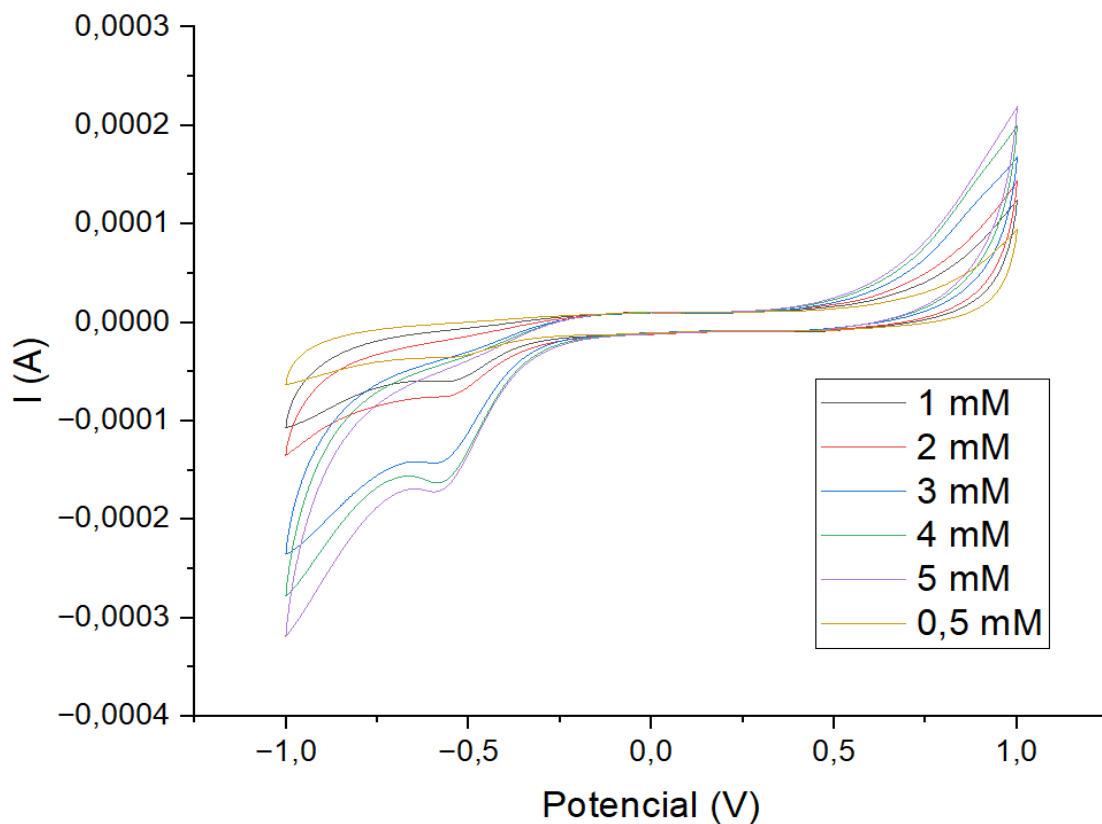
En la figura 21 se presenta un mecanismo que describe los pasos fundamentales en la reducción directa bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno cuando interactúa con electrodos modificados con peroxidasa. Este proceso involucra la formación de intermedios reactivos como el compuesto I (Fe⁴⁺=O, P⁺) y el compuesto II (Fe⁴⁺=O), los cuales son esenciales para la transferencia secuencial de electrones que culmina en la reducción completa del H₂O₂ en agua.

También resalta el papel de la ferriperoxidasa (Fe³⁺) como punto de inicio y final del ciclo catalítico.

El mecanismo de la reducción directa bioelectrocatalítica del H₂O₂ en electrodos modificados superficialmente con peroxidasa, represando en la Figura 21. involucra la interacción del H₂O₂ con la ferriperoxidasa (Fe³⁺). Inicialmente, el H₂O₂ oxida la ferriperoxidasa, formando un intermediario reactivo denominado compuesto I (Fe⁴⁺=O, P⁺). Este intermediario luego sufre dos procesos secuenciales de reducción. En el primero, se forma el compuesto II (Fe⁴⁺=O) mediante la transferencia de un electrón desde el electrodo. Posteriormente, un segundo electrón reduce el compuesto II, regenerando la ferriperoxidasa (Fe³⁺) y completando el ciclo catalítico, mientras que el H₂O₂ es convertido en H₂O. Este proceso es facilitado por la transferencia electrónica directa entre el electrodo y la enzima modificada, facilitando la reacción eficiente y específica (Ruzgas et al., 1996). Esta representación del mecanismo permite establecer una conexión directa entre los principios teóricos de la bioelectrocatalisis y los resultados experimentales obtenidos.

Figura 22

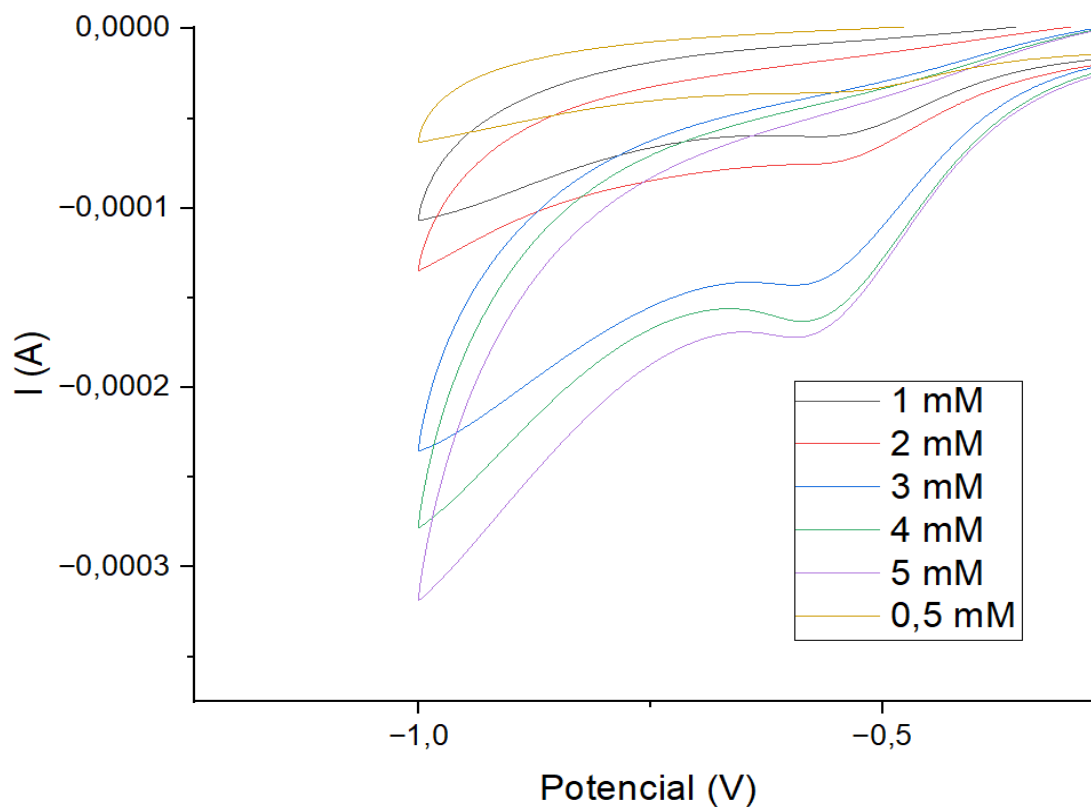
Voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno



Nota. Las mediciones fueron hechas en variaciones de 1 mM a 50 mVs⁻¹.

Figura 23

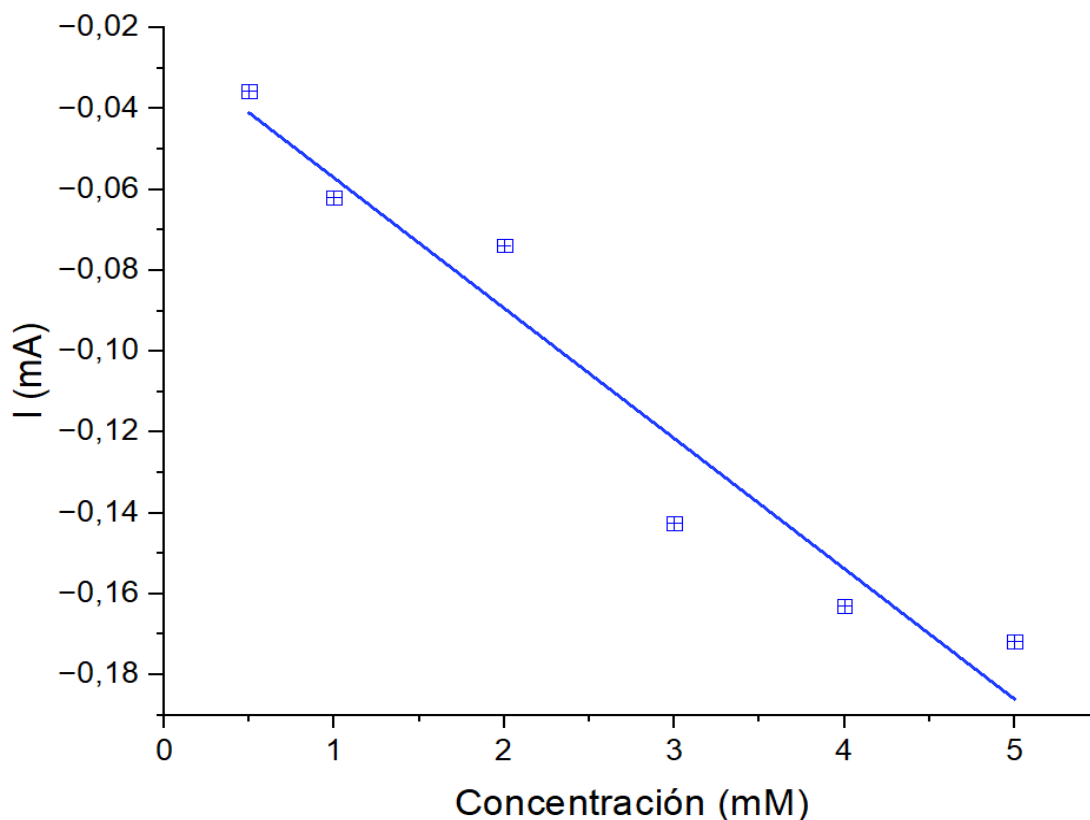
Ampliación de voltamperogramas cíclicos en solución de peróxido de hidrógeno



Nota. Las mediciones fueron tomadas en variaciones de 1 mM a 50 mVs⁻¹ y se presentan ampliados en los picos de reducción.

Figura 24

Curva de calibración para H₂O₂ a diferentes concentraciones

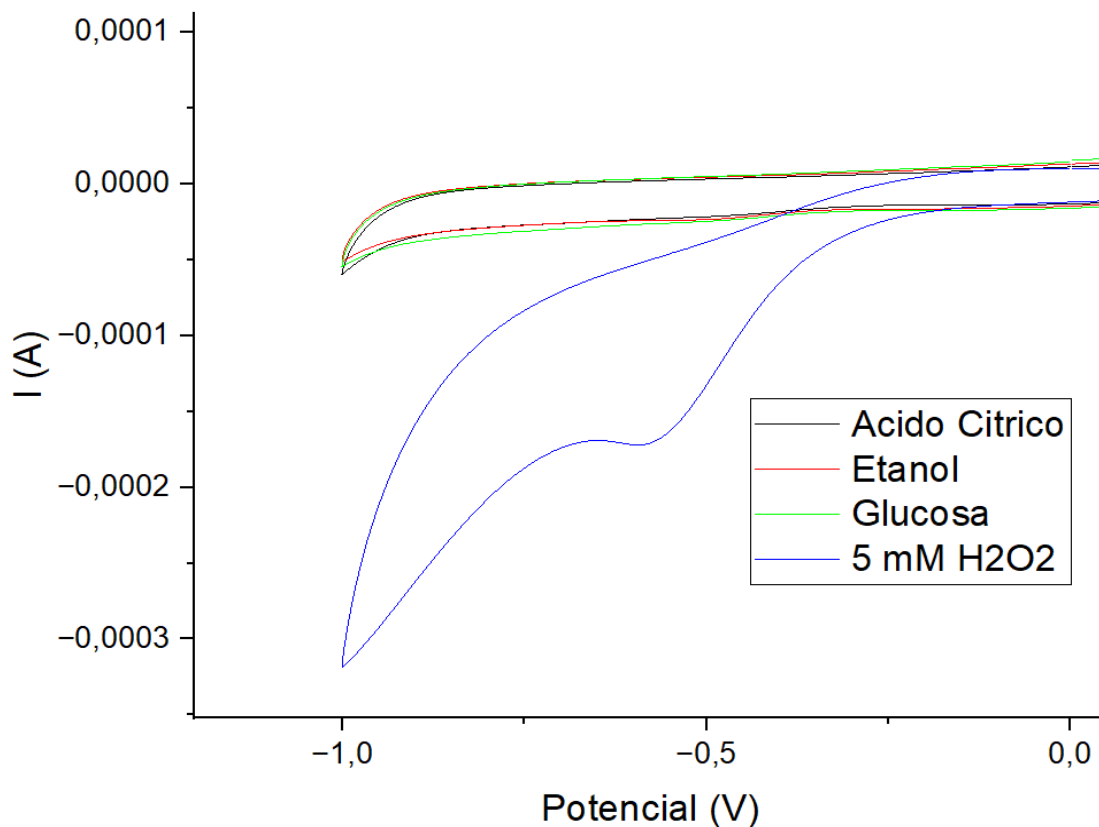


De acuerdo con los resultados de la Figura 24 la ecuación de la recta es $I_{pH_2O_2} = -0.0275 - 0.243[H_2O_2]$ y $R^2 = 0.967$, el valor de R^2 indica que el 96.7% de la variabilidad en la corriente se puede explicar por la de H₂O₂, lo que sugiere una relación lineal fuerte entre ambas variables. Este alto coeficiente de determinación demuestra que la PMP tiene un comportamiento altamente predecible en la detección cuantitativa de H₂O₂ en soluciones acuosa.

Para evaluar la especificidad del electrodo modificado con PMP, se realizaron mediciones de VC frente a otros tres compuestos (etanol, ácido cítrico y glucosa), lo que permitió comparar sus respuestas electroquímicas en voltamperograma.

Figura 25

Respuesta voltamperométrica de electrodos modificados con PMP en presencia de H₂O₂ y otras especies interferentes



Observando la Figura 25, los resultados indican que, incluso en presencia de posibles interferencias como etanol, glucosa y ácido cítrico, la respuesta del SPGE es selectiva al H₂O₂ al ser modificado superficialmente con PMP. La alta especificidad hacia el H₂O₂ hace de este una herramienta valiosa para aplicaciones ambientales y biomédicas, donde es fundamental realizar un monitoreo preciso de los niveles de H₂O₂, minimizando el efecto de interferencias provenientes de otros compuestos presentes en las muestras.

5.3.3 Efecto de velocidad de barrido sobre el electrodo modificado con PMP y su respuesta bioelectrocatalítica hacia el H₂O₂

El estudio de la velocidad de barrido en experimentos de voltametría cíclica es fundamental para comprender los mecanismos de transferencia de electrones en reacciones de reducción de H₂O₂. Este análisis permite evaluar cómo la cinética de la reacción es influenciada por la velocidad con la que se aplica el potencial eléctrico, proporcionando información clave sobre la naturaleza reversible o irreversible del proceso, así como sobre la adsorción y desorción de las especies electroactivas en la superficie del electrodo. Además, la relación entre la corriente pico y la velocidad de barrido ayuda a diferenciar procesos controlados por difusión de aquellos dependientes de la cinética superficial. Estos datos son esenciales para optimizar los sensores electroquímicos destinados a la detección de H₂O₂ (Bard & Faulkner, 2001; J. Wang, 2006).

Para determinar las condiciones óptimas de velocidad de barrido para la detección de H₂O₂, se evaluó su influencia en las curvas de VCs dentro de un rango de 50 a 500 mV.s⁻¹, con incrementos de 50 mV.s⁻¹ entre cada medición, como se muestra en la Figura 26. Los datos de corriente y voltaje obtenidos para los electrodos a diferentes velocidades de barrido, presentados en la Tabla 12, revelan que un aumento en la velocidad genera una mayor separación entre los picos y una reducción en la relación I_{pc}/I_{pa} lo que sugiere un impacto significativo de este parámetro en la respuesta electroquímica.

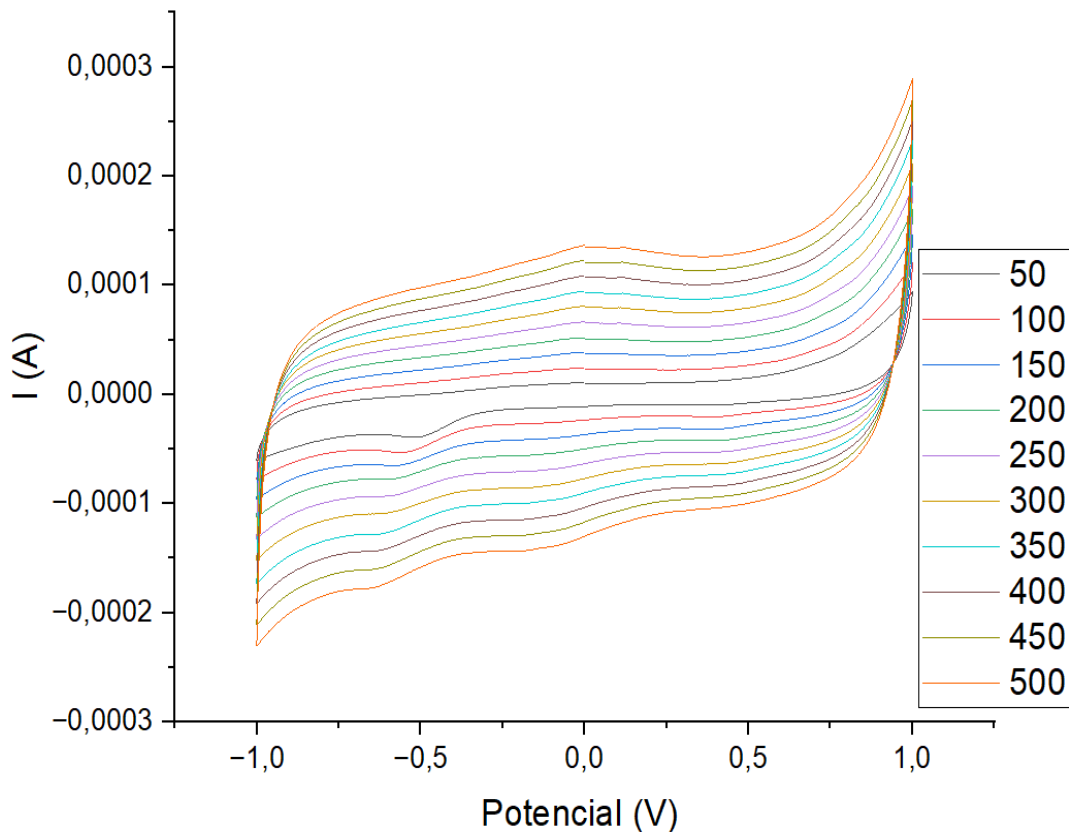
Esto ocurre ya que a medida que la velocidad de barrido aumenta, la capa de difusión cercana al electrodo se reduce limitando el transporte de masa de analitos a hacia la superficie del electrodo generando como consecuencia:

- La separación entre los picos anódicos y catódicos aumenta, como se evidencia en los valores crecientes de ΔE_p que se mueve de 521 mV a 656 mV a medida que la velocidad de barrido aumenta de 50 a 450 mV.s⁻¹.
- La relación entre las corrientes de pico disminuye gradualmente desde 3.69 hasta 1.31 en el mismo rango de velocidades, lo que refleja una mayor influencia cinética debido a la menor participación del transporte de masa.

Todo lo anterior sugiere que, al usar PGE modificados con PMP para la detección de H₂O₂, las velocidades de barrido pueden ajustarse según los objetivos del análisis. Velocidades de barrido más bajas suelen ofrecer una mejor definición de los picos y una relación I_{pc}/I_{pa} más alta, lo que indica un equilibrio favorable entre el transporte de masa y la transferencia de carga. Sin embargo, en ciertos casos, trabajar en velocidades de barrido más altas han resultado útiles para optimizar la sensibilidad en análisis rápidos como los reportados en algunos estudios (Castro et al., 2020; Rubio, 2014).

Figura 26

Voltamperograma cíclico a diferentes velocidades de barrido en solución 1mM de H₂O₂



La relación entre I_{pc} e I_{pa} con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($V^{1/2}$) proporciona información sobre el comportamiento de un sistema electroquímico. Pero que gracias a la ecuación de Randles-Sevcik, en un sistema reversible controlado por difusión, la corriente del pico (I_p) es directamente proporcional a $V^{1/2}$, indicando que a medida que aumenta la velocidad de barrido, la corriente de pico también aumenta debido a mayor rapidez con la que los iones son transportados hacia la superficie del electrodo(Chesney, 1996).

$$I_p = (2.69 \times 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2} \quad (6)$$

Donde I_p es la corriente del pico (catódico o anódico), n es el número de electrones transferido mediante la reacción redox, A es el área del electro (cm^2), D es el coeficiente de difusión del analito (cm^2/s), C es la concentración del analito en solución (mol/cm^3), y v es la velocidad de barrido (V/s). Esta es la ecuación de Randles-Sevcik para sistemas reversibles, según esta ecuación, la relación es lineal, tanto en sistemas reversibles como en irreversibles permitiendo evaluar parámetros importantes del sistema (González-Meza et al., 2019).

Tabla 12

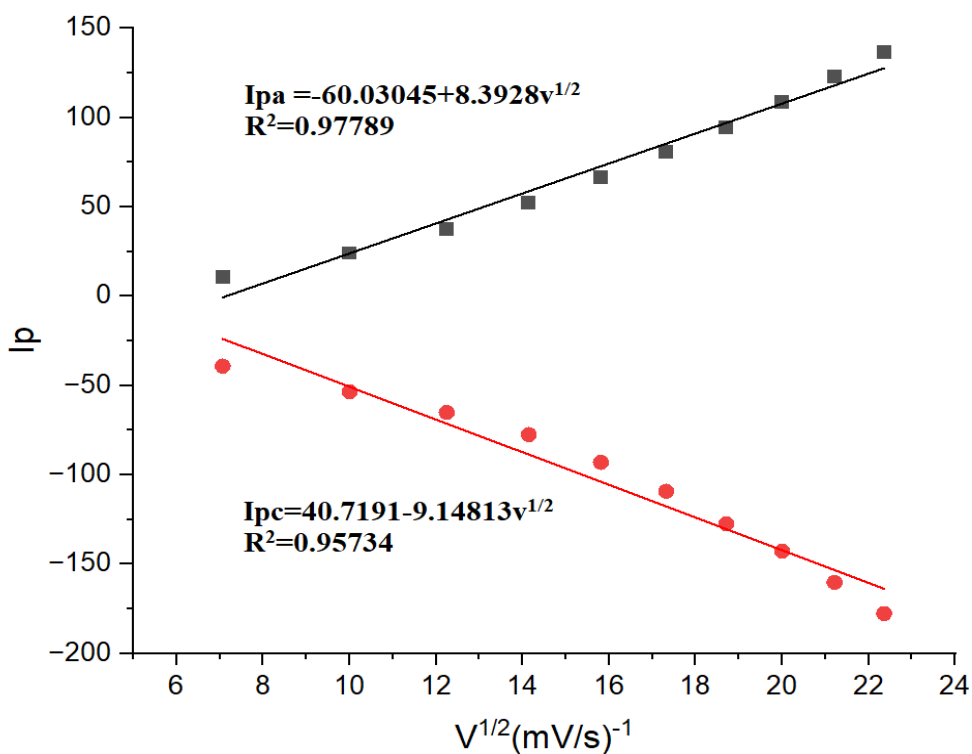
Valores de corriente y voltajes de los picos del VC a diferentes velocidades de barrido

Velocidad [mVs ⁻¹]	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	I_{pa} [μA]	I_{pc} [μA]	ΔEP [mV]	I_{pc}/I_{pa}
50	-1.20	-522	10.6	-39.3	521	3.69
100	-2.40	-539	20.4	-52.5	537	2.57
150	-6.80	-563	38.3	-64.3	556	1.68
200	-9.70	-595	50.0	-77.2	585	1.43
250	-9.90	-603	66.3	-93.4	593	1.41
300	-12.1	-627	80.7	-109	615	1.36
350	-13.4	-642	94.4	-128	629	1.36
400	-13.8	-651	108	-137	637	1.27
450	-14.3	-666	122	-169	652	1.38
500	-15	-671	136	-178	656	1.31

Al linealizar la gráfica de I_{pc}/I_{pa} vs $V^{1/2}$, como se observa en la figura 27, obtuvo que la ecuación de la línea recta para el proceso anódico es $I_{pa}= 60.03+8.39V^{1/2}$ con R^2 de 0.97789, y para el proceso catódico $I_{pc}=40.71-9.15V^{1/2}$ con un R^2 de 0.95734. Estos altos valores de R^2 sugieren una fuerte relación entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, lo cual es característico de un sistema dominado por la difusión. Además, se observa que no existe una tendencia lineal característica de procesos reversibles e irreversibles, permitiendo confirmar que la reducción del H₂O₂ mediado por la PMP sobre la SPGE es un proceso quasi-reversible tal como lo había demostrado la Figura 19.

Figura 27

Intensidad de corrientes entre los picos anódicos y catódicos en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido



6. Conclusiones

El proceso de purificación después de la extracción de la peroxidasa en la mimosa pudica demostró ser eficaz para aumentar su concentración, aumentando su actividad específica y volumétrica a medida que avanzaban las etapas. En la etapa de extracción la actividad volumétrica fue de 2.03 U/mL y la actividad específica alcanzó 0.621 U/mg con un rendimiento del 100%. Comparada con la última etapa de purificación, ultrafiltración, se alcanzaron valores de 4.16 U/mL y 9.36 U/mg, con un rendimiento del 204% y un factor de purificación de 15. Sin embargo, la actividad disminuyó de 0.178 U a 0.137 U tras la ultrafiltración, esto debido a una pérdida parcial de enzima en esta última etapa. Destaca la efectividad del reparto bifásico y la ultrafiltración como método complementario para obtener una enzima altamente purificada. La PMP demostró estabilidad óptima a pH 4, conservando el 100% de su actividad, mientras que en medios básicos su actividad disminuyó notablemente. En cuanto a la temperatura, mantuvo el 80% de su actividad inicial hasta 50 °C, pero se desnaturizó rápidamente a temperaturas superiores, con una constante de inactivación térmica de 0.178 min⁻¹ a 55 °C. Estos resultados destacan la eficacia del proceso de purificación y la idoneidad de la PMP para aplicaciones en medios ácidos y temperaturas moderadas.

Los electrodos modificados con PMP ultrafiltrada presentaron un potencial catódico de -0.535 V y una relación I_{pc}/I_{pa} de 8.32 cuando fueron utilizados con PBS para verificar su absorbancia 8.32, evidenciando una alta eficiencia en la transferencia de electrones. A baja velocidades de barrido, se obtiene separaciones de picos de 521 (50 mV/s) y una relación de 3.69, ideal para maximizar la sensibilidad en la detección de H₂O₂. Los electrodos modificados con PMP ultrafiltrada mostraron un potencial catódico para la reducción de H₂O₂ de -0.535 V, más positivo que los reportados para otras peroxidases como la HRP (-0.6 V) o la Microperoxidasa-11 (-0.3 V).

Esto indica una mayor eficiencia catalítica y menor sobrepotencial, lo que reduce el ruido de fondo y mejora la precisión de las mediciones y mostraron alta especificidad hacia el H₂O₂ incluso en presencia de interferencias como etanol, glucosa y ácido cítrico. La linealidad observada en la curva de calibración ($R^2=0.967$) confirma la capacidad del sistema para detectar concentraciones de H₂O₂ de manera precisa y cuantitativa.

Gracias a todo lo anterior es correcto afirmar que los electrodos modificados con PMP son candidatos valiosos para aplicaciones en diversas industrias gracias a su alta sensibilidad y selectividad.

7. Recomendaciones

- Como quedo demostrado a mayor grado de pureza se obtiene mejores valores para la actividad enzimática en general, por lo tanto, recomendaría seguir purificando la enzima con más procedimientos como pueden ser: Cromatografía de intercambio iónico, Cromatografía de afinidad, Diálisis, etc.
- Ampliar el estudio de especificidad electrocatalítica con más compuestos potencialmente interferentes presentes en matrices reales, como metales pesados o proteínas, para validar la especificidad del sistema.

Referencias

- Acosta, M., Rodríguez-López, J., & Pedreño, M. A. (2002). *Plant peroxidases biochemistry and physiology*.
https://www.google.com.co/books/edition/Plant_peroxidases_biochemistry_and_physi/2qpQTxjNVV0C?hl=es-419&gbpv=1&dq=Plant+Peroxidases:+Biochemistry+and+Physiology.+EDITUM.+Recupero+de+http&printsec=frontcover
- Alexander, J., Rivera, C., Estrella, L., Duarte, B., & Narváez Cuenca, C. E. (2006). *CATALASA, PEROXIDASA Y POLIFENOLOXIDASA DE PITAYA AMARILLA (Acanthocereus pitajaya) CATALASE, PEROXIDASE AND POLYPHENOLOXIDASE FROM PITAYA AMARILLA FRUITS (Acanthocereus pitajaya)*.
- Alneyadi, A. H., Rauf, M. A., & Ashraf, S. S. (2018). Oxidoreductases for the remediation of organic pollutants in water - a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(7), 971–988. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1423275>
- Andrade, G., Alcántara, H., González, M., Silva, R., & Vilchis Landeros, L. (2021). *Purificación de proteínas*. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Antonio, J. (2022). *Inmovilización de la enzima microperoxidasa-II (MP II) sobre electrodos de grafito-epoxi (GE) modificados con nanotubos de carbono(CNT) para su uso potencial en biosensores*.
- ARONACA, H., & TURPO, R. (2022). *EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE PEROXIDASA (POD) EN EL CONFITADO DE MASHUA (Tropaeolum tuberosum) VARIEDAD (kello año)*. www.ciedperu.org

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*. www.elsevier.com/locate/enzmictec

Bagoëtiskiaï, V. S. . (2006). *Fundamentals of electrochemistry*. Wiley-Interscience.

Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*.

In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2nd ed.). Wiley.

<https://www.wiley.com/en->

[kr/Electrochemical+Methods%3A+Fundamentals+and+Applications%2C+2nd+Edition-p-9780471043720](https://www.wiley.com/en-kr/Electrochemical+Methods%3A+Fundamentals+and+Applications%2C+2nd+Edition-p-9780471043720)

Benavides, J., & Rito-Palomares, M. (2008). APLICACIÓN GENÉRICA DE SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS POLIETILÉNGLICOL-SAL PARA EL DESARROLLO DE PROCESOS DE RECUPERACIÓN PRIMARIA DE COMPUESTOS BIOLÓGICOS
GENERIC APPLICATION OF POLYETHYLENE GLYCOL-SALT AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS FOR THE DEVELOPMENT OF PROCESSES TO BIOLOGICAL PRODUCTS PRIMARY RECOVERY. In *Revista Mexicana de Ingeniería Química* (Vol. 7, Issue 2).

Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2010). *Biochemistry*. *W. H. Freeman*, 2.

Caicedo, O., Higuera, B., & Martínez, S. (2009). *INDUCCIÓN DE ACTIVIDAD PEROXIDASA Y DE FENOLES TOTALES COMO RESPUESTA DEL FRUTO DE LULO (SOLANUM QUITOENSE L.) AL PATÓGENO CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS*.

Carretero, C. (2017). Purificación y caracterización de la peroxidasa de las semillas de cáñamo (*Cannabis sativa* L.). *Universidad de Valladolid. Facultad de Ciencias*.

- Castillo, J., Guarín-Guio, P. A., & Ortiz, L. (2022). Bio-Electrocatalytic Reduction of Hydrogen Peroxide by Peroxidase from Guinea Grass (*Panicum Maximum*) Immobilized on Graphene and Graphene Oxide Screen-Printed Electrodes^a. *Ingeniería y Universidad*, 26. <https://doi.org/10.11144/javeriana.iued26.brhp>
- Castro, J. A., Ernesto, J., & Cadre, V. (2020). *Estudio de parámetros instrumentales para el desarrollo de la voltamperometría de barrido manual*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17854.87367>
- 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/10.1016/j.bioelechem.2017.03.005>
- Cerón, A. F., Mejía, D. F., & Osorio, O. (2016). Cinética de Inactivación Térmica de la Enzima Pectinmetilesterasa en Zumo de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum Cav.*). *Información Tecnológica*, 27(2), 67–76. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000200009>
- Cheraghi, S., Taher, M. A., Karimi-Maleh, H., Karimi, F., Shabani-Nooshabadi, M., Alizadeh, M., Al-Othman, A., Erk, N., Yegya Raman, P. K., & Karaman, C. (2022). Novel enzymatic graphene oxide based biosensor for the detection of glutathione in biological body fluids. *Chemosphere*, 287, 132187. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.132187>
- Chesney, D. J. (1996). Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2nd Edition Edited by Peter T. Kissinger and William R. Heineman. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 118, Issue 44). American Chemical Society. <https://www.routledge.com/Laboratory-Techniques-in-Electroanalytical-Chemistry-Revised-and-Expanded/Kissinger-Kissinger-Heineman-Heineman/p/book/9780824794453>

- Cho, I. H., Kim, D. H., & Park, S. (2020). Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. In *Biomaterials Research* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0181-y>
- Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29–45. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1962.TB13623.X>
- Contreras, X. (2016). *ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE GRAFENO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PASTO GUINEA (Panicum maximum) PARA LA DETECCIÓN ENZIMÁTICA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.*
- Copeland, R. A. (2000). *ENZYMES A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis SECOND EDITION.*
- Cuervo, D., Martinez, S., Ardila, H., & Higuera, B. (2009). DIFFERENTIAL INDUCTION OF PEROXIDASE ENZYME AND ITS RELATIONSHIP WITH LIGNIFICATION IN CARNATION DEFENSE (*Dianthus caryophyllus* L.) MECHANISM AGAINST *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *REVISTA COLOMBIANA DE QUÍMICA.*
- De Sequeira, C., Li, X., Wang, L., Wang, B., Zhang, S., Jiang, M., Fu, W., & Sun, W. (2022). Preparation and Application of Electrochemical Horseradish Peroxidase Sensor Based on a Black Phosphorene and Single-Walled Carbon Nanotubes Nanocomposite. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules27228064>
- 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. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1028691>

- Electrodos Serigrafiados Modificados (SIPE) | MicruX.* (n.d.). Venta de ElectrodoS Serigrafiados Modificados. Retrieved January 20, 2025, from https://www.micruXfluidic.com/es/soluciones-electroquimicas/sensores-electroquimicos-thick-film/electrodos-serigrafiados-modificados-sipe/?utm_source=chatgpt.com
- 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/SUPPL_FILE/ED7B00361_SI_002.DOCX
- 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>
- Everse, J., Everse, K. E., & Grisham, M. (1990). *Peroxidases in chemistry and biology*.
- Evtugyn, G. (2014). *Biosensors: Essentials* (Vol. 84). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40241-8>
- 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/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.130306>
- Galende, P. P. (2016). *Nuevas peroxidasas de origen vegetal: aislamiento, caracterización y aplicaciones Tesis Doctoral*.

- Gao, H., Yu, H., Yang, S., Chai, F., Wu, H., & Tian, M. (2024). Ultrasensitive detection of H₂O₂ via electrochemical sensor by graphene synergized with MOF-on-MOF nanozymes. *Microchimica Acta*, *191*(8), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S00604-024-06541-8>/METRICS
- Geleta, G. S. (2024). Recent advances in electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers and nanomaterials for detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid: A review. *Sensing and Bio-Sensing Research*, *43*, 100610. <https://doi.org/10.1016/J.SBSR.2023.100610>
- González-Meza, O. A., Larios-Durán, E. R., Gutiérrez-Becerra, A., Casillas, N., Escalante, J. I., & Bárcena-Soto, M. (2019). Development of a Randles-Ševčík-like equation to predict the peak current of cyclic voltammetry for solid metal hexacyanoferrates. *Journal of Solid State Electrochemistry*, *23*(11), 3123–3133. <https://doi.org/10.1007/s10008-019-04410-6>
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *8*(3), 1400. <https://doi.org/10.3390/S80314000>
- Gutiérrez, O. (2015). *Sensor enzimático de papel*.
- HALPIN, B., PRESSEY, R., JEN, J., & MONDY, N. (1989). Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). *Journal of Food Science*, *54*(3), 644–649. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1989.TB04672.X>
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., & Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*, *10*(1), 108–115. <https://doi.org/10.1110/ps.37301>

Higuera, O., & Trisancho, J. (2006). *ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE LA REDUCCIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE ALEACIONES UTILIZADAS EN LA INDUSTRIA JOYERA*.

Illanes, A. (1999). STABILITY OF BIOCATALYSTS. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2(1), nd-nd. <https://doi.org/10.4067/S0717-34581999000100001>

Kalin, R., Atasever, A., & Özdemir, H. (2014). Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots. *Food Chemistry*, 150, 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.125>

Kalsoom, U., Bhatti, H. N., & Asgher, M. (2015). Characterization of Plant Peroxidases and Their Potential for Degradation of Dyes: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6), 1529–1550. <https://doi.org/10.1007/S12010-015-1674-3/METRICS>

Lavery, C. B., MacInnis, M. C., MacDonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., Irwin, D. J. G., & DöCunha, 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>

Mandal, A. K., Pandey, A., Sah, R. K., Baral, A., & Sah, P. (2022). In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Potency of *Mimosa pudica* of Nepalese Terai Region: Insight into L-Mimosine as an Antibacterial Agent. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6790314>

Martinez, C. M., & Alvarez, L. H. (2018). Application of redox mediators in bioelectrochemical systems. *Biotechnology Advances*, 36(5), 1412–1423. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.05.005>

- Matheus, P. R., Abad, J. M., & Fernández, V. M. (2007). Modification of gold surfaces for the oriented immobilization of recombinant form of horseradish peroxidase. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 3. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702007000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Meier, J., Hofferber, E., Stapleton, J. A., & Iverson, N. M. (2019). Hydrogen Peroxide Sensors for Biomedical Applications. *Chemosensors 2019*, Vol. 7, Page 64, 7(4), 64. <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS7040064>
- Mendoza, R., & Herrera, A. O. (2012). Cinética de Inactivación de la Enzima Peroxidasa, Color y Textura en Papa Criolla (*Solanum tuberosum* Grupo phureja) sometida a tres Condiciones de Escaldado. *Informacion Tecnologica*, 23(4), 73–82. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642012000400009>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition*.
- Neumann, B., & Wollenberger, U. (2020). Electrochemical biosensors employing natural and artificial heme peroxidases on semiconductors. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 20, Issue 13, pp. 1–24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s20133692>
- Paimard, G., Ghasali, E., & Baeza, M. (2023). Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. In *Chemosensors* (Vol. 11, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/chemosensors11020113>
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Margis-Pinheiro, M., Ioannidis, V., Penel, C., Falquet, L., & Dunand, C. (2007). PeroxiBase: The peroxidase

database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605–1611.

<https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2007.04.005>

Pérez, G., Madai, E., Urbina, C., & Laura, A. (2010). ELECTRODOS SERIGRAFIADOS EN EL EMPLEO DE GENOSENSORES. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*.

https://www.researchgate.net/publication/267220086_ELECTRODOS_SERIGRAFIADOS_EN_EL_EMPLEO_DE_GENOSENSORES

Pérez-Cordoves, A., Balbin-Tamayo, A., Mardini, P., & Costa, J. (2016). Estudio de la electropolimerización de polipirrol en presencia de un ácido quiral. *Rev. Cubana Quím.*

Regalado, C., García-Almendárez, B. E., & Duarte-Vázquez, M. A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Reviews*, 3(1–2), 243–256.

<https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047797.81958.69/METRICS>

Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A., & Martínez, M. J. A. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73(2), 202–219.

<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2007.03.050>

Rito-Palomares Marco, & Benavides Jorge. (2017). *Aqueous two-phase systems for bioprocess development for the recovery of biological products (Vol. 1)*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59309-8>

Rodríguez Cabrera Norma Azucena. (2011). *EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PEROXIDASA RECOMBINANTE DE NABO (Brassica napus) EN UN SISTEMA BACTERIANO*. <https://ri-ng.uaq.mx/xmlui/handle/123456789/555>

Rubio, L. S. (2014). *Development and Application of New Copper-Chloride Electrolytes in Redox Flow Battery Systems*.

- Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L., & Marko-Vargab, G. (1996). Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 330).
- Sakharov, I. Y., Ardila, G. B., Sakharova, I. V, Rojas, A., & Pletjuschkinca, O. Y. (1999). *PEROXIDASA DE PLANTAS TROPICALES* (Vol. 28).
- Sánchez Calvo, A. (2014). *ESTUDIO DE DISTINTOS TRANSDUCTORES GRAFÉNICOS EN ELECTRODOS SERIGRAFIADOS*".
- Saud Al-Bagmi, M., Shahnawaz Khan, M., Alhasan Ismael, M., Al-Senaigy, A. M., Ben Bacha, A., Mabood Husain, F., & Alamery, S. F. (2018). An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 301. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2018.04.002>
- Shadman, S. M., Daneshi, M., Shafiei, F., Azimimehr, M., Khorasgani, M. R., Sadeghian, M., Motaghi, H., & Mehrgardi, M. A. (2019). Aptamer-based electrochemical biosensors. *Electrochemical Biosensors*, 213–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00008-5>
- Shannon, L. M., Kay, E., & Lew, J. Y. (1966). Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *Journal of Biological Chemistry*, 241(9), 2166–2172. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)96680-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)96680-9)
- Shin, J. H., Lee, M. J., Choi, J. H., Song, J. ae, Kim, T. H., & Oh, B. K. (2020). Electrochemical H₂O₂ biosensor based on horseradish peroxidase encapsulated protein nanoparticles with reduced graphene oxide-modified gold electrode. *Nano Convergence*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40580-020-00249-0>
- Song, Y. S., Muthuraman, G., Chen, Y. Z., Lin, C. C., & Zen, J. M. (2006). Screen printed carbon electrode modified with poly(L-lactide) stabilized gold nanoparticles for sensitive as(III) detection. *Electroanalysis*, 18(18), 1763–1770. <https://doi.org/10.1002/ELAN.200603634>

- Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R., & Damborsky, J. (2013). Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *ACS Catalysis*, 3(12), 2823–2836. https://doi.org/10.1021/CS400684X/SUPPL_FILE/CS400684X_SI_001.PDF
- Su, T., Shao, Q., Wang, P., & Ma, C. (2016). Oxidative Stress and its Role in Peroxisome Homeostasis in Plants. *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*, 117–136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44081-1_6
- Thamilselvan, A., Dang, T. V., & Kim, M. Il. (2023). Highly Conductive Peroxidase-like Ce-MoS₂ Nanoflowers for the Simultaneous Electrochemical Detection of Dopamine and Epinephrine. *Biosensors*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/bios13121015>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Timberlake, K. C. ., & Timberlake, William. (2008). *Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida*. Benjamin Cummings.
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N., & Kim, K. S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57(4), 724–803. <https://doi.org/10.1016/J.PMATSCI.2011.08.003>
- Tominaga, T. (2017). Enhanced sensitivity of lateral-flow test strip immunoassays using colloidal palladium nanoparticles and horseradish peroxidase. *LWT*, 86, 566–570. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.08.027>

- Trifan, A. G., & Apetrei, I. M. (2023). Development of Novel Electrochemical Biosensors Based on Horseradish Peroxidase for the Detection of Caffeic Acid. *Applied Sciences (Switzerland)*, *13*(4). <https://doi.org/10.3390/app13042526>
- Urlacher, V. (2010). Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology. By H. Brian Dunford. *ChemBioChem*, *11*(12), 1782–1783. <https://doi.org/10.1002/CBIC.200000397>
- Vargas, J. (2016). *DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA LA DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO UTILIZANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE ORO MODIFICADOS CON PEROXIDASA DE PALMA REAL (Roystonea regia) Y NANOTUBOS DE PÉPTIDOS.*
- Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry, Third Edition. *Analytical Electrochemistry, Third Edition*, 1–250. <https://doi.org/10.1002/0471790303>
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, *108*(2), 814–825. https://doi.org/10.1021/CR068123A/ASSET/CR068123A.FP.PNG_V03
- Wang, J., Xu, S., Du, H., Lv, J., He, W., Yin, S., Wang, Q., & Wang, L. (2023). Enhanced electrochemical properties of graphene-based screen-printed carbon electrode by PPy modification: Experimental and DFT investigations. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *934*, 117300. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2023.117300>
- Wang, Q., Xue, R., Guo, H., Wei, Y., & Yang, W. (2018). A facile horseradish peroxidase electrochemical biosensor with surface molecular imprinting based on polyaniline nanotubes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *817*, 184–194. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2018.04.013>

- Wongkaew, N., Simsek, M., Griesche, C., & Baeumner, A. J. (2019). Functional Nanomaterials and Nanostructures Enhancing Electrochemical Biosensors and Lab-on-a-Chip Performances: Recent Progress, Applications, and Future Perspective. *Chemical Reviews*, *119*(1), 120–194. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.8B00172>
- Xing, L., Zhang, W., Fu, L., Lorenzo, J. M., & Hao, Y. (2022). Fabrication and application of electrochemical sensor for analyzing hydrogen peroxide in food system and biological samples. *Food Chemistry*, *385*, 132555. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132555>
- Zámocký, M., Janeček, Š., & Obinger, C. (2017). Fungal Hybrid B heme peroxidases - Unique fusions of a heme peroxidase domain with a carbohydrate-binding domain. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09581-8>
- Zoski, C. G. (2007). Handbook of Electrochemistry. *Handbook of Electrochemistry*, 1–892. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51958-0.X5000-9>