

Estudio de la actividad bio-electroquímica de la peroxidasa de batata (*Ipomoea batatas*) inmovilizada sobre electrodos de óxido de grafeno.

Miguel Ángel Vega León

Director

Doctor en Química, John Jairo Castillo León

Codirector

Doctor en Química, Herminul de Jesús Cano Calle

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela De Química

Bucaramanga

2025

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres por apoyarme en todos los sentidos durante mi etapa educativa. Sin ellos, nada de esto hubiera sido posible. En especial, agradezco a mi mamá por estar siempre pendiente de mí y por tener una solución a cualquier problema.

A Jonathan, por sus consejos y su ayuda durante toda la carrera. También agradezco a mis hermanas por siempre estar ahí y ser un apoyo incondicional, y a mis mascotas, Noah y Lupita, por ser un apoyo emocional.

A mi pareja Yelcy González por estar ahí en los momentos buenos y malos apoyándome en todo y dándome consejos para mejorar día a día como persona y como profesional.

A mis compañeros de la carrera, Juan José Blanco, Sebastián Quintero y Duván Ramírez, quienes ayudaron a que la carrera fuera un poco más amena.

Al grupo de investigación GIBIM por ser tan abiertos a ayudar cuando se necesitó y por permitirme pertenecer al grupo; al profesor John Castillo y al profesor Herminsul por su guía en la realización de este proyecto, lo cual me permitió crecer como profesional. Finalmente, agradezco a la Universidad Industrial de Santander por permitirme formar parte de ella y ser parte de la comunidad UIS.

Tabla de contenido

Introducción	11
1. Marco de Referencia	13
2. Marco teórico	15
2.1. Enzimas	15
2.2. Oxidorreductasas	17
Tipos comunes de oxidorreductasas:	18
2.3. Peroxidasas	18
2.3.1. Fuentes de peroxidasa	20
2.3.2. Clases de peroxidasas	21
2.3.3. Determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa	23
2.3.4. Inactivación y regeneración parcial de la peroxidasa	25
2.3.5. propiedades catalíticas de la peroxidasa	26
2.3.6. Propiedades moleculares	27
2.3.6.1. Efecto del pH sobre la actividad de las peroxidasas	27
2.3.6.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las peroxidasas	28
2.3.6.3. Estabilidad de las peroxidasas frente a la temperatura y el pH	28
2.3.7. peroxidasa de la batata (Ipomoea batatas)	29
2.4. Inmovilización de enzimas	31
2.4.1. Modos de inmovilización	32
2.5. Técnicas electroquímicas.	33
2.5.1. Cronoamperometría	33

2.5.2.	Voltamperometría cíclica (CV)	34
2.6.	Biosensor	35
2.6.1.	Biosensores amperométricos	36
2.6.2.	Biosensores catalíticos.....	37
2.7.	Electrodos serigrafiados	37
3.	Metodología	38
3.1.	Reactivos	38
3.2.	Extracción de la peroxidasa.....	38
3.3.	Semipurificación y precipitación de proteínas	39
3.4.	Medición de la actividad enzimática de la peroxidasa	39
3.5.	Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes pH	40
3.6.	Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes temperaturas	40
3.7.	Inmovilización de la peroxidasa en electrodos serigrafiados de carbono modificados con óxido de grafeno.....	40
4.	Análisis y resultados.....	41
4.1.	Extracción y semi-purificación de la peroxidasa de batata	41
	Modificación de los electrodos mediante técnicas electroquímicas.....	50
5.	Conclusiones	65
6.	Recomendaciones.....	66
	Referencias	68

Lista de Figuras

Figura 1. Enzima con sustrato (azul) unido al centro activo (hueco) con un aminoácido (rojo)..	16
Figura 2. Oxidación de guayacol en presencia de peroxidasa	24
Figura 3. Fotografía batata.....	29
Figura 4. Tipos de crecimiento de la batata	30
Figura 5. Voltamperograma clásico de un sistema reversible	34
Figura 6. Representación esquemática de un biosensor.....	35
Figura 7. Sensor amperométrico	36
Figura 8. Actividad enzimática relativa de la PCB a diferentes pH	42
Figura 9. Etapas de obtención del extracto semi-purificado (A) cáscara de la batata extraída, (B) montaje del shaker,(C) reparto bifásico, (D) material particulado y restos de cáscara separados como fase sólida en centrifugación.....	43
Figura 10. Actividad enzimática del extracto de batata a diferentes pH	45
Figura 11. Actividad relativa de la PCB a diferentes temperaturas	47
Figura 12. Actividad relativa de la PCB en función del tiempo	48
Figura 13. Cinética de inactivación térmica de la PCB	49
Figura 14. Modificación de los ESOG con PCB	50
Figura 15. Voltamperogramas cíclicos del ESOG modificado con PCB luego de reparto bifásico (negro), ESOG modificado con PCB puro (rojo) y el ESOG solamente con buffer de extracción (azul) medidos a 100mVs-1	52
Figura 16. Voltamperogramas cíclicos de PCB/ESOG-RB y ESOG en presencia (morado) y ausencia (naranja) PCB.....	54
Figura 17. Voltamperograma cíclico de ESOG y PCB/ESOG-RB en presencia de (K ₃ [Fe	

(CN)₆) 10mM con KCl 0.1 M a una velocidad de barrido de 50 mVs⁻¹ 55

Figura 18. Voltamperograma cíclico de PCB/ESOG a diferentes velocidades de barrido

(50,100,150,200,250,300,350,400,500,600 mV s⁻¹) en solución buffer fosfato 10 mM a pH 7.8 ..

..... 57

Figura 19. Voltamperograma cíclico de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido frente a las

corrientes catódicas y anódicas..... 58

Figura 20. Voltamperograma cíclico (A) diferentes concentraciones de H₂O₂ a velocidad de

barrido de 50mVs⁻¹ 62

Figura 21. Curva de calibración del PCB/ESOG a diferentes concentraciones de H₂O₂ 63

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación de enzimas	17
Tabla 2. Clasificación de las peroxidasas	23
Tabla 3. Condiciones de temperatura y pH óptimos en diferentes peroxidasas	29
Tabla 4. Etapas de purificación de la peroxidasa de batata	44
Tabla 5. Corrientes y voltajes de los VCs de los electrodos modificados	53
Tabla 6. Comparación de parámetros analíticos de electrodos modificados con peroxidasas	59
Tabla 7. Valores de corriente y voltajes de los picos del VC a diferentes velocidades de barrido.....	60

Glosario

Constante de inactivación (Kinact): es una medida que describe la velocidad a la que una enzima pierde su actividad catalítica.

Electrodo serigrafiado de óxido de grafeno (ESOG): es un dispositivo electroquímico que se fabrica utilizando la técnica de serigrafía. Este proceso implica imprimir una tinta o pasta que contiene óxido de grafeno sobre un sustrato, creando así un electrodo conductor con características mejoradas.

Peroxidasa de rábano picante (HRP): Es una enzima oxidorreductasa que cataliza reacciones de oxidación, utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como donante de electrones.

Reparto bifásico (RB): es una forma de distribuir energía eléctrica que utiliza dos fases y un neutro para alimentar equipos o cargas, en lugar de una sola fase como en un sistema monofásico.

Voltamperometría cíclica (CV): es una técnica electroquímica que se utiliza para estudiar las reacciones redox de especies químicas. Implica variar el potencial de un electrodo de trabajo de forma cíclica y medir la corriente resultante.

Resumen

Título: Estudio de la actividad bio-electroquímica de la peroxidasa de batata (*Ipomoea batatas*) inmovilizada sobre electrodos de óxido de grafeno*.

Autor: Miguel Ángel Vega León**

Palabras Clave: Peroxidasa, Electrodo, Batata, Actividad enzimática, Biosensor, Voltamperometría cíclica.

Descripción: La detección de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un tema de gran interés en la actualidad. Por ello, desarrollar métodos eficientes y sensibles resulta fundamental para diversos campos como la medicina, el medio ambiente, la biología, entre otros. En este trabajo se presenta un enfoque novedoso, en el que se utilizan electrodos serigrafiados de óxido de grafeno (ESOG), modificados con extracto de peroxidasa de cáscara de batata (PCB), para la detección electroquímica de H_2O_2 . Esta inmovilización favorece una transferencia de electrones eficiente, lo que se refleja en un aumento y mejora del desempeño electrocatalítico del sensor. Se determinó que la PCB presenta una actividad específica de 478 U/mg, una termoestabilidad a 60 °C, un pH óptimo de 8,0 y una constante de inactivación (K_{inact}) de $7,02 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Para caracterizar el desempeño electroquímico de los ESOG, se utilizó voltamperometría cíclica. Este sensor innovador, diseñado a partir de la incorporación de PCB en un electrodo de óxido de grafeno, representa una herramienta potencial para la detección electroquímica de H_2O_2 en muestras reales. En conclusión, este trabajo introduce una estrategia efectiva y versátil para la detección de H_2O_2 mediante el uso de PCB/ESOG, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de técnicas analíticas avanzadas aplicables en biología y otros campos.

* Trabajo de grado

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

Abstract

Title: Study of the Bio-Electrochemical activity of sweet potato peroxidase (*Ipomoea batatas*) immobilized on graphene oxide electrodes*

Author: Miguel Ángel Vega León**

Keywords: peroxidase, electrode, sweet potato, enzymatic activity, biosensor, cyclic voltammetry

Description: The detection of hydrogen peroxide (H_2O_2) is currently a topic of great interest. Therefore, developing efficient and sensitive methods is essential for various fields such as medicine, environmental science, biology, among others.

This work presents a novel approach that uses screen-printed graphene oxide electrodes (SPGOEs), modified with peroxidase extract from sweet potato peel (SPP), for the electrochemical detection of H_2O_2 . This immobilization promotes efficient electron transfer, which is reflected in an increase and overall improvement in the electrocatalytic performance of the sensor.

It was determined that the SPP exhibits a specific activity of 478 U/mg, thermal stability at 60 °C, an optimal pH of 8.0, and an inactivation constant (K_{inact}) of $7.02 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Cyclic voltammetry was used to characterize the electrochemical performance of the SPGOEs.

The SPP/SPGOE system showed a linear response in the concentration range of 250 μM to 5 mM, with a detection limit of 4.6 μM . This innovative sensor, designed by incorporating SPP into a graphene oxide electrode, represents a potential tool for the electrochemical detection of H_2O_2 in real samples. In conclusion, this study introduces an effective and versatile strategy for H_2O_2 detection using SPP/SPGOE, opening new possibilities for the development of advanced analytical techniques applicable in biology and other fields.

* Bachelor Thesis

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

Introducción

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de las reacciones hasta alcanzar un equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado, y actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos. Muchas enzimas no actúan de manera aislada, sino que se organizan en secuencias denominadas rutas metabólicas, y muchas de ellas tienen la capacidad de regular su actividad enzimática (Franklin, 2011).

Las enzimas pueden clasificarse según el tipo de reacción que catalizan. Por ejemplo, las oxidorreductasas conforman un grupo de enzimas que catalizan reacciones de oxidación y reducción en sistemas biológicos. Estas participan en el intercambio de electrones entre sustancias químicas, facilitando la transferencia electrónica entre los reactivos.

Las peroxidasas (POD) son enzimas que utilizan diversos peróxidos (ROOH) como aceptores de electrones para catalizar una variedad de reacciones oxidativas.

Estas proteínas se agrupan bajo una misma clasificación enzimática (EC 1.11.1.7 para la POD del grupo hemo), correspondiente a las oxidorreductasas que utilizan peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. Las POD catalizan la oxidación de una amplia gama de sustratos orgánicos e inorgánicos mediante peróxido de hidrógeno (Passardi et al., 2007).

Gracias a estas propiedades, las POD ocupan actualmente un lugar importante a nivel industrial, con aplicaciones en distintos sectores:

- En la industria cosmética, especialmente en la coloración capilar, se utiliza la polimerización oxidativa de precursores como fenoles o aminofenoles. Tradicionalmente se emplea peróxido de hidrógeno al 3%; sin embargo, su uso repetido puede dañar el cabello. Para lograr un proceso de oxidación más suave y eficiente, se han incorporado

enzimas como oxidasas y POD (Kawamura et al., 1989).

- En la industria de la pulpa y el papel, la deslignificación es un procedimiento clave para eliminar impurezas. En este proceso, la POD de lignina y la POD de manganeso desempeñan un papel crucial en la degradación enzimática de la lignina, ofreciendo una alternativa menos contaminante frente a métodos químicos tradicionales (Aehle, 2007).
- En el desarrollo de biosensores, se ha utilizado la técnica de inmovilización de la POD de rábano picante sobre la superficie de electrodos, con el objetivo de detectar compuestos como H₂O₂ y fenoles (Alpeeva et al., 2005).

El rábano picante (*Armoracia rusticana*) es la fuente vegetal de POD más utilizada actualmente en aplicaciones industriales. Sin embargo, su peroxidasa (HRP) presenta algunas limitaciones importantes, como la desnaturalización o pérdida de actividad biológica a temperaturas cercanas o superiores a 70 °C, y en rangos de pH menores a 3 o mayores a 9 (Castillo et al., 2022). Por ello, se vuelve necesario explorar fuentes alternativas de POD vegetal que ofrezcan mayor versatilidad y estabilidad frente a diferentes condiciones de pH y temperatura.

En este trabajo se empleó la peroxidasa de batata (PCB) como nueva fuente de POD vegetal, basándose en el estudio de (Sakharov et al., 1999), donde se reportó una alta actividad peroxidasa en batata (1800,0 U/g de raíz), solo superada por la del rábano silvestre (2600,0 U/g de raíz).

En la primera etapa de este estudio, se llevó a cabo la semipurificación de la enzima mediante el método descrito por (Leon et al., 2002), utilizando una extracción con tampón fosfato, seguida de la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, con el objetivo de aislar la enzima de interés.

En la segunda etapa, se realizaron estudios para determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura para el funcionamiento de la enzima. Finalmente, en la última fase, la PCB fue caracterizada electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica, evaluando su respuesta frente al peróxido de hidrógeno al ser inmovilizada sobre electrodos serigrafados de óxido de grafeno.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Medir la actividad bio-electroquímica la peroxidasa presente en la corteza de la batata (*Ipomea batatas*) para futuras aplicaciones en la construcción de biosensores electroquímicos.

1.2. Objetivos específicos

- Realizar una extracción a la corteza de la batata con el fin de obtener las proteínas y enzimas de interés a una concentración elevada
- Eliminar paso a paso las diferentes interferencias presentes en el extracto con el fin de purificar parcialmente la peroxidasa de la batata
- Variar algunas propiedades químicas (pH, temperatura) y adicionar diferentes sustratos para observar el comportamiento de la peroxidasa en la batata

2. Marco de Referencia

En un estudio realizado por (Villamizar, Ríos, Castillo, et al., 2016), se encontró que la POD de la palma real (*Roystonea regia*), inmovilizada en superficies de grafeno, ha demostrado ser un biocatalizador alternativo a la peroxidasa de rábano picante (HRP) disponible comercialmente. Asimismo, se observó que las plantas responden a las heridas activando sistemas de autodefensa para restaurar los tejidos dañados o protegerse del ataque de patógenos y herbívoros. Entre la gran cantidad de proteínas inducibles por heridas, se ha demostrado que

la POD se expresa en respuesta a daños mecánicos en varias especies vegetales como el tabaco (Lagrimini & Rothstein, 1987), la papa (Roberts et al., 1988), el fríjol azuki (Ishige et al., 1993), el arroz (Hiraga et al., 2000), el rábano picante (Kawaoka et al., 1994) y la batata (Kanazawa & Shichi, 1965).

En su artículo de revisión *A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases*, (Pandey et al., 2017) concluyen que las peroxidases vegetales, pertenecientes a la clase III, están implicadas en diversos procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, como el metabolismo de la pared celular, el crecimiento y la maduración de frutos, entre otros. Debido a sus amplias aplicaciones en áreas clave como la bioquímica clínica, la inmunología, la biotecnología y el medio ambiente, estas enzimas son consideradas de gran importancia industrial.

No obstante, algunas PODs vegetales disminuyen su actividad enzimática cuando se exponen a altas temperaturas. Por ejemplo, (Müftügil, 1985) realizó un experimento en el que se analizaron verduras frescas como repollo, puerro, zanahoria, espinaca, apio, calabaza, papas, cebollas y frijoles verdes, evaluando su actividad enzimática antes y después de someterlas a tratamientos térmicos (75, 85 y 95 °C) en medio acuoso (escaldado en agua caliente). Se observó una mayor inactivación en las temperaturas más altas; sin embargo, la POD presente en frijoles verdes, papas y calabaza no fue completamente inactivada incluso después de 30 minutos a 75 °C.

También se han reportado PODs provenientes de frutas, como en el caso de la fresa. La POD de esta fruta mostró su mayor actividad enzimática a 30 °C y pH 6.0, pero presentó baja estabilidad térmica. En los frutos de fresa se detectaron dos isoenzimas con masas moleculares de 58.1 y 65.5 kDa, y se observó que la actividad enzimática disminuía significativamente a

medida que el fruto maduraba (Civello et al., 1995).

Técnicas espectroscópicas como el dicroísmo circular, la calorimetría de barrido diferencial y la fluorescencia han sido empleadas para estudiar la estabilidad estructural y conformacional de la HRP (Chattopadhyay & Mazumdar, 2000).

Finalmente, en su trabajo sobre PODs de plantas tropicales, (Sakharov et al., 1999) evaluaron la actividad enzimática de diversos frutos, hojas y raíces tropicales. En el caso de la batata (*Ipomoea batatas*), se reportó una actividad de 1800.0 U/g de raíz, valor relativamente alto en comparación con otras especies estudiadas. Esta POD, además de su elevada actividad, mostró características prometedoras para realizar pruebas de especificidad sustrática y de estabilidad ante cambios de pH y temperatura. Por estas razones, fue seleccionada como objeto de estudio en el presente proyecto, en lugar de otras fuentes vegetales.

3. Marco teórico

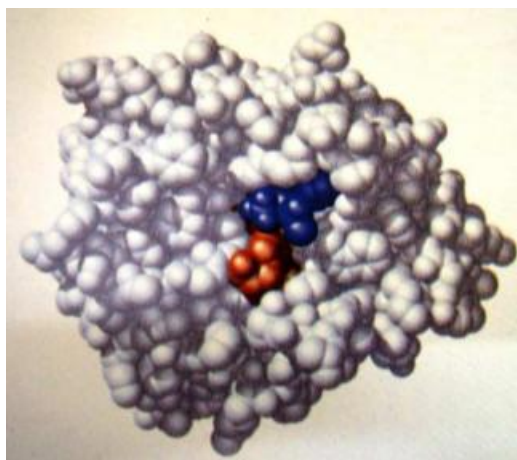
3.1. Enzimas

Las enzimas son proteínas que aumentan la velocidad de las reacciones hasta alcanzar el equilibrio, pertenecen al tipo de proteínas más numeroso y también catalizan reacciones químicas en seres vivos y sistemas biológicos. Las enzimas a menudo trabajan en conjunto en secuencias llamadas rutas metabólicas y pueden regular su actividad enzimática según sea necesario.

Las enzimas tienen forma globular y están formadas por cadenas polipeptídicas plegadas, allí se crea una especie de espacio o hueco denominado centro activo donde se encuentran involucrados algunos aminoácidos, en el centro activo se encajan los sustratos para llevar a cabo las reacciones (Franklin, 2011).

Figura 1.

Enzima con sustrato (azul) unido al centro activo (hueco) con un aminoácido (rojo)



Nota. Adaptado de (Franklin, 2011)

Las enzimas a pesar de funcionar como catalizadoras de reacciones tienen ciertas diferencias con otros catalizadores químicos, como lo son:

- Aumento en las velocidades de reacción, la velocidad de las reacciones que son catalizadas por las enzimas se multiplica de 10^6 a 10^{12} veces con respecto a las mismas reacciones que no son catalizadas por ellas, y sus órdenes de magnitud son superiores a los órdenes de las reacciones catalizadas por medios químicos.
- Requieren condiciones más moderadas para llevar a cabo las reacciones, las condiciones que se requieren para que una enzima catalice una reacción son relativamente normales: temperaturas por debajo de 100°C , presión atmosférica y pH casi neutros. Por el contrario, las reacciones catalizadas en medios químicos requieren presión y temperatura elevadas y también pH extremos.
- Especificidad sustrática más elevada, las enzimas muestran una amplia especificidad en relación con los tipos de sustratos y productos que pueden aceptar, en contraste con los catalizadores químicos. Esto significa que las reacciones enzimáticas generalmente

producen pocos o ningún producto secundario.

- Regulación, las actividades catalíticas de numerosas enzimas pueden cambiar según las concentraciones de sustancias diferentes a sus sustratos y productos. Estos procesos reguladores incluyen el control alostérico, modificaciones covalentes en las enzimas y ajustes en la cantidad de enzimas producidas. (Voet & Voet, 2006)

A continuación, en la tabla 1 se puede observar la clasificación de las enzimas, el tipo de reacción que catalizan y algunos ejemplos de ellas.

Tabla 1.

Clasificación de enzimas.

<i>Clase</i>	Tipo de reacción	Ejemplo
<i>Oxidorreductasas</i>	Oxidación - reducción	Peroxidasas, Deshidrogenasas, Oxidasas
<i>Hidrolasas</i>	Hidrolisis	Oxaloacetasas, Fosfoamidasas, Agarasas
<i>Isomerasas</i>	Isomerización	UDP- glucosa, Triosa fosfato isomerasa
<i>Ligasas</i>	Síntesis	Piruvato carboxilasa, Cicloligasas
<i>Transferasas</i>	Transferencia de grupo	Glucógeno fosforilasa, Aminotrasferasa
<i>Liasas</i>	Eliminación	Citrato liasa, deshidratasa

Nota. adaptado de (McDonald & Boyce, 2001).

3.2.Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, donde hay una transferencia de electrones entre moléculas. Estas enzimas juegan un papel clave en procesos biológicos esenciales, como la respiración celular y la fotosíntesis, en los que se involucra la oxidación de una molécula y la reducción de otra.

En el mecanismo de acción de las oxidorreductasas, una molécula actúa como donadora

de electrones (reduciéndose), mientras que la otra actúa como aceptora de electrones (oxidándose). Ejemplos importantes incluyen la lactato deshidrogenasa (una deshidrogenasa) y la citocromo c oxidasa (una oxidasa).

3.2.1. Tipos comunes de oxidorreductasas:

- **Deshidrogenasas:** Participan en la transferencia de átomos de hidrógeno o electrones, como en la conversión de lactato a piruvato.
- **Oxidasas:** Involucran oxígeno como aceptor de electrones, como la citocromo c oxidasa, que es fundamental en la cadena de transporte de electrones.
- **Peroxidasas:** Usan peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones, como la HRP.

Estas enzimas son cruciales para mantener el equilibrio redox dentro de las células y, por lo tanto, están involucradas en una amplia gama de procesos metabólicos. (Voet & Voet, 2006)

3.3. Peroxidasas

Las PODs son enzimas que utilizan varios peróxidos (ROOH) como aceptores de electrones para catalizar una serie de reacciones oxidativas. Estas proteínas se pueden encontrar bajo el mismo número de clasificación enzimática (EC.1.11.1.7 es la POD del grupo hemo) donante: peróxido de hidrógeno oxidorreductasa.

Los genes que codifican las hemo peroxidasas se pueden encontrar en casi todos los reinos de la vida. Las dos grandes superfamilias son: una que se encuentra principalmente en bacterias, hongos y plantas y una segunda que se encuentra en animales, hongos y bacterias.

La POD reacciona por mecanismos donde la reacción catalizada es la oxidación de una

amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos por peróxido de hidrógeno (Passardi et al., 2007).

Reacción catalizada por la peroxidasa



Las PODs cumplen algunas funciones en los organismos como lo son:

- **Protección antioxidante:** las PODs desempeñan un papel crucial en la protección antioxidante del cuerpo. El peróxido de hidrógeno generado como subproducto durante el metabolismo celular, puede resultar tóxico en niveles altos. Estas enzimas intervienen para descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, previniendo así el daño celular provocado por el estrés oxidativo. (Veitch, 2004).
- **Desintoxicación de xenobióticos:** las PODs también pueden participar en la neutralización de xenobióticos, es decir, sustancias químicas extrañas que ingresan al cuerpo. Estas enzimas contribuyen al metabolismo y eliminación de compuestos tóxicos, facilitando así su excreción del organismo. (Veitch, 2004).
- **Regulación del metabolismo del yodo:** en la glándula tiroides, las PODs juegan un papel vital en la producción de hormonas tiroideas como la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3). Facilitan la adición de yodo a las moléculas precursoras de estas hormonas, un proceso crucial para el correcto funcionamiento de la glándula tiroides y la regulación metabólica (Veitch, 2004).
- **Defensa inmunológica:** estas enzimas pueden participar en la respuesta inmunológica del cuerpo. Se han encontrado en diversas células del sistema inmunológico, donde juegan un papel en la defensa contra las infecciones al ayudar en la generación de radicales libres y la eliminación de agentes patógenos (Veitch, 2004).

- **Protección contra infecciones:** además de su función en el sistema inmunológico, las PODs liberadas en tejidos específicos, como el sistema respiratorio y el sistema digestivo, pueden contribuir a la defensa contra infecciones al eliminar bacterias y otros microorganismos dañinos (Veitch, 2004).
- **Modulación de procesos de señalización:** algunas PODs también pueden influir en la regulación de vías de señalización celular, lo que podría impactar en varios procesos fisiológicos, como la diferenciación celular y el control de crecimiento. (Veitch, 2004).

3.3.1. Fuentes de peroxidasa

la POD es una enzima que cataliza la oxidación de sustratos utilizando peróxido de hidrógeno. Se encuentra en fuentes tanto animales como vegetales, por ejemplo, para las fuentes vegetales tenemos:

- **Rábano picante (*Armoracia rusticana*):** la HRP es una de las más utilizadas en biotecnología, debido a su alta estabilidad y actividad. Se usa en muchas aplicaciones, como inmunoensayos (Shannon et al., 1966).
- **Batata (*Ipomoea batatas*):** La batata es otra fuente vegetal de POD. La PCB ha sido estudiada por su capacidad para detoxificar compuestos reactivos como el peróxido de hidrógeno (Veitch, 2004).
- **Soja (*Glycine max*):** La soja contiene varias isoformas de POD, que se han investigado por su participación en la germinación y desarrollo de las plantas (Henriksen et al., 2001).
- **Zanahoria (*Daucus carota*):** Las zanahorias también contienen PODs que juegan un papel importante en la respuesta a estrés oxidativo (T. Gaspar et al., 1985).

Y en fuentes de POD animal tenemos:

- **Glándula tiroides (Tiropoxidasa):** La POD tiroidea es una enzima clave en la síntesis de hormonas tiroideas al catalizar la yodación de la tiroglobulina (Kopp & Cooper, 2013).
- **Leucocitos (Mieloperoxidasa):** La mieloperoxidasa (MPO) se encuentra en los granulocitos neutrófilos y participa en el sistema inmunológico al producir ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrógeno (Klebanoff, 2005).
- **Glándulas salivales (Salivary peroxidase):** La POD salival está involucrada en la protección contra patógenos en la cavidad oral, al reducir la toxicidad del peróxido de hidrógeno (Thomas et al., 1995).

3.3.2. Clases de peroxidases

Las PODs se clasifican en diferentes grupos según su estructura, localización y requerimientos de cofactores. A continuación, se presenta una clasificación de las PODs:

Clasificación por su origen (Animal o Vegetal)

- **Peroxidasas vegetales:** Estas incluyen enzimas que se encuentran en plantas, como la peroxidasa de rábano picante (HRP) o la peroxidasa de la batata (PCB). Están implicadas en la defensa de las plantas contra el estrés oxidativo y en procesos de crecimiento y desarrollo (Veitch, 2004).
- **Peroxidasas animales:** Ejemplos son la mieloperoxidasa (MPO), la tiro peroxidasa (TPO) y la lacto peroxidasa (LPO), que desempeñan un papel importante en el sistema inmunológico y en la síntesis de hormonas (Klebanoff, 2005).

Clasificación por el cofactor que utilizan

- **Hemo-peroxidases:** Estas PODs contienen un grupo hemo, similar al encontrado en la hemoglobina. La mayoría de las PODs animales y vegetales pertenecen a esta categoría. Algunos ejemplos incluyen la HRP y la MPO (Ayala Marcela, 1999).

- **No-hemo peroxidasas:** Estas enzimas no contienen un grupo hemo. Un ejemplo es la glutatión peroxidasa (GPx), que utiliza selenocisteína como cofactor (Flohé, 1978).

Clasificación por su especificidad de sustrato

- **Mieloperoxidasa (MPO):** Específica de leucocitos, oxida el cloruro para formar ácido hipocloroso, que es bactericida (Klebanoff, 2005).
- **Glutatión peroxidasa (GPx):** Cataliza la reducción de peróxidos utilizando glutatión como donante de electrones (Flohé, 1978).
- **Peroxidasa de rábano picante (HRP):** Oxida una amplia gama de compuestos, y se utiliza comúnmente en técnicas bioquímicas como los ensayos de ELISA (Shannon et al., 1966).

Clasificación por su localización celular

- **Peroxidasas citosólicas:** Estas PODs se encuentran en el citoplasma de las células y participan en la eliminación de peróxidos en el ambiente intracelular (Ayala Marcela, 1999).
- **Peroxidasas en compartimentos específicos:** Ejemplos incluyen la lacto peroxidasa (LPO), que se encuentra en las glándulas mamarias y en la saliva, o la mieloperoxidasa, que está localizada en los gránulos de los neutrófilos (Thomas et al., 1995).

Clasificación por el tipo de reacción que catalizan

- **Peroxidasas dependientes de peróxido de hidrógeno:** Estas peroxidasas catalizan reacciones utilizando peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones (Veitch, 2004a).

- **Peroxidasas dependientes de peróxidos orgánicos:** Como la glutatión peroxidasa, que cataliza la reducción de peróxidos orgánicos (Flohé, 1978).

Esta clasificación se ve mejor representada en la siguiente tabla:

Tabla 2.

Clasificación de peroxidadas

<i>Clasificación</i>	<i>Descripción</i>
Origen (Animal o Vegetal)	Peroxidasas animales (MPO, TPO y vegetales HRP, Batata)
Cofactor (Hemo o No-Hemo)	Hemo-peroxidadas (contienen grupo hemo, HRP) y no-hemo (Glutatión peroxidasa)
Especificidad de sustrato	Oxidán diferentes sustratos: MPO (cloruro), GPx (peróxidos), HRP (compuestos diversos)
Localización celular	Peroxidasas citosólicas y en compartimientos específicos (MPO en neutrófilos, LPO en glándulas mamarias)
Tipo de reacción	Dependientes de peróxido de hidrógeno (HRP) o de peróxidos orgánicos (GPx)

3.3.3. Determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa

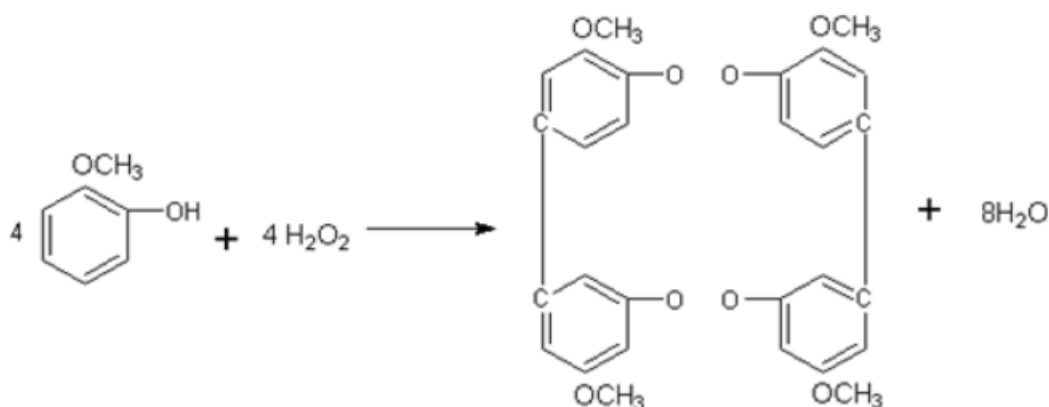
La actividad enzimática de la PCB se puede determinar usando diferentes métodos que implican la medición de la velocidad de reacción entre la enzima y su sustrato, así como la detección del producto generado. En el caso de la medición con guayacol, primero la PCB reacciona con guayacol y peróxido de hidrógeno como sustratos. En esta reacción, la PCB utiliza el peróxido de hidrógeno como donante de electrones y oxida el guayacol. Después de esto, el guayacol oxidado forma un compuesto con un color marrón característico, que resulta de la oxidación del guayacol por la PCB en presencia del peróxido de hidrógeno.

La formación del producto oxidado se puede cuantificar mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda específica, que generalmente es alrededor de 470 nm. Este color marrón resultante está directamente relacionado con la actividad enzimática de la PCB. La intensidad de la absorbancia está correlacionada con la velocidad de reacción de la POD con el guayacol y el peróxido de hidrógeno. Cuanto mayor sea la actividad enzimática, mayor será la velocidad de formación del producto oxidado y, por lo tanto, mayor será la absorbancia medida.

Finalmente, la absorbancia medida se usa para calcular la actividad enzimática de la POD, generalmente expresada en unidades de absorbancia por minuto o en unidades de absorbancia por miligramo de proteína por minuto, dependiendo de la normalización requerida (Rojas-Reyes et al., 2014).

Figura 2.

Oxidación de guayacol en presencia de peroxidasa.



Nota. Adaptado de (Centeno Diana, 2017)

3.3.4. Inactivación y regeneración parcial de la peroxidasa

- **Inactivación térmica de la peroxidasa:** La POD es una enzima relativamente resistente al calor en comparación con otras proteínas, y se ha observado que requiere temperaturas altas y tiempos prolongados para inactivarse completamente. La inactivación térmica de la POD sigue generalmente una cinética de primer orden, lo que significa que la velocidad de inactivación depende de la temperatura y el tiempo de exposición.
- **Temperatura crítica para la inactivación:** Generalmente, la POD comienza a perder actividad a temperaturas cercanas a los 70-80 °C. Sin embargo, para una inactivación completa, se requiere un tiempo de exposición mayor a 30 segundos a temperaturas superiores a 90 °C.
- **Importancia en la industria alimentaria:** La POD es una enzima de gran interés en la industria alimentaria, ya que su resistencia térmica puede influir en la calidad y vida útil de productos vegetales procesados. Por ejemplo, en el escaldado de vegetales como el brócoli o las espinacas, la inactivación completa de la POD es crítica para evitar que cause deterioro en los alimentos durante el almacenamiento (CANO et al., 1995).

3.3.5. Regeneración enzimática tras inactivación térmica parcial

Un aspecto interesante de la POD es su capacidad de regeneración parcial tras haber sido expuesta al calor. Este fenómeno se explica debido a que el calor, si es aplicado por un período corto o no demasiado intenso, puede causar una desnaturalización parcial de la enzima. Durante este proceso, la estructura terciaria de la proteína se desorganiza parcialmente, pero no completamente, lo que permite una posterior recombinación de las estructuras secundarias y terciarias una vez que las condiciones térmicas vuelven a la normalidad.

- **Mecanismo de regeneración:** La regeneración ocurre cuando los enlaces disulfuro o las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína vuelven a su estado funcional. Esto ocurre solo cuando la desnaturalización térmica no ha sido lo suficientemente prolongada o severa para causar una pérdida total de la actividad enzimática.
- **Límites de la regeneración:** Si la exposición térmica es lo suficientemente larga o intensa, la regeneración no es posible, y la POD pierde su actividad irreversiblemente (Robinson & Eskin, 1991).

3.3.6. Factores que afectan la regeneración

La regeneración de la POD después de la inactivación térmica depende de varios factores:

- **Duración de la exposición al calor:** Un tiempo corto de calentamiento puede permitir una regeneración parcial, mientras que una exposición prolongada conduce a una inactivación irreversible.
- **Temperatura alcanzada:** A temperaturas más bajas, hay una mayor posibilidad de regeneración. A temperaturas más altas, las estructuras internas de la enzima se desnaturalizan de forma irreversible.
- **Condiciones ambientales:** El pH y la presencia de ciertos agentes químicos pueden facilitar o inhibir la regeneración enzimática (Rodrigo et al., 1996).

3.3.7. propiedades catalíticas de la peroxidasa

- **Actividad oxidativa:** La PCB cataliza la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno. Entre los sustratos típicos se encuentran el guayacol, los compuestos aromáticos y los alcaloides. Estos sustratos son oxidados a

productos con estructuras poliméricas, lo que resulta en la formación de coloraciones características (por ejemplo, marrón en el caso del guayacol) (Shannon et al., 1966).

- **Estabilidad térmica:** A diferencia de otras PODs vegetales, la PCB es relativamente estable a temperaturas moderadas. Esto le permite mantener su actividad catalítica en un rango de temperaturas donde otras enzimas similares se desnaturalizan. Esto hace que sea útil en procesos donde la estabilidad térmica es crítica, como en la industria alimentaria.(Veitch, 2004a).
- **Aplicaciones en detoxificación:** La PCB también ha sido investigada por su capacidad para detoxificar compuestos reactivos como el peróxido de hidrógeno y ciertos fenoles, lo que tiene aplicaciones tanto en procesos industriales como en la biorremediación. En estos contextos, la enzima actúa oxidando los compuestos tóxicos en formas menos reactivas o más fáciles de eliminar (Shannon et al., 1966).
- **Rol en el estrés oxidativo:** Como otras PODs vegetales, la PCB participa en la defensa contra el estrés oxidativo. Esta enzima se activa en respuesta a condiciones de estrés, como infecciones o exposición a metales pesados, para reducir los niveles de peróxido de hidrógeno en las células vegetales (Veitch, 2004a).

3.3.8. Propiedades moleculares

- **Efecto del pH sobre la actividad de las peroxidasas**

Rango de pH óptimo: La mayoría de las PODs vegetales, incluida la PCB y la HRP, suelen tener un pH óptimo entre pH 5 y pH 7, dependiendo del sustrato específico y las condiciones experimentales. A pH neutro o ligeramente ácido, la enzima muestra su máxima actividad catalítica (Veitch, 2004a).

- **Desnaturalización fuera del rango óptimo:** A valores de pH fuera del rango óptimo,

tanto en condiciones muy ácidas (por debajo de pH 4) como muy alcalinas (por encima de pH 8), la actividad de la POD disminuye significativamente. Esto ocurre debido a la desnaturalización parcial o total de la enzima, lo que altera su estructura activa y reduce su capacidad catalítica (Shannon et al., 1966).

- **Efecto de la temperatura sobre la actividad de las peroxidasas**

La actividad de las PODs es sensible a la temperatura. En general, la actividad de estas enzimas aumenta gradualmente con el incremento de temperatura hasta un punto óptimo, que varía según la fuente de la POD. En el caso de algunas PODs vegetales, esta actividad es óptima entre 30°C y 70°C. Sin embargo, al sobrepasar este rango, la enzima puede sufrir desnaturalización térmica, lo cual reduce su actividad. A temperaturas elevadas (por encima de 80°C), la inactivación puede ser irreversible después de pocos minutos.

Estudios como el de (Mizobutsi et al., 2010) y los realizados en frutas como el lichi destacan que las PODs muestran una rápida disminución en actividad cuando se sobrepasa la temperatura óptima, especialmente cuando se alcanzan 90°C o más. Estos hallazgos son relevantes en la industria alimentaria, donde el control térmico de PODs puede influir en la conservación de los productos.

- **Estabilidad de las peroxidasas frente a la temperatura y el pH**

La estabilidad de las PODs frente a la temperatura y el pH depende principalmente de factores estructurales de la enzima, como la composición de aminoácidos, la presencia de enlaces disulfuro, y la estructura terciaria y cuaternaria. Un aumento de temperatura puede inducir desnaturalización parcial o completa, mientras que valores extremos de pH pueden afectar los grupos funcionales esenciales para la actividad catalítica y la estructura. La presencia de cofactores o iones estabilizantes también puede influir en la resistencia a la desnaturalización

(Chattopadhyay & Mazumdar, 1999).

Tabla 3.

Condiciones de temperatura y pH óptimos en diferentes peroxidasas

<i>Fuente de peroxidasa</i>	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Referencia
Rábano picante (<i>Armoracia rusticana</i>)	30 a 40	5 a 7	(Veitch, 2004a)
soya (<i>glycine max</i>)	40 a 50	4.5 a 6	(Ixel Hernández Hernández et al., 2022)
Batata (<i>Ipomoea batatas</i>)	35 a 45	8	Este estudio
Repollo morado (<i>Brassica oleracea var. capitata f. rubra</i>)	35 a 45	5.5	(Huamán Zósimo, 1992)
Hoja de palmera (<i>roystonea regia</i>)	30 a 40	6 a 7	(Sakharov et al., 2001)
Nabo (<i>Brassica rapa subsp. Rapa</i>)	35 a 50	5 a 6	(Motamed et al., 2009)

3.3.9. peroxidasa de la batata (*Ipomoea batatas*)

Figura 3.

Fotografía batata



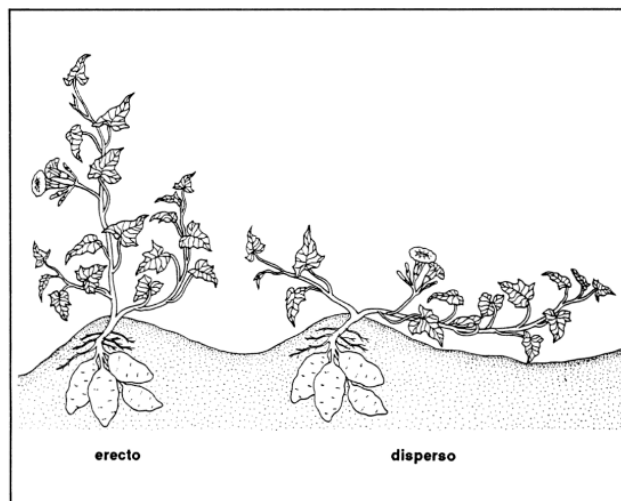
Las peroxidasas (PODs) se encuentran en diversas especies vegetales, entre ellas la batata (*Ipomoea batatas*), una planta nativa de la zona tropical del noroeste de Sudamérica. Esta especie es conocida con distintos nombres, como camote, boniato, batata douce, apichu y kumara.

En 1971, Lamarck clasificó esta especie dentro del género *Ipomoea* basándose en la forma del estigma y en la estructura de la superficie de los granos de polen. Por esta razón, su nombre científico fue cambiado a *Ipomoea batatas*.

El número de cromosomas en la batata es $2n = 6x = 90$, lo que indica que se trata de una planta hexaploide con un número básico de cromosomas $x = 15$. La batata es una planta herbácea cuyo hábito de crecimiento es predominantemente postrado, con tallos que se extienden horizontalmente sobre el suelo. Los tipos de crecimiento que puede presentar incluyen: erecto, semi-erecto, extendido y muy extendido (Huamán Zósimo, 1992).

Figura 4.

Tipos de crecimiento de la batata



Nota. Adaptado de (*Botanica Sistemática y Morfología de La Planta de Batata o Camote - Huaman, Z*)

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un líquido covalente de color azul pálido, libremente miscible con agua y aparentemente capaz de atravesar fácilmente las membranas celulares, aunque no se conocen las vías que usa para atravesarla. Los niveles altos (generalmente $\geq 50 \mu M$) de H_2O_2 se describen como citotóxicos para una amplia gama de células animales, vegetales y bacterianas en cultivo, así mismo, la exposición de ciertos tejidos humanos al H_2O_2 puede ser mayor de lo que comúnmente se supone: algunas cantidades pueden estar presentes en las bebidas cotidianas como el café instantáneo, en la orina humana recién evacuada y en el aire que se exhala. Por lo que se piensa que es muy tóxico in vivo y al ser poco reactivo en ausencia de iones de metales de transición los niveles pueden ser minimizados por la acción de las enzimas de defensa antioxidantes como las catalasas, PODs, entre otras (Halliwell et al., 2000).

3.4. Inmovilización de enzimas

La inmovilización es un proceso técnico mediante el cual las enzimas se fijan sobre o dentro de soportes sólidos, creando un sistema heterogéneo de enzimas inmovilizadas. Esta forma inmovilizada imita el comportamiento natural de las enzimas en las células vivas, donde la mayoría se encuentra unida a estructuras como el citoesqueleto, las membranas y los orgánulos celulares.

Los sistemas con soporte sólido suelen estabilizar la estructura de las enzimas y, como resultado, ayudan a conservar su actividad catalítica. Por esta razón, las enzimas inmovilizadas, en comparación con las enzimas libres en solución, tienden a ser más robustas y resistentes frente a cambios en las condiciones ambientales.

Además, los sistemas heterogéneos de inmovilización permiten ventajas como la fácil recuperación de las enzimas y de los productos de reacción, la posibilidad de reutilización múltiple de las enzimas y la operación continua de procesos enzimáticos, entre otros beneficios (Homaei et al., 2013).

3.4.1. Modos de inmovilización

Tradicionalmente, se emplean cuatro métodos principales para la inmovilización de enzimas:

- **Adsorción de proteínas:** Los métodos no covalentes de inmovilización son ampliamente utilizados e implican la adsorción pasiva de proteínas sobre superficies hidrofóbicas, o bien mediante interacciones electrostáticas con superficies cargadas.
- **Absorción en silicatos mesoporosos:** En la última década, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la síntesis de silicatos mesoporosos. Un grupo de investigación descubrió una familia de estos materiales con una distribución de tamaño de poro muy estrecha. Estas nuevas estructuras ofrecían la posibilidad de adsorber o atrapar moléculas grandes dentro de sus poros.
- **Inmovilización de proteínas en polímeros de poliacetona mediante enlaces de hidrógeno:** Recientemente se propuso un novedoso proceso de inmovilización que utiliza un polímero de poliacetona como soporte. Este polímero, obtenido por copolimerización de etano y monóxido de carbono, ha sido empleado para inmovilizar tres enzimas diferentes: una peroxidasa de rábano picante (HRP) y dos amino oxidasas provenientes de suero bovino y plántulas de lenteja.
- **Métodos clásicos de inmovilización covalente:** Para lograr una unión más estable, se recurre a la formación de enlaces covalentes, generalmente mediante la reacción con grupos

funcionales presentes en la superficie de la proteína. Al igual que en la adsorción no covalente, estos métodos pueden aplicarse a proteínas no modificadas, ya que dependen únicamente de grupos funcionales presentes de forma natural (Homaei et al., 2013).

3.5. Técnicas electroquímicas.

Las técnicas electroquímicas son herramientas analíticas poderosas y versátiles que ofrecen alta sensibilidad, precisión y exactitud, así como un amplio rango dinámico lineal, todo ello utilizando una instrumentación relativamente económica. Con el desarrollo de métodos de pulso más sensibles, los estudios electroanalíticos se han vuelto cada vez más comunes en aplicaciones industriales, ambientales y en el análisis de medicamentos en sus formas de dosificación, especialmente en muestras biológicas.

Estas técnicas permiten resolver numerosos problemas de interés farmacéutico con un alto grado de exactitud, sensibilidad, selectividad y precisión, lo que las convierte en una opción eficiente y confiable dentro del campo analítico.

3.5.1. Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica electroquímica usada para medir la respuesta de corriente a lo largo del tiempo a un potencial aplicado constante. Consiste en aplicar un potencial a una celda electroquímica y medir la corriente resultante en función del tiempo.

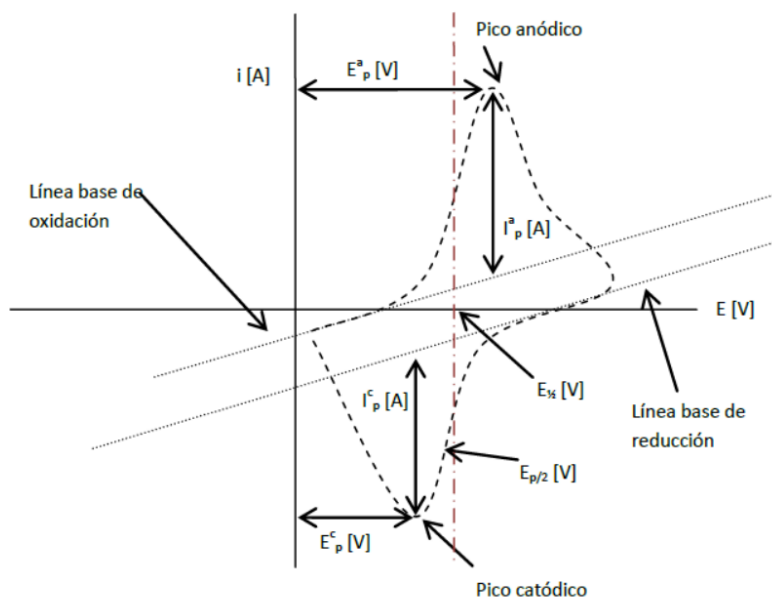
En la cronoamperometría, se aplica un cambio repentino en el potencial al electrodo de trabajo y se registra la respuesta de la corriente resultante. Esta técnica se utiliza frecuentemente para estudiar diversos procesos electroquímicos, como en el electrodo, cinética de transferencia de carga y comportamiento de especies electroactivas.

3.5.2. Voltamperometría cíclica (CV)

la voltamperometría cíclica se ha vuelto ampliamente usada en muchas áreas de química electroanalítica. Es raramente usada para la determinación cuantitativa, pero es muy usada para el estudio de reacciones redox y también obtiene mucha información sobre como ocurren las reacciones químicas. La voltamperometría cíclica es una técnica de rápido voltaje en la que se invierte la dirección del escaneo de voltaje. Mientras el potencial aplicado en el electrodo de trabajo tanto en dirección directa como inversa, la corriente resultante es registrada. La velocidad de escaneo en la dirección de y retroceso normalmente es la misma. La CV se puede usar en modos de ciclo o multicitelo (Farghaly et al., 2014).

Figura 5.

Voltamperograma clásico de un sistema reversible



Nota. Adaptado de (Macedo Luis, 2012)

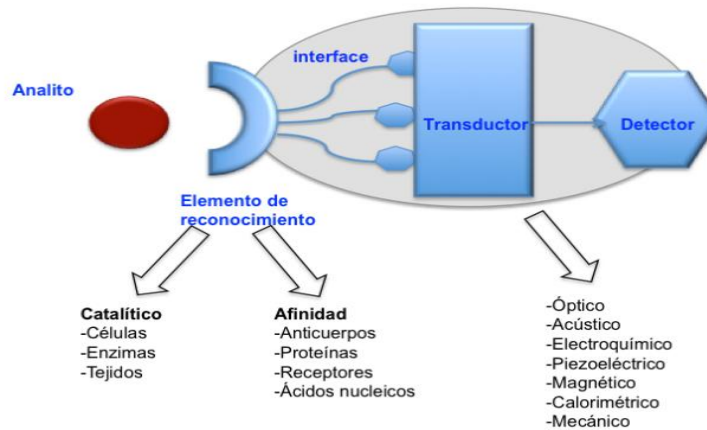
3.6. Biosensor

Un biosensor se describe como un dispositivo analítico compacto que incorpora un elemento de detección biológico o biomimético, ya sea estrechamente conectado o integrado dentro de un sistema transductor. El principio de detección es la unión específica del analito de interés al elemento de biorreconocimiento complementario inmovilizado en un medio de soporte adecuado. La interacción específica da como resultado un cambio en una o más propiedades fisicoquímicas (cambio de pH, cambio de masa, transferencia de calor, entre otros) que se detectan y pueden medirse con el transductor. El objetivo habitual es producir una señal electrónica que sea proporcional en magnitud o frecuencia a la concentración un analito específico o grupo de analitos, a los que se une el elemento biosensor (Velasco-Garcia & Mottram, 2003).

El transductor es un dispositivo que convierte un parámetro físico, químico o biológico en una señal eléctrica que se puede procesar y analizar. En un biosensor, el transductor convierte la interacción entre el elemento de reconocimiento biológico y el analito en una señal eléctrica que se puede cuantificar.

Figura 6.

Representación esquemática de un biosensor

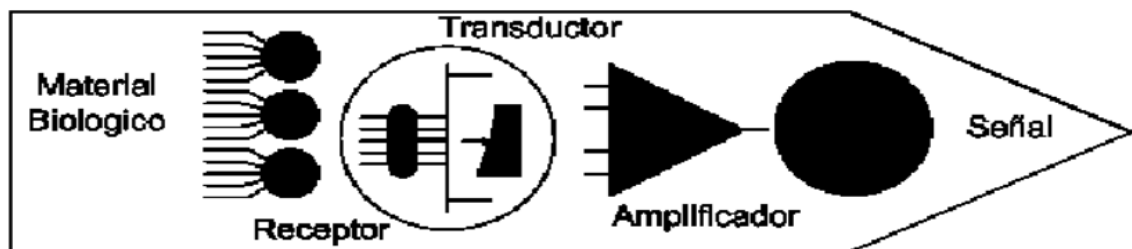


Nota. Adaptado de (Torres Eduardo, 2014)

3.6.1. Biosensores amperométricos

Figura 7.

Sensor amperométrico



Nota. Adaptado de (Pezzotti & Luperini, 2013)

Los biosensores amperométricos son un tipo de biosensor que miden la concentración de un analito específico detectando la corriente eléctrica producida cuando se produce una reacción entre el analito y un elemento de reconocimiento biológico. La corriente generada por la reacción se mide mediante un electrodo y es proporcional a la concentración del analito (Romero et al., 2010).

3.6.2. Biosensores catalíticos

Son aquellos biosensores en los que se utiliza un biocatalizador que al interactuar con el sustrato desencadena una reacción química, sin consumo del material biológico que se regenera y puede ser usado de nuevo. Los receptores utilizados pueden ser enzimas, células, orgánulos o tejidos (Boix, 2020).

Estos biosensores son muy utilizados debido principalmente a su alta selectividad, es decir, la capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros están presentes. Normalmente cuantifican la concentración del analito a partir del efecto producido por la reacción catalizada. Como consecuencia de la reacción enzimática puede ocurrir un cambio de color, un cambio en la concentración de los protones o en la muestra, entre otros (Torres Eduardo, 2014).

3.7. Electroodos serigrafados

Los electroodos serigrafados son electroodos los cuales tienen impreso una superficie que tiene material conductor, estos electroodos se usan en distintas aplicaciones médicas, biomédicas, entre otras.

Los electroodos serigrafados se presentan como un único dispositivo en el que se encuentran tres electroodos distintos:

- Electrodo de trabajo: su respuesta es sensible a la concentración de analito
- Electrodo de referencia: permite aplicar un potencial conocido con exactitud, que es independiente a la concentración del analito y de otros iones. Su potencial es constante y respecto a este se mide el potencial del electrodo de trabajo. Electrodo auxiliar: es el

electrodo que completa el circuito de la celda de tres electrodos ya que permite el paso de corriente. Permite realizar análisis de procesos en los que se produce una transferencia electrónica (Álvarez Pérez et al., 2020).

3. Metodología

3.1. Reactivos

Los materiales y reactivos usados en este trabajo fueron adquiridos de los siguientes fabricantes: J.T Baker: guayacol; Merck: sulfato de amonio, polietilenglicol (12000) y peróxido de hidrógeno (30% p/v).

La peroxidasa de batata (PCB) fue extraída y purificada parcialmente en el laboratorio del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de Universidad Industrial de Santander (UIS).

3.2. Extracción de la peroxidasa

Se preparó una solución buffer (pH 8.3) de borato, para esto se usaron 500 mL de solución de ácido bórico 0.5M y 500 mL de solución 0.125M de NaOH, después se obtuvieron 64g de cáscara de batata de los cuales se usó la mitad (32g) para posteriormente adicionarla en un recipiente con 256 mL de la solución buffer preparada anteriormente y se llevó al shaker por 24 horas a 150 rpm a temperatura ambiente. Pasadas las 24 horas, se separaron los sólidos del extracto usando la centrifuga a 7000 rpm por 10 min y en un nuevo recipiente se adicionó la otra mitad de la cáscara (32g) con el extracto obtenido de la centrifugación, esto con el fin de obtener un extracto con una concentración más alta.

3.3. Semipurificación y precipitación de proteínas

Se dividió el extracto en 8 tubos falcon de 50 mL para después añadir concentraciones de 10,20,30,40,50,60,70 y 80% de sulfato de amonio respectivamente y luego se ayudó a la precipitación de proteínas usando centrifuga a 7000rpm por 10 min. Esto se hace con el fin de disminuir la solubilidad de las proteínas aumentando la concentración de sal en la solución provocando su precipitación. Luego de esto se determinó que el porcentaje de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ óptimo para obtener la actividad enzimática más alta fue de 8.5%

3.4. Medición de la actividad enzimática de la peroxidasa

Se preparó el sustrato que usó para medir la actividad, el cual está compuesto de 40 μL de guayacol, 10 μL de peróxido de hidrógeno y 20 mL de solución Buffer borato. Luego de esto se tomaron 10 μL del extracto de batata concentrado con 8.5% de sulfato de amonio y se diluyeron en 500 μL de agua destilada, después de esto se tomaron 33 μL de la dilución y se pusieron en una celda con 1 mL del sustrato mencionado anteriormente para después medir la actividad en el espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU) con una variación de absorbancia de 470nm y determinando la reacción de aparición del producto, el tetraguayacol con coeficiente de extinción molar de $5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

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

3.5. Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes pH

Para este estudio se prepararon 5 soluciones de buffer borato a pH 2,4,6,8,10 respectivamente. Luego de esto a cada solución se le adicionaron 10 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 40 μL de guayacol para posteriormente realizar las mediciones de la actividad enzimática de la PCB usando el método descrito anteriormente.

3.6. Estudio de la estabilidad de la peroxidasa a diferentes temperaturas

Se tomaron 2 mL de extracto de batata semipurificado y se llevaron a 20 mL con buffer borato, luego de esto se calentaron desde 30°C hasta 80°C y se tomaron alícuotas de 500 μL cada 5°C, luego se dejaron reposar a temperatura ambiente y posteriormente se midió la actividad de las diferentes alícuotas usando el mismo método descrito anteriormente.

3.7. Inmovilización de la peroxidasa en electrodos serigrafiados de carbono modificados con óxido de grafeno

La inmovilización de la PCB en los electrodos serigrafiados de carbono modificados con óxido de grafeno (ESOG) se realizó por medio de adsorción física, para esto se colocaron 10 μL de extracto semipurificado de batata sobre el electrodo de trabajo y se dejó secar por 24 horas, aparte de esto en todos los ensayos se usaron electrodos de control o electrodos sin modificar con el fin de comparar la respuesta y la señal obtenida con el electrodo modificado. El potencióstato/galvanostato que se usó fue el AUTOLAB PGTSTAT302N y el software para el procesamiento de los datos fue el NOVA (NOVA 1.10.1.9 software para instrumentos autolab). Los electrodos usados fueron los (110GPHOX Metrohm Dropsens) que cuentan con el electrodo de trabajo de carbono modificado con óxido de grafeno, el electrodo auxiliar de carbono y el electrodo de referencia de Ag/AgCl.

4. Análisis y resultados

4.1. Extracción y semi-purificación de la peroxidasa de batata

A medida que avanzaban las etapas de semipurificación, se fue midiendo la actividad enzimática de los extractos.

Para calcular la actividad enzimática, se emplea la fórmula derivada de la ecuación de la ley de Lambert-Beer con respecto al tiempo, ya que esta relación permite vincular la absorbancia con la concentración del analito en una muestra. De esta manera, se obtiene la ecuación final (ecuación 2), donde V_T representa el volumen total de la celda en mL, FD es el factor de dilución del extracto, dA/dt está expresado en s^{-1} , ϵ en $mM^{-1} cm^{-1}$, y b en cm.

$$A = \epsilon bc$$

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

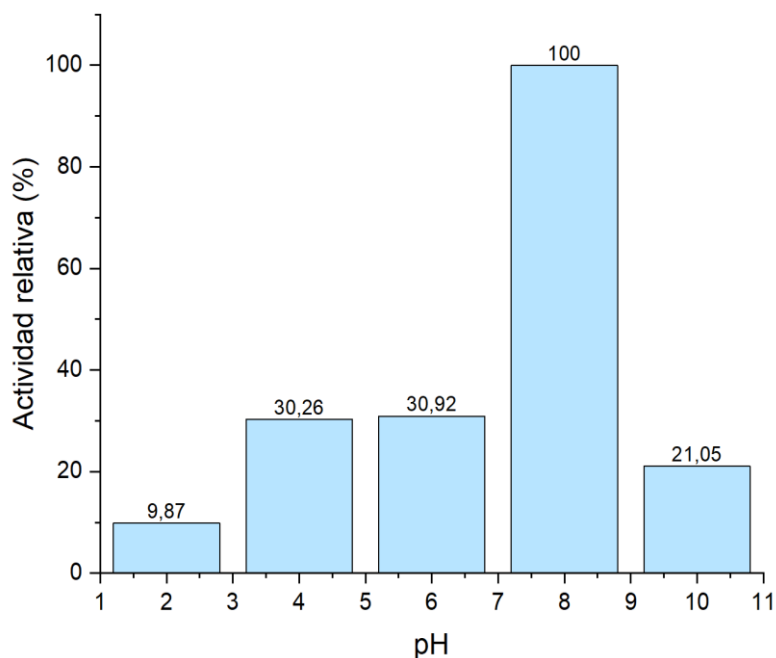
$$\frac{dc}{dt} = \frac{dA/dt}{\epsilon b}$$

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{dA/dt}{\epsilon b} \times 60 \times FD \times V_T \quad [U] \quad (2)$$

Para la extracción se escogieron batatas frescas, ya que la actividad enzimática es más alta en las raíces recién cosechadas en comparación con las almacenadas durante periodos prolongados (Arizio et al., 2009). Se realizó un ensayo con el fin de encontrar el pH óptimo para la extracción, se usaron pH de 2,4,6,8 y 10 de los cuales se encontró que el pH óptimo es 8 como se puede observar en la figura 8 ya que es el valor donde se evidencia una actividad más alta en comparación con los demás.

Figura 8.

Actividad enzimática relativa de la PCB a diferentes pH



En la cáscara de batata se pueden encontrar diversos compuestos, como antocianinas, compuestos fenólicos (Gabilondo & Julieta, 2015), fibra dietética (García-Méndez et al., 2016), vitaminas y minerales (Valero Gaspar, 2018), entre otros, que pueden interferir en los análisis de medición de actividad o en la voltamperometría cíclica.

Por esta razón, al obtenerse un extracto concentrado de peroxidasa en una solución tampón de borato a pH 8.0, este fue sometido a una centrifugación inicial a 7000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, con el propósito de separar la fase líquida del material particulado, incluyendo restos de cáscara presentes en la muestra. Posteriormente, se llevó a cabo una precipitación proteica utilizando sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 8,5%. Para ello, se añadió el sulfato de amonio al extracto y se dejó reposar durante 2 horas, seguido de una centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos. Este paso tuvo como objetivo precipitar la mayor cantidad de proteínas del extracto, permitiendo tomar la fase acuosa, que contenía la

mayor actividad enzimática.

Después de la precipitación, se realizó un proceso de separación de fases mediante un sistema acuoso bifásico (RB), utilizando polietilenglicol (PEG) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como componentes del sistema. El reparto bifásico se dejó actuar durante 1 hora, tras lo cual se seleccionó únicamente la fase acuosa, donde se encontraba concentrada la peroxidasa.

En la Figura 9 se presentan algunas imágenes del proceso de extracción y semipurificación.

Figura 9.

Etapas de obtención del extracto semi-purificado (A) cáscara de la batata extraída, (B) montaje del shaker, (C) reparto bifásico, (D) material particulado y restos de cáscara separados como fase sólida en centrifugación.

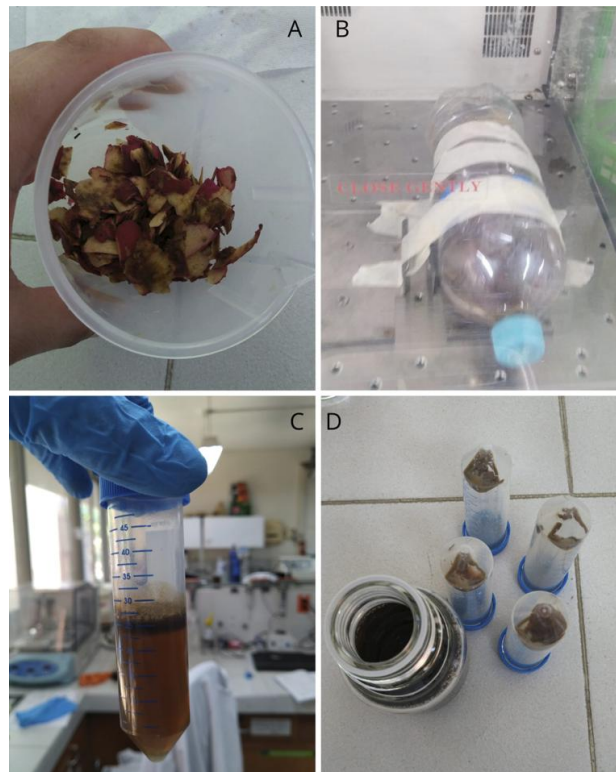


Tabla 4.

Etapas de purificación de la peroxidasa de batata

<i>Etapa</i>	Volumen Total (mL)	Actividad Total (U)	Actividad Específica (U/g)	Proteína Total (mg)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
<i>Extracción inicial</i>	230	14,98	249	60	100	1.0
<i>Eliminación de pigmentos</i>	170	12,379	343	36	83	1.4
<i>Ultrafiltración</i>	40	7,653	478	16	51	2.0

A partir de los datos presentados en la Tabla 4, se puede inferir que cada etapa del proceso de purificación mejora la calidad del extracto al eliminar impurezas, lo que resulta en un aumento de la actividad específica (U/mg) de la enzima. Asimismo, se observa una reducción del volumen del extracto, pasando de 230 mL en la extracción inicial a 40 mL en la última fase. Esta disminución es un comportamiento esperado en los procesos de purificación, ya que las técnicas empleadas eliminan compuestos no deseados y concentran la enzima de interés.

El rendimiento del proceso es del 100% en la etapa inicial. Tras la eliminación de pigmentos, se conserva el 83% de la actividad total, mientras que, después de la ultrafiltración, el rendimiento se reduce al 51%. Aunque se registra una pérdida de actividad total, esto es común en procesos de purificación debido a la eliminación de proteínas no específicas y a posibles desnaturalizaciones de la enzima.

En cuanto a la actividad específica, esta aumenta progresivamente, pasando de 249 U/mg en la extracción inicial a 343 U/mg tras la eliminación de pigmentos, lo que indica una mejora en la proporción de enzima activa respecto a las proteínas totales. En la ultrafiltración, la actividad específica alcanza 478 U/mg, lo que demuestra que esta etapa es fundamental para concentrar la enzima y eliminar impurezas.

Por último, se observa una reducción en la cantidad total de proteínas, de 60 mg en la extracción inicial a 16 mg después de la ultrafiltración. Esto es consistente con un proceso de purificación eficiente, ya que se eliminan proteínas no deseadas y otros compuestos como pigmentos, polifenoles y lípidos, mejorando así la pureza y actividad de la enzima.

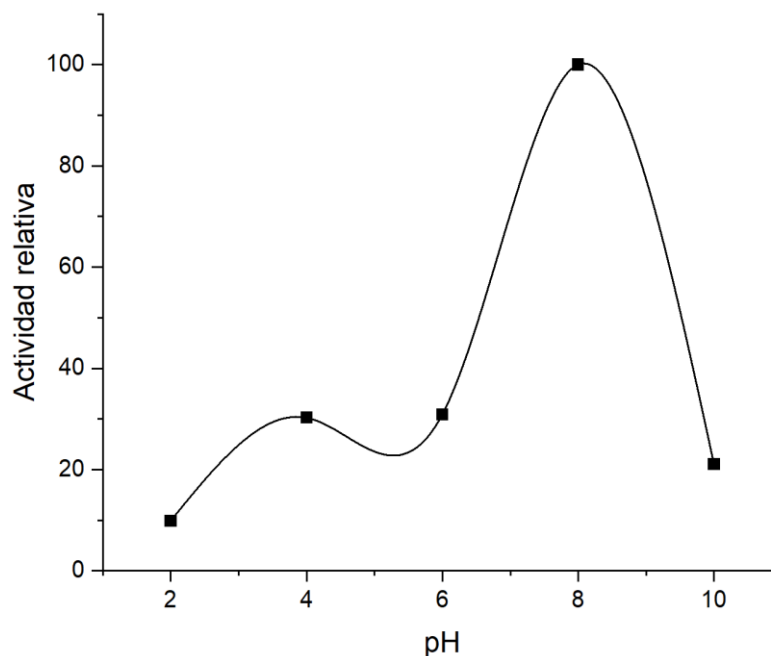
- **Caracterización bioquímica de la peroxidasa de la batata**

Estabilidad frente a variaciones de pH

Se realizaron estudios de pH donde se midió la actividad de los extractos a diferentes pH y se determinó que el pH óptimo es 8.0, en la figura 10 se puede ver que a pH 8.0 la actividad tuvo un aumento significativo respecto a los demás pH.

Figura 10.

Actividad enzimática del extracto de batata a diferentes pH



Algunas peroxidasas (PODs) recientemente extraídas han sido objeto de estudios enfocados en su estabilidad frente a variaciones de pH, temperatura y otros factores fisicoquímicos, con el objetivo de caracterizar su comportamiento en distintas condiciones

experimentales. Por ejemplo, la *festuca arundinacea*, la *lolium perenne* y la HRP presentan pH óptimo de 6.0, 5.0 a 6.0 (Langsdorf et al., 2023) y 7.0 (Lavery et al., 2010) respectivamente. La PCB pierde casi el 80% de actividad a pH 10, sin embargo, en comparación con otras PODs se puede observar que tiene una alta estabilidad a pH 8.0 haciéndola una de las que mejor se desempeña en pH neutro.

Termoestabilidad

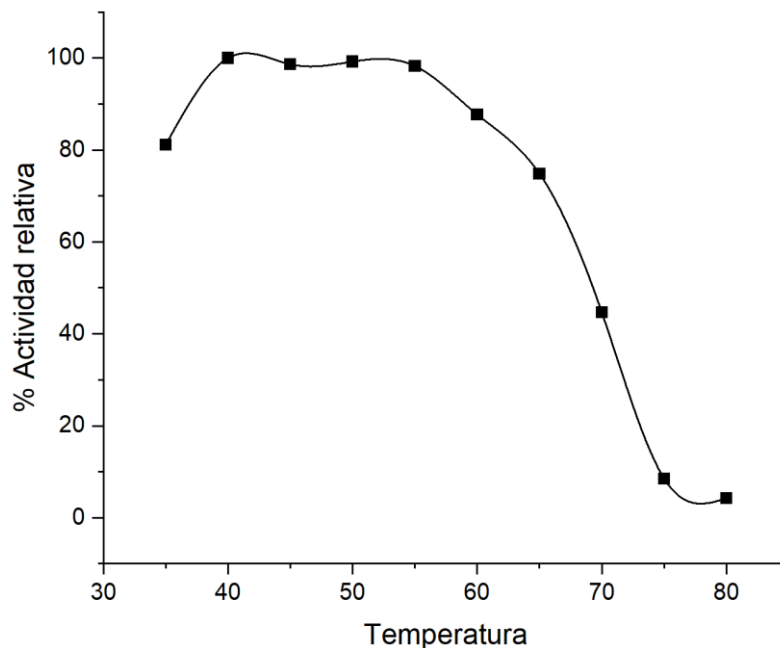
La peroxidasa es una enzima ampliamente estudiada en la industria alimentaria, ya que su resistencia al calor la convierte en un indicador clave para evaluar la eficacia de tratamientos térmicos, como el escaldado de vegetales. Este proceso es fundamental para asegurar la inactivación de enzimas que podrían deteriorar la calidad del producto durante el almacenamiento, provocando cambios indeseables en sabor, color, textura o valor nutricional. Además, comprender la termoestabilidad de la peroxidasa permite optimizar procesos de conservación, garantizando la inactivación enzimática sin comprometer las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos. Por ejemplo, en estudios sobre brócoli, se ha investigado la inactivación de la peroxidasa mediante diferentes métodos de escaldado para determinar las condiciones óptimas que preserven la calidad del producto, equilibrando la eficiencia del tratamiento térmico con la conservación de sus atributos deseables (Soltero, 2018).

Asimismo, comprender cómo funciona la termoestabilidad de la peroxidasa es esencial en aplicaciones biotecnológicas e industriales, ya que permite diseñar procesos que optimizan su actividad catalítica y estabilidad bajo diversas condiciones operativas. Por ejemplo, en la síntesis de resinas fenólicas y adhesivos, la peroxidasa actúa como catalizador, y su estabilidad

térmica es crucial para el éxito de estas aplicaciones. Estudios han demostrado que la peroxidasa puede catalizar la polimerización de fenoles, lo que es fundamental en la producción de estos materiales (Gutiérrez Patricia, 2011).

Figura 11.

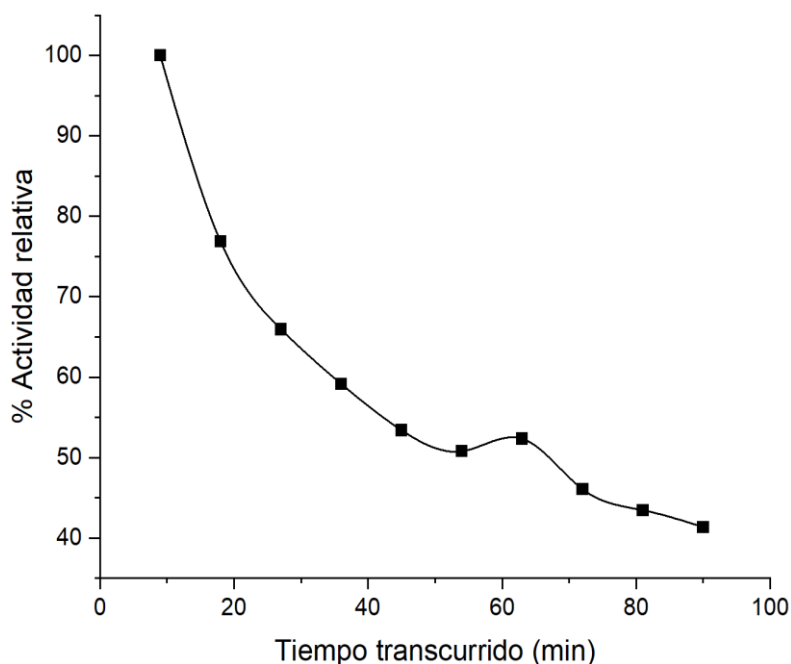
Actividad relativa de la PCB a diferentes temperaturas



Para el estudio de la inactivación térmica de la PCB se calentó una solución que contenía el buffer de extracción con la enzima hasta los 60°C y se mantuvo esta temperatura por 15 minutos tomando alícuotas de 2 mL cada 90 segundos para luego dejarlas enfriar a temperatura ambiente y luego medir su actividad enzimática, en la figura 12 se puede observar la relación entre la actividad y el tiempo transcurrido.

Figura 12.

Actividad relativa de la PCB en función del tiempo



La inactivación térmica ocurre cuando por efectos de la temperatura la enzima sufre una transformación pasando a ser una enzima desnaturalizada. El proceso de inactivación se puede modelar como un proceso de primer orden, en el que la cinética se describe mediante la ecuación (3). En esta ecuación, A_t representa la actividad enzimática en un tiempo específico t , A_0 es la actividad inicial de la enzima, t es el tiempo transcurrido y k es la constante de inactivación térmica, que indica la velocidad a la que la enzima pierde su actividad debido al calor.

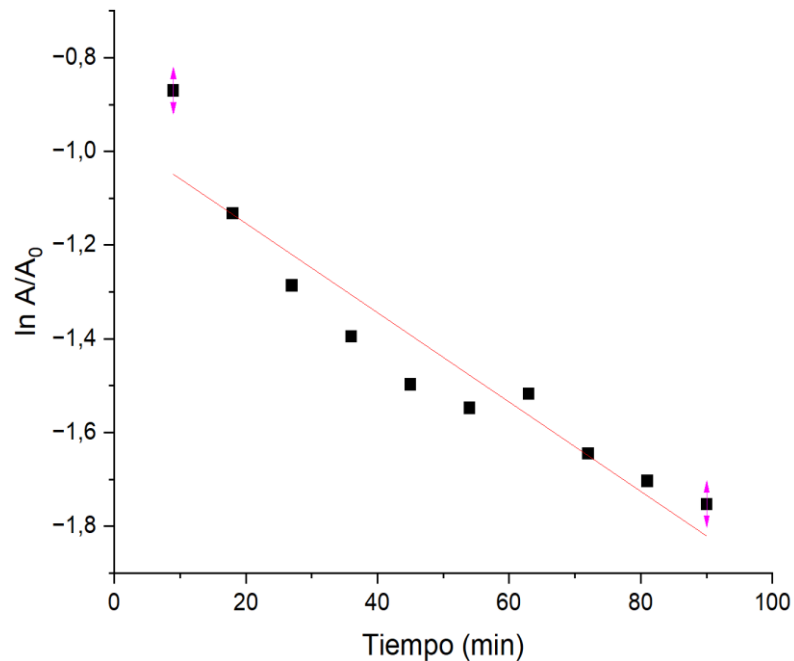
$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-kt} \quad (3)$$

Al aplicar el logaritmo natural a la ecuación, podemos determinar la constante de inactivación trazando un gráfico de $\ln(A_t/A_0)$ contra el tiempo. En la Figura 13 se muestra la línea obtenida, La constante de inactivación k corresponde a la pendiente de la recta ($0,00702 \text{ min}^{-1}$), lo que significa que la PCB pierde esta cantidad de actividad por minuto al ser incubada

a 60°C, la POD del pasto guinea tiene una constante de inactivación muy parecida ($0,008 \text{ min}^{-1}$) al ser incubada a 65°C (Centeno Diana, 2017), la del brócoli (*Brassica oleracea* var. itálica) fue de 0.0231 min^{-1} a 75°C y la de los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea* var. gemmifera) fue de 0.0218 min^{-1} a 75°C (Pérez et al., 2015). Los valores altos de constante de inactivación indican que la enzima se inactiva a mayor velocidad a cierta temperatura, es decir, que tienen una menor estabilidad térmica, esto quiere decir que la PCB tiene una estabilidad térmica alta comparada con las otras PODs ya que su constante de inactivación es menor.

Figura 13.

Cinética de inactivación térmica de la PCB



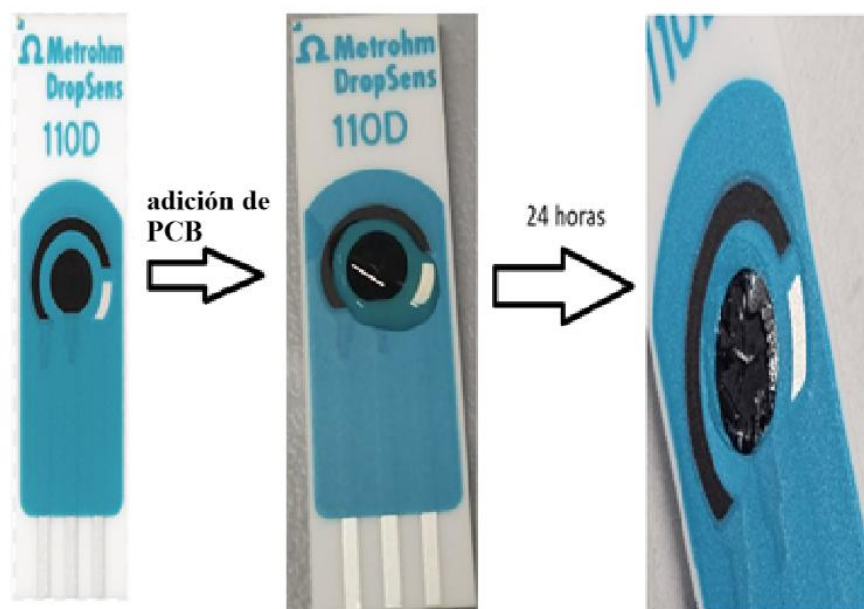
La actividad enzimática normalmente aumenta con la temperatura hasta un punto máximo, luego de esto empieza su desnaturalización, lo que hace que la actividad disminuya notoriamente, esto se puede explicar con la ley de Arrhenius, la cual usa las leyes de la termodinámica para explicar por qué el aumento de la tasa de reacción es directamente

proporcional al aumento de temperatura a causa de la energía cinética. Al pasar una hora de incubación a condiciones de pH 8.0 y temperatura de 65°C la PCB ha perdido solamente el 25% de su actividad enzimática, la peroxidasa de pasto guinea actúa de una forma similar a estas condiciones de temperatura y pH (Centeno Diana, 2017). Este comportamiento es muy recurrente en peroxidasas de otras fuentes a condiciones parecidas ya que también se inactivan. Por ejemplo, la peroxidasa de tabaco pierde su actividad enzimática a 65°C según estudios tras una hora de incubación (S. Gaspar et al., 2000). La PCB sigue un modelo cinético de primer orden, cuya constante de velocidad (K_{inact}) es $7.02 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, esto indica una alta estabilidad. Por otro lado, la HRP presenta una termo estabilidad menor ya que su (K_{inact}) es de $1.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ a 64°C lo que indica que se inactiva casi al doble de velocidad de la PCB.

Modificación de los electrodos mediante técnicas electroquímicas

Figura 14.

Modificación de los ESOG con PCB



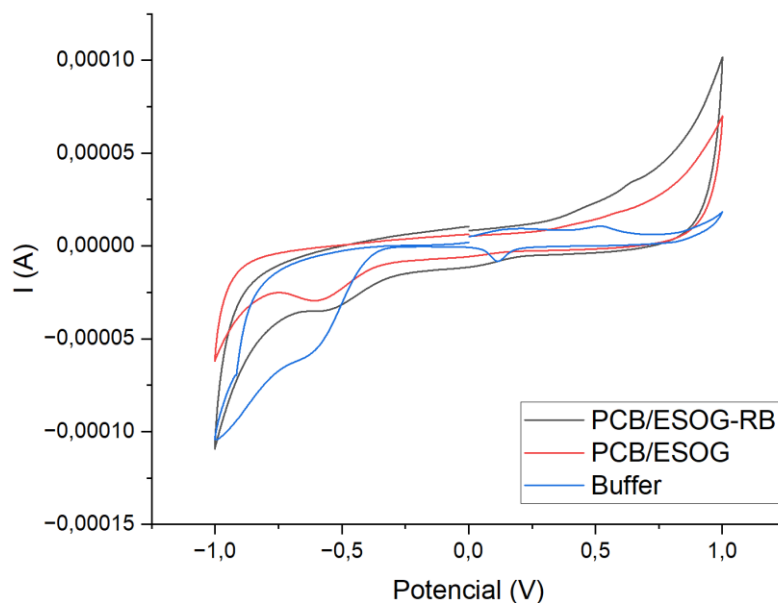
La peroxidasa de batata (PCB) fue inmovilizada en electrodos serigrafados de carbono modificados con óxido de grafeno (ESOG) mediante adsorción física (Figura 14). Para ello, se

depositaron 10 μL del extracto enzimático sobre la superficie del electrodo y se dejó secar a temperatura ambiente en un ambiente seco durante 24 horas, obteniéndose electrodos modificados con peroxidasa de batata (PCB/ESOG).

Posteriormente, se realizaron mediciones de voltamperometría cíclica (VC) para evaluar la adsorción de la peroxidasa de batata (PCB) en cinco electrodos modificados bajo diferentes condiciones. Dos de ellos fueron modificados con extracto crudo de PCB: en uno se adicionó una solución tampón de borato y H_2O_2 (4 mM) antes del análisis electroquímico, mientras que en el otro solo se añadió tampón de borato previo a la medición. Otros dos electrodos fueron modificados con extracto purificado de PCB tras separación en un sistema bifásico acuoso (PCB/RB); en uno de ellos se adicionó tampón de borato y H_2O_2 antes del análisis, mientras que en el otro únicamente se añadió tampón de borato. Finalmente, se utilizó un electrodo control, sin modificación, al cual solo se adicionó H_2O_2 antes de la medición del voltamperograma cíclico. Estos análisis permitieron evaluar la influencia de las diferentes etapas de purificación de la PCB en la respuesta electroquímica de los electrodos modificados.

Figura 15.

Voltamperogramas cíclicos del ESOG modificado con PCB luego de reparto bifásico (negro), ESOG modificado con PCB puro (rojo) y el ESOG solamente con buffer de extracción (azul) medidos a 100mVs-1



Según la ecuación de Nernst, en una reacción donde se transfiere un electrón y que presenta un comportamiento reversible tanto químico como electroquímico, la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p), será de aproximadamente 56.5 mV a 25°C (Bagotsky, 2005). Si este valor es mayor, implica que la velocidad de transferencia de electrones es más lenta comparada con la velocidad de transferencia de masa en el electrolito, lo que afecta la reversibilidad del sistema.

Los datos presentados en la tabla 5 fueron obtenidos en base a la figura 15.

Tabla 5.

Corrientes y voltajes de los VCs de los electrodos modificados

Electrodo	E_{pc} [mV]	E_{pa} [mV]	I_{pc} [μ A]	I_{pa} [μ A]	ΔE_p [mV]	I_{pc}/I_{pa}
PCB/ESOG-RB	-543	645	-34,27	34,75	1188	0,9861871
PCB/ESOG	-619	574	-29,5	17,56	1193	1,6799544
Buffer	-622	524	-58,79	10,79	1146	5,4485635

Al analizar la tabla 5 con la figura 15, se pueden ver diferencias significativas en el comportamiento electroquímico de los electrodos modificados con PCB. Los valores de E_{pc} y E_{pa} muestran que el electrodo PCB/ESOG-RB presenta una reducción a un sobrepotencial menor (-543 mV) en comparación con otros sistemas, lo que sugiere una cinética redox más favorable. Además, el E_{pa} más elevado en este electrodo (645 mV) indica una mayor eficiencia de transferencia electrónica durante la oxidación.

En cuanto a las intensidades de corriente, el electrodo sin modificar (buffer) muestra una corriente catódica (I_{pc}) más negativa, lo que podría atribuirse a una menor eficiencia en la transferencia electrónica debido a la ausencia de actividad enzimática. Por otro lado, el electrodo PCB/ESOG-RB más equilibrados, reflejando un proceso redox más simétrico. La relación I_{pc}/I_{pa} cercana a 1 (0,986) sugiere una reversibilidad electroquímica superior en comparación con el electrodo buffer, que exhibe una relación de 5,45 indicando una asimetría significativa en los procesos redox y una posible menor estabilidad en el sistema.

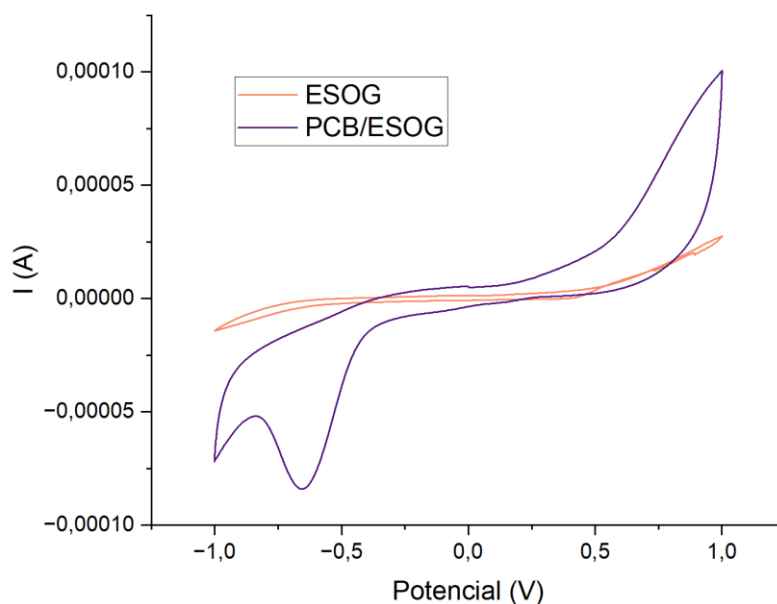
En el voltamperograma se puede ver que el PCB/ESOG-RB alcanza una mayor corriente de pico en comparación con los otros 2. Esto sugiere que la purificación de la enzima mediante técnicas como el reparto bifásico mejora la interacción con el electrodo, optimizando la transferencia electrónica en la reacción. Estudios previos han demostrado que la purificación de peroxidasas a través de sistemas bifásicos acuosos puede mantener la actividad enzimática

y mejorar la eficiencia de purificación (Miranda et al., 1995).

En conclusión, la inmovilización de PCB en electrodos modificados con óxido de grafeno mejora notablemente la respuesta electroquímica en comparación con electrodos no modificados. Además, la purificación de la enzima mediante métodos como el de reparto bifásico contribuye a una mayor eficiencia en la transferencia electrónica, resultando en una mejor actividad redox y una mayor estabilidad en el sistema electroquímico.

Figura 16.

Voltamperogramas cíclicos de PCB/ESOG-RB y ESOG en presencia (morado) y ausencia (naranja) PCB



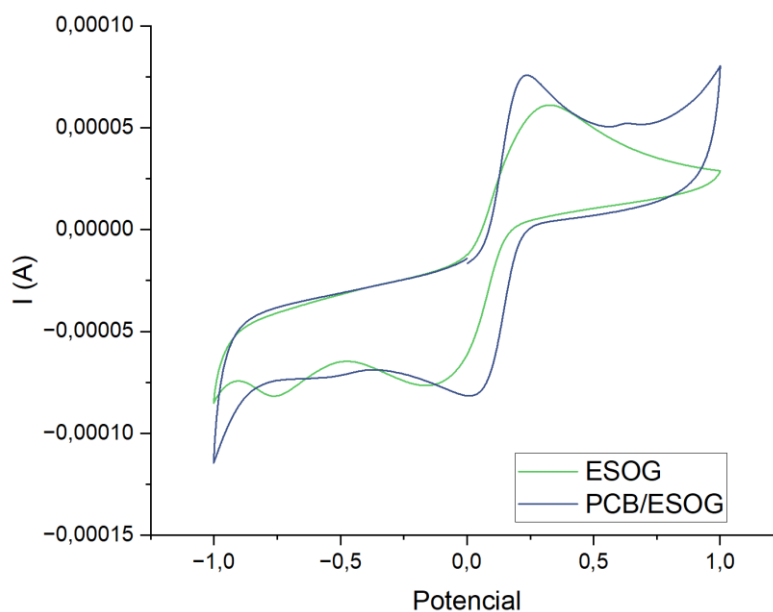
Para evaluar la actividad electrocatalítica de la PCB en la reducción de peróxido de hidrógeno se usó voltamperometría cíclica. Los electrodos modificados con PCB exhibieron una mejora significativa en la actividad electrocatalítica en comparación con los electrodos no modificados. Esta mejora se atribuye a las propiedades catalíticas inherentes en la PCB. En la figura 16 se puede observar que los electrodos modificados demostraron un aumento en la densidad de corriente de pico, esto indica una mayor transferencia de electrones (Villamizar,

Ríos, & Castillo, 2016), sin embargo, si se observan los electrodos no modificados, este comportamiento no es el mismo ya que mostraron una actividad catalítica mínima en condiciones similares.

En los electrodos modificados se puede detectar el pico redox bien definido a -650mV , la presencia de estos picos redox claros y definidos en los electrodos modificados indica que el proceso catalítico fue eficiente y así mismo confirma que la inmovilización e integración de la PCB sobre la superficie del electrodo fue exitosa y esto facilita procesos de transferencia de electrones eficientes (Adachi et al., 2020). Otro punto crucial para comprender el proceso de transferencia de electrones y la cinética es el efecto de la velocidad de barrido ya que se pueden sacar datos sobre el comportamiento redox, la eficiencia de los electrodos modificados y la eficiencia dependiendo de las variaciones de la velocidad (Bhapkar et al., 2023)

Figura 17.

Voltamperograma cíclico de ESOG y PCB/ESOG-RB en presencia de $(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6])$ 10mM con KCl 0.1 M a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1}



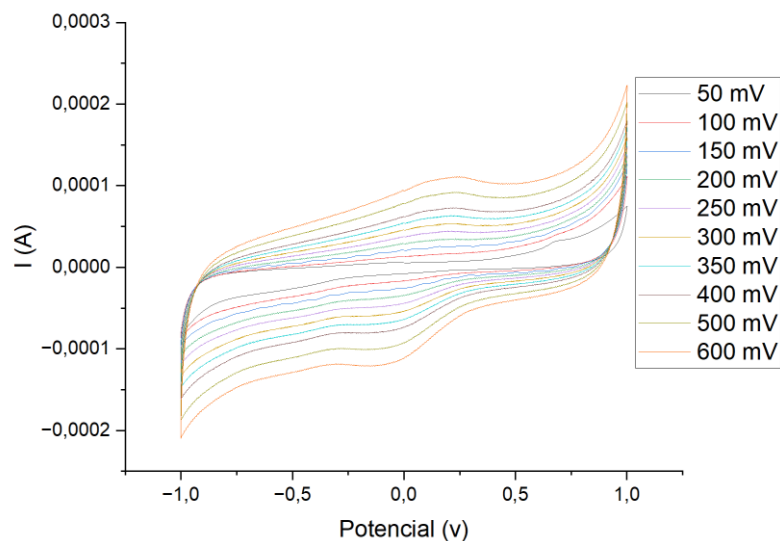
Para evaluar la reversibilidad del proceso de transferencia electrónica redox, se emplea

comúnmente el ion hexacianoferrato (II) como sonda redox debido a sus propiedades bien definidas y reversibles. Este ion facilita la transferencia de electrones entre la superficie del electrodo y las especies electroactivas en biosensores. La voltamperometría cíclica permite usar el hexacianoferrato (II) para indicar la eficiencia de transferencia electrónica en superficies de electrodos modificados. En estudios comparativos se ha investigado el comportamiento del sistema redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ en diferentes materiales de electrodos, como carbón vítreo y diamante dopado con boro, utilizando voltamperometría de corriente muestreada y electrodos de disco rotatorio (Montero & Uribe, 2013). Estos estudios ayudan a comprender la cinética y transporte de masa del sistema redox en diferentes materiales (Espinoza-Montero, 2017). En la figura 17 se observan los VCs del par redox ferrocianuro/ferricianuro en condiciones con y sin la modificación del electrodo con PCB. La incorporación de la PCB en la superficie del electrodo mejora notablemente la reversibilidad de la reacción redox la cual se evidencia por picos de oxidación y reducción bien definidos y simétricos, lo que indica una transferencia electrónica más eficiente. Este comportamiento se aproxima al ideal descrito por la ecuación de Nernst, reflejando una menor separación entre los picos y sugiriendo una alta reversibilidad del proceso. Por el contrario, en ausencia de PCB, el comportamiento electroquímico del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ muestra características de irreversibilidad, manifestadas en una mayor separación entre los picos y una asimetría en los mismos. Los estudios demuestran que la modificación de electrodos con peroxidasas mejora significativamente la transferencia electrónica y la actividad catalítica. (Erika Villamizar, 2016).

Figura 18.

Voltamperograma cíclico de PCB/ESOG a diferentes velocidades de barrido

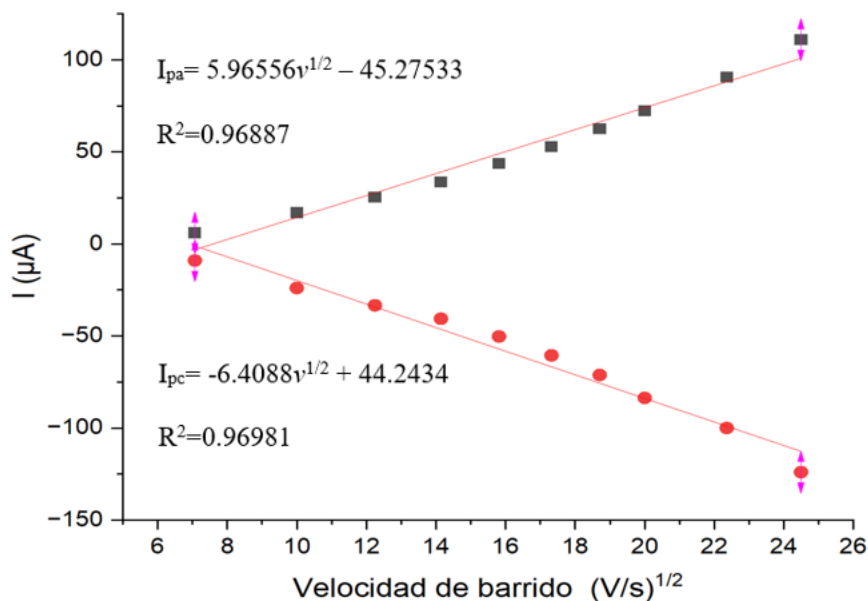
(50,100,150,200,250,300,350,400,500,600 mV s⁻¹) en solución buffer fosfato 10 mM a pH 7.8



En la figura 18 podemos observar los VCs y la relación lineal entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y las corrientes de los picos anódicos y catódicos. Esto indica un proceso típico de transferencia dominado por el movimiento de las especies electroactivas hacia la superficie del electrodo. Para determinar la velocidad de barrido óptima en la detección de H_2O_2 mediante CV, se evaluó el efecto de diferentes velocidades de barrido entre 50 y 600 mV/s, incrementando 50 mV/s en cada medición.

Figura 19.

Voltamperograma cíclico de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido frente a las corrientes catódicas y anódicas.



La figura 19 de I_{pc}/I_{pa} frente a $V^{1/2}$ arroja una ecuación de línea recta para el mecanismo catódico $I_{pc} = -6.4088v^{1/2} + 44.2434$ cuyo R^2 es 0.96981 y para el anódico es $I_{pa} = 5.96556v^{1/2} - 45.27533$ y su R^2 es 0.96887. Los elevados valores de R^2 indican una correlación significativa entre la corriente de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, lo que es característico de un sistema controlado por difusión. Además, se evidencia la ausencia de una tendencia lineal definida que permita clasificar el proceso como completamente reversible o irreversible. Esto confirma que la reducción de H_2O_2 , mediada por la PCB sobre el ESOG, sigue un comportamiento cuasi-reversible.

Tabla 6.

Comparación de parámetros analíticos de electrodos modificados con peroxidasa

<i>Electrodo Modificado</i>	Material del Electrodo	Potencial Redox (V)	Rango Lineal (μM-mM)	Límite de detección (μM)	Referencia
<i>PPR/GA/NTP</i>	Oro	-0,4	5-100	87	(Vargas & Castillo, 2016)
<i>PPG/GF</i>	Grafeno	-0.65	100-4	150	(Guarín-Guio et al., 2019)
<i>PPG/PCs</i>	Puntos cuánticos	-0,64	500-6	45.21	(Centeno et al., 2017)
<i>PPR/QS-GLU/GF</i>	Óxido de indio y estaño	-0,28	165-1,5	200	(Farzana et al., 2013)
<i>PCB/ESOG</i>	Óxido de grafeno	-0,4	250 -5	4.6	(Vega Miguel, 2024)

El electrodo PCB/ESOG, en comparación con otros electrodos, exhibe propiedades eléctricas, mecánicas y electroquímicas superiores, lo que lo convierte en un material altamente eficiente para aplicaciones en sensores. Además, su amplia área superficial favorece una mayor capacidad de inmovilización de biomoléculas, lo que ha facilitado su uso en el diseño y optimización de diversos biosensores con mejoras significativas en la sensibilidad y la estabilidad de la señal electroquímica. (Thangamuthu et al., 2019).

El electrodo PCB/ESOG presenta un potencial redox de -0,4 V, similar al de los electrodos de oro y más favorable en comparación con el de grafeno. En relación con los electrodos de puntos cuánticos, su potencial es mayor, lo que indica que estos últimos requieren una mayor cantidad de energía para llevar a cabo la reacción redox.

En cuanto al rango lineal de detección, el PCB/ESOG exhibe uno de los rangos más

amplios, siendo superado únicamente por el electrodo basado en puntos cuánticos. Esta característica le permite cubrir una amplia gama de concentraciones, lo que lo hace versátil para diversas aplicaciones analíticas.

En términos de sensibilidad, el PCB/ESOG destaca por presentar el límite de detección más bajo entre todos los electrodos comparados, lo que evidencia una capacidad superior para la detección de pequeñas cantidades de analito. Además, muestra un equilibrio óptimo entre el potencial redox y el rendimiento electroquímico, favoreciendo una eficiente transferencia electrónica sin necesidad de aplicar potenciales elevados.

Su amplio rango de trabajo le otorga flexibilidad para múltiples aplicaciones, mientras que el material del electrodo (óxido de grafeno) contribuye significativamente a la mejora de la inmovilización enzimática, lo que se traduce en una mayor estabilidad y reproducibilidad del biosensor.

Esta combinación de propiedades hace del PCB/ESOG una opción altamente eficiente para el desarrollo de biosensores electroquímicos de alto rendimiento.

Tabla 7.

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	146	-105	6	-9	251	1,5
100	156	-112	17	-24	268	1,41
150	166	-115	25,4	-33,4	281	1,31
200	180	-117	33,6	-40,6	297	1,2
250	185	-119	43,6	-50,3	304	1,19
300	190	-119	52,8	-60,6	309	1,14
350	193	-121	62,5	-71,2	314	1,13
400	201	-126	72,2	-83,7	327	1,12
500	203	-128	90,5	-100	331	1,1
600	246	-131	111	-124	377	1,09

Los datos, presentados en la tabla 6 indican que, al aumentar la velocidad de barrido, se puede observar una mayor separación entre los picos anódico y catódico, así como una disminución en la relación I_{pc}/I_{pa} este fenómeno se explica porque, a velocidades de barrido más altas, la capa de difusión en la proximidad del electrodo se reduce, limitando el transporte de masa de los analitos hacia la superficie del electrodo. Como consecuencia:

La separación entre los picos anódico y catódico (ΔE_p) aumenta, evidenciando una mayor influencia de los efectos cinéticos. La relación entre las corrientes de pico (I_{pc}/I_{pa}) disminuye, reflejando un desequilibrio entre los procesos de transferencia de masa y transferencia de carga. Por lo tanto, para mejorar la sensibilidad y resolución en la detección de H_2O_2 utilizando electrodos modificados con PCB, es recomendable operar a velocidades de barrido más bajas. Esto minimiza la separación de picos y mantiene una relación I_{pc}/I_{pa} más equilibrada, optimizando la respuesta electroquímica del sistema. (*Orduz et al., 2019*).

La relación entre I_{pc} e I_{pa} con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$) es una herramienta clave para analizar el comportamiento de un sistema electroquímico. Esta relación está descrita por la ecuación de Randles-Sevcik, la cual establece que, para sistemas reversibles, la corriente de pico (I_p) es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. La ecuación se expresa de la siguiente manera:

$$I_p = (2,69 \times 10^{-5} \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2})$$

Donde:

I_p es la corriente de pico (catódica o anódica),

n representa el número de electrones transferidos durante la reacción redox,

A es el área del electrodo (en cm^2),

D es el coeficiente de difusión del analito (en cm^2/s),

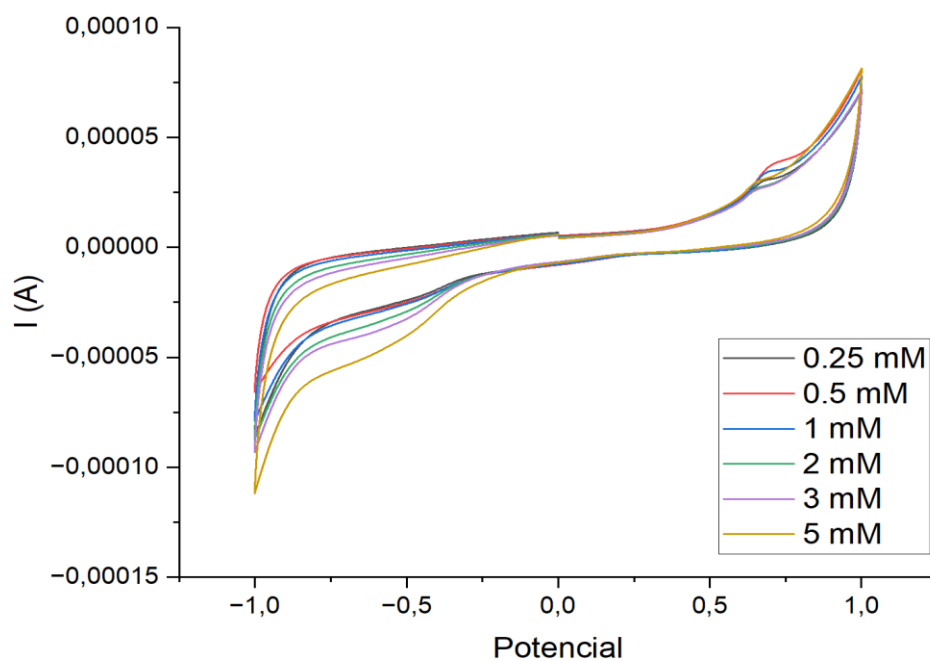
C es la concentración del analito en solución (en mol/cm^3),

v es la velocidad de barrido (en V/s).

Esta ecuación es ampliamente utilizada para evaluar parámetros fundamentales de sistemas electroquímicos, tanto en condiciones reversibles como irreversibles, permitiendo determinar la difusión y el transporte de especies redox en soluciones. (Bard et al., 2001)

Figura 20.

Voltamperograma cíclico (A) diferentes concentraciones de H_2O_2 a velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} .

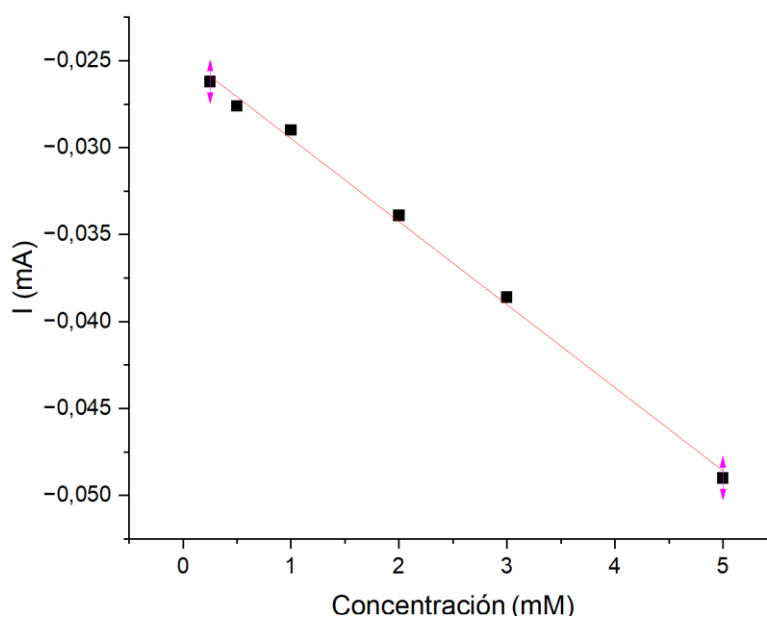


Se realizaron experimentos de CV en presencia de concentraciones variables de H_2O_2 con el fin de evaluar más profundamente la actividad electrocatalítica de los electrodos modificados con PCB. Esto demostró un incremento lineal en la corriente de pico de reducción con el aumento en las concentraciones de H_2O_2 , lo que indica una fuerte respuesta catalítica. Esto sugiere que los electrodos modificados con PCB catalizan eficazmente la reducción de H_2O_2 , esta es una característica muy importante en muchas aplicaciones de biosensores

(Alpeeva et al., 2005), La detección de especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2 , es fundamental debido a su papel en procesos biológicos y patológicos, ya que su medición precisa permite monitorear el estrés oxidativo y evaluar el daño celular. En este contexto, (Singh et al., 2017) desarrollaron un sensor electroquímico basado en HRP para la detección de H_2O_2 , demostrando la importancia de catalizar su reducción en aplicaciones biosensoras. Además, la generación in situ de H_2O_2 posibilita la formación controlada de especies reactivas de oxígeno electrogeneradas, que son intermediarios clave en la detección electroquímica. Un estudio realizado por (Hu et al., 2019) destacó la eficiencia de este mecanismo, subrayando su relevancia en el diseño de biosensores avanzados. Por otro lado, el desarrollo de electrocatalizadores con alta actividad hacia la reducción de H_2O_2 mejora significativamente la sensibilidad y selectividad de los biosensores. En este sentido, (Zhang et al., 2011) demostraron que la síntesis de estructuras de óxido de cobre con morfología de flor es altamente efectiva en la detección de H_2O_2 , resaltando la importancia de su reducción en aplicaciones analíticas.

Figura 21.

Curva de calibración del PCB/ESOG a diferentes concentraciones de H_2O_2 .



El análisis de la gráfica sugiere que los electrodos modificados con PCB presentan una excelente respuesta catalítica frente a la reducción de H_2O_2 , evidenciada por la relación lineal entre la corriente de reducción y la concentración de peróxido de hidrógeno en el rango de de $250 \mu\text{M}$ a 5mM .

El ajuste lineal obtenido, con una ecuación de regresión $I = 4.56[\text{H}_2\text{O}_2] - 42.55$ muestra una pendiente positiva que indica una correlación directa entre el aumento de la concentración de H_2O_2 y la intensidad de corriente. El alto valor de coeficiente de correlación $R^2 = 0.98$ sugiere una fuerte relación lineal, lo que indica que respuesta electroquímica del electrodo modificado es altamente predecible y estable dentro del rango evaluado. Además, el hecho de que los electrodos no modificados presenten solo un ligero aumento en la corriente con la concentración de H_2O_2 refuerza la idea de que la presencia de PCB en los electrodos modificados mejora significativamente la cinética de reducción del peróxido de hidrógeno, proporcionando una mayor eficiencia catalítica.

Estos resultados confirman el potencial de los electrodos modificados para ser utilizados en biosensores enzimáticos, ya que muestran alta sensibilidad, buena estabilidad y una respuesta electroquímica lineal en un amplio rango de concentraciones de H_2O_2 , lo cual es fundamental para aplicaciones en detección electroquímica y análisis clínicos.

5. Conclusiones

Se logró extraer y semi-purificar la peroxidasa de batata (PCB) mediante un protocolo optimizado que demostró ser altamente efectivo, evidenciado por el incremento progresivo de la actividad específica a lo largo de las diferentes etapas del proceso. En la fase inicial de extracción cruda, se obtuvo una actividad específica de 249 U/g con un rendimiento del 100%, lo que representa el punto de referencia para evaluar la eficacia de los posteriores procedimientos de purificación.

Posteriormente, tras la eliminación de pigmentos, se observó un aumento significativo en la actividad específica, alcanzando 343 U/g, acompañado de un rendimiento del 83%. Esta mejora sugiere que la eliminación de compuestos interferentes favorece la exposición de los centros activos de la enzima, optimizando su actividad catalítica. Finalmente, tras el proceso de reparto bifásico acuoso, se obtuvo una actividad específica de 478 U/g con un rendimiento del 51%, lo que evidencia la eficacia de esta técnica en la enriquecimiento de la peroxidasa, pese a la reducción del rendimiento global, lo cual es un fenómeno esperado en procesos de purificación más selectivos.

En el estudio de estabilidad de la PCB frente a variaciones de pH, se determinó que el pH óptimo de actividad enzimática es 8.0, lo que indica un comportamiento catalítico favorable en condiciones ligeramente alcalinas. Este hallazgo es relevante para aplicaciones en sistemas biotecnológicos donde se requieren condiciones específicas de pH para maximizar la eficiencia enzimática. Asimismo, se evaluó la estabilidad térmica de la enzima, encontrando que la PCB mantiene una excelente estabilidad a 60 °C, lo cual es indicativo de una conformación estructural robusta capaz de resistir condiciones de estrés térmico. La constante de inactivación térmica (K_{inact}) fue determinada en $7,02 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, lo que sugiere una cinética de

desactivación lenta y, por ende, una buena estabilidad operacional en aplicaciones prolongadas.

Por otro lado, el sistema PCB/ESOG, basado en la inmovilización de la peroxidasa sobre óxido de grafeno (ESOG), demostró una notable actividad electrocatalítica en la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Este estudio se enfocó en el desarrollo de un método altamente eficiente y sensible para la detección de H_2O_2 , resaltando el potencial de la PCB como biocatalizador capaz de mejorar significativamente el rendimiento electroquímico de electrodos serigrafiados. La elección del óxido de grafeno como material base para la construcción de los electrodos resultó ser un factor determinante, debido a sus propiedades únicas, como una gran área superficial, alta conductividad eléctrica y una excelente compatibilidad con biomoléculas. Estas características favorecen la inmovilización eficiente de la enzima y la transferencia electrónica rápida, lo que se traduce en una mayor sensibilidad y estabilidad del biosensor.

En conclusión, los resultados obtenidos no solo demuestran la viabilidad del uso de la peroxidasa de batata en aplicaciones electroquímicas, sino que también destacan la sinergia entre la enzima y el óxido de grafeno, consolidando al sistema PCB/ESOG como una plataforma prometedora para el desarrollo de biosensores de alto rendimiento en el ámbito de la biotecnología y la electroquímica aplicada.

6. Recomendaciones

- Usar batatas frescas es clave para el estudio, ya que cuando se usan batatas muy maduras o que ya tienen más tiempo de haber sido cosechadas, los datos obtenidos son más bajos en cuanto a calidad de detección, actividad enzimática, entre otros.
- Realizar estudios de especificidad sustrática ya que estos sirven para identificar cuál es el sustrato ideal para el estudio, desarrollar aplicaciones específicas (diagnóstico clínico,

industria alimentaria, biotecnología ambiental), caracterizar la enzima, entre otros.

- Explorar otros procesos de purificación como técnicas cromatográficas, ultrafiltración, electroforesis en gel, esto con el fin de lograr un nivel de pureza mayor al obtenido.
- El proceso de semipurificación se puede hacer un poco más extenso, enfocándose en la separación de proteínas con el fin de tener un extracto con menos interferencias.

Referencias

- Adachi, T., Kitazumi, Y., Shirai, O., & Kano, K. (2020). Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis of Redox Enzymes at Nanostructured Electrodes. *Catalysts* 2020, Vol. 10, Page 236, 10(2), 236. <https://doi.org/10.3390/CATAL10020236>
- Alpeeva, I. S., Niculescu-Nistor, M., Leon, J. C., Csöregi, E., & Sakharov, I. Y. (2005). Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(5), 742–748. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2005.01.008>
- Álvarez Pérez, E., De La Escosura Muñiz, A., & Fernández Gavela, A. (2020). *PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ELECTRODOS DE PAPEL PARA APLICACIONES EN BIOSENSORES*.
- Arizio, C. M., Hompanera, N., Suarez, E. Y., & Manifesto, M. M. (2009). Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) collection using microsatellites. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 7(2), 135–138. <https://doi.org/10.1017/S147926210809847X>
- Ayala Marcela. (1999). *Heme Peroxidases*. www.rsc.org/books
- Bagotsky, V. S. (2005). Fundamentals of Electrochemistry: Second Ed. *Fundamentals of Electrochemistry: Second Ed.*, 1–722. <https://doi.org/10.1002/047174199X>
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., & Wiley, J. (2001). *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*.
- Bhapkar, S., Choudhari, U., Jadhav, U., & Jagtap, S. (2023). Evaluation of soybean peroxidase - Copper phosphate mediated organic-inorganic hybrid for hydrogen peroxide biosensor application. *Sensors International*, 4, 100242. <https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2023.100242>
- Boix, M. (2020). *FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE TRABAJO FIN DE GRADO TÍTULO: Biosensores enzimáticos electroquímicos en la industria alimentaria*.
- CANO, M. P., de ANCOS, B., & LOBO, G. (1995). Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities in Papaya During Postharvest Ripening and After Freezing/Thawing. *Journal of Food Science*, 60(4), 815–817. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1995.TB06236.X>

Centeno Diana. (2017). *SEMI-PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PEROXIDASA DE PASTO GUINEA (Panicum maximum)*.

Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. (1999). Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH. *Biochemistry*, 39(1), 263–270.
<https://doi.org/10.1021/BI990729O>

Erika Villamizar. (2016). *DESARROLLO DE UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO BASADO EN LA COINMOVILIZACIÓN DE QUITOSANO Y PEROXIDASA DE PALMA REAL (Roystonea regia) SOBRE ELECTRODOS DE GRAFENO*. Universidad Industrial de Santander.

Espinoza-Montero, P. J. (2017). Estudio Comparativo de los Parámetros Cinéticos del Sistema Fe(CN)₆^{3-/4-} en Carbón Vítreo y Diamante Dopado con Boro, Mediante Voltamperometría de Corriente Muestreada y Disco Rotatorio. *Química Central*.
https://www.academia.edu/105641565/Estudio_Comparativo_de_los_Parámetros_Cinéticos_del_Sistema_Fe_CN_6_3_4_en_Carbón_Vítreo_y_Diamante_Dopado_con_Boro_Mediante_Voltamperometría_de_Corriente_Muestreada_y_Disco_Rotatorio

Farghaly, O. A., Hameed, R. S. A., & Abu-Nawwas, A.-A. H. (2014). Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. *Int. J. Electrochem. Sci*, 9, 3287–3318.
www.electrochemsci.org

Flohé, L. (1978). Glutathione Peroxidase: Fact and Fiction. *Ciba Foundation Symposium*, 65, 95–122.
<https://doi.org/10.1002/9780470715413.CH7>

Franklin, B. (2011). *Capítulo 1. Las enzimas*.

Gabilondo, & Julieta. (2015). *Compuestos antioxidantes presentes en dos cultivares de batata (Ipomoea batata L.; Lam) de pulpa naranja, en el producto fresco y procesado como dulce*.

García-Méndez, A. D., Pérez-Darniz, M. Y., García-Méndez, A. A., & Madriz-Iztúriz, P. M. (2016). Caracterización postcosecha y composición química de la batata (Ipomoea batatas (L.) Lamb.) variedad Topera. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 287.
<https://doi.org/10.15517/AM.V27I2.21426>

- Gaspar, S., Popescu, I. C., Gazaryan, I. G., Gerardo Bautista, A., Sakharov, I. Y., Mattiasson, B., & Csöregi, E. (2000). Biosensors based on novel plant peroxidases: a comparative study. *Electrochimica Acta*, *46*(2–3), 255–264. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(00\)00580-6](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00580-6)
- Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F. J., & Greppin, H. (1985). A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*, *64*(3), 418–423. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1985.TB03362.X>
- Gutierrez Patricia. (2011). *ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO Ingeniera en Biotecnología*.
- Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, *486*(1), 10–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9)
- 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 : A Publication of the Protein Society*, *10*(1), 108–115. <https://doi.org/10.1110/PS.37301>
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, *6*(4), 185–205. <https://doi.org/10.1007/S12154-013-0102-9/METRICS>
- Hu, Q., Yang, J., Zheng, Z., Ding, Y., Chen, Y., & Gao, W. (2019). In situ H₂O₂ generation with gold nanoflowers as the coreactant accelerator for enzyme-free electrochemiluminescent immunosensing. *Biosensors & Bioelectronics*, *143*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2019.111627>
- Huamán Zósimo. (1992). *Botanica Sistemática y Morfología de la Planta de Batata o Camote*.
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, *77*(5), 598–625. <https://doi.org/10.1189/JLB.1204697>
- Kopp, P., & Cooper, D. (2013). *Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism* (pp. 48–74). Lippincott, Williams & Wilkins. <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/thyroid-hormone-synthesis-thyroid-iodine-metabolism-3>
- Langsdorf, A., Volkmar, M., Ulber, R., Hollmann, F., & Holtmann, D. (2023). Peroxidases from grass clippings for the removal of phenolic compounds from wastewater. *Bioresource Technology*

Reports, 22, 101471. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2023.101471>

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

Leon, J. C., Alpeeva, I. S., Chubar, T. A., Galaev, I. Y., Csoregi, E., & Sakharov, I. Y. (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163(5), 1011–1019. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00275-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00275-3)

Macedo Luis. (2012). *Determinación microelectroanalítica de hemoglobina humana*.

McDonald, A. G., & Boyce, S. (2001). Enzyme Classification and Nomenclature. *Classification and Nomenclature*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000710.pub3>

Miranda, M. V., Lahore, H. m. F. andez, & Cascone, O. (1995). Horseradish peroxidase extraction and purification by aqueous two-phase partition. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995 53:2, 53(2), 147–154. <https://doi.org/10.1007/BF02788604>

Mizobutsi, G. P., Finger, F. L., Ribeiro, R. A., Puschmann, R., Neves, L. L. de M., & da Mota, W. F. (2010). Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp. *Scientia Agricola*, 67(2), 213–217. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162010000200013>

Montero, P. J. E., & Uribe, B. A. F. (2013). Estudio Comparativo de los Parámetros Cinéticos del Sistema Fe(CN)₆^{3-/4-} en Carbón Vítreo y Diamante Dopado con Boro, Mediante Voltamperometría de Corriente Muestreada y Disco Rotatorio. *Química Central*, 3(2), 19–24.
<https://doi.org/10.29166/QUIMICA.V3I2.1209>

Müftügil, N. (1985). The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 877–880.
<https://doi.org/10.1002/JSFA.2740360918>

Ordúz, A. E., Gutiérrez, J. A., Blanco, S. I., & Castillo, J. J. (2019). Amperometric detection of triclosan with screen-printed carbon nanotube electrodes modified with Guinea Grass (*Panicum maximum*)

peroxidase. *Universitas Scientiarum*, 24(2), 363–379. <https://doi.org/10.11144/JAVERIANA.SC24-2.ADOT>

Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochem Anal Biochem*, 6, 308.

<https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>

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, J., Santos, M. V., Califano, A., & Zaritzky, N. E. (2015). *OBTENCIÓN DE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE PEROXIDASA EN CRUCÍFERAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO INDUSTRIAL DE VEGETALES PRECOCIDOS CONGELADOS*.

Pezzotti, I. ., & Luperini, A. (2013). *Construcción de un biosensor amperométrico y su instrumentación usando microelectrodos de 4 pozos*.

Robinson, D. S., & Eskin, N. A. M. (1991). *Oxidative enzymes in foods*. 251–252.

Rodrigo, C., Rodrigo, M., Alvarruiz, A., & Frígola, A. (1996). Thermal Inactivation at High Temperatures and Regeneration of Green Asparagus Peroxidase. *Journal of Food Protection*, 59(10), 1065–1071. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.10.1065>

Rojas-Reyes, J. O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Castro Matinez, C., Waliszewski, K. N., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2014). Purification and characterization of peroxidase from avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1844–1853. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6503>

Romero, M. R., Ahumada, F., Garay, F., & Baruzzi, A. M. (2010). Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. *Analytical Chemistry*, 82(13), 5568–5572.

https://doi.org/10.1021/AC1004426/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2010-004426_0006.JPEG

Sakharov, I. Y., Ardila, G. B., & Sakharova, I. V. (1999). PEROXIDASA DE PLANTAS TROPICALES. *Revista Colombiana de Química*, 28(1), 97–106.

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/17382>

Shannon, L. M., Kay, E., & Lew, J. Y. (1966). Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots: I.

ISOLATION AND PHYSICAL PROPERTIES. *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)

Singh, P., Srivastava, S., & Singh, S. K. (2017). H₂O₂ sensing through electrochemically deposited thionine coated ITO thin film. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 63(6), 56–59. <https://doi.org/10.14715/CMB/2017.63.6.12>

Soltero, C. (2018). *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS*.

Thangamuthu, M., Hsieh, K. Y., Kumar, P. V., & Chen, G. Y. (2019). Graphene- and Graphene Oxide-Based Nanocomposite Platforms for Electrochemical Biosensing Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 2975. <https://doi.org/10.3390/IJMS20122975>

Thomas, E. L., Bozeman, P. M., Jefferson, M. M., & King, C. C. (1995). Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(7), 2906–2913. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.7.2906>

Torres Eduardo. (2014). *Biosensores enzimáticos*. <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art97/>

Valero Gaspar. (2018). *La alimentación española características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta*. www.mapama.gob.es

Veitch, N. C. (2004a). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>

Veitch, N. C. (2004b). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*, 3(1–2), 3–18. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047799.17604.94/METRICS>

Velasco-Garcia, M. N., & Mottram, T. (2003). Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*, 84(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(02\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(02)00236-2)

Villamizar, E. N., Ríos, C. A., & Castillo, J. J. (2016). A Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Immobilization of the Highly Stable Royal Palm Tree Peroxidase (*Roystonea regia*) with Chitosan

and Glutaraldehyde on Screen-printed Graphene Electrodes. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60(3), 135–140. <https://doi.org/10.29356/JMCS.V60I3.95>

Villamizar, E. N., Ríos, C. A., Castillo, J. J., Villamizar, E. N., Ríos, C. A., & Castillo, J. J. (2016). A Hydrogen Peroxide Biosensor Based on the Immobilization of the Highly Stable Royal Palm Tree Peroxidase (*Roystonea regia*) with Chitosan and Glutaraldehyde on Screen-printed Graphene Electrodes. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60(3), 135–140. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2016000300135&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Voet, Donald., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*.

Zhang, L., Yuan, F., Zhang, X., & Yang, L. (2011). Facile synthesis of flower like copper oxide and their application to hydrogen peroxide and nitrite sensing. *Chemistry Central Journal*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-75>