

Detección de L-DOPA utilizando peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) inmovilizada
sobre electrodos modificados con nanopartículas de oro

Laura Cecilia Rojas García

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

John Jairo Castillo León

Doctor en Química

Codirector

Hermín Sul De Jesús Cano Calle

Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A mis padres y hermanos, por su amor y apoyo incondicional.

Agradecimientos

A Dios.

A mis padres, Melba Cecilia y Laureano, por su apoyo incondicional, por sus sacrificios y amor infinito. Por enseñarme el valor de la perseverancia y a creer en mí incluso en los momentos que yo no lo hacía.

A mis hermanos, Wilson y Moisés, por su cariño y compañía a lo largo de este proceso.

A mi hermano Juan Rodrigo, por su amor, guía y apoyo constante. Gracias por estar presente en cada paso y por motivarme a seguir adelante, sin ti esto no habría sido posible.

A mis niños; Tom, Luna, Uva, Miniuva y Ares.

A mi amiga Silvia, gracias por las risas y por compartir conmigo estos años de carrera, a su familia, por abrirme las puertas de su hogar y hacerme sentir siempre bienvenida.

A Valentina, persona con la que compartí mi paso por el lab 404, gracias por compartir conmigo momentos de frustración, risas y logros.

A los profesores John Jairo y Herminul por su orientación, paciencia y guía a lo largo de la realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de carrera, Paula A, Juan F, Kevin M, Diego A, Silvia J, Angel F, Nathalie, Carolina T, Cathalina M, Brighit M y demás que hicieron parte en este caminar, gracias por todos los momentos de triunfos y frustraciones compartidas y por compartir conmigo un poquito de sus vidas, los llevo siempre en mi corazón.

A mi abuela Isidra por sus oraciones.

A compañeros y profesores de los laboratorios 404 y 403, en especial a Yuly, Karen,

Yuliany, Mayra y Joan, gracias por acompañamiento y orientación.

A demás familiares y amigos que aportaron su granito de arena.

Tabla de contenido

Introducción	15
1.Marco de referencia	17
2.Marco teórico	21
2.1. Dopamina.....	21
2.2 Enfermedad del Parkinson	22
2.3 L-DOPA.....	23
2.3.1.Oxidación de la L-DOPA.....	24
2.4. Enzimas.....	25
2.5. Oxidorreductasas.....	26
2.6. Peroxidasas	26
2.6.1. Ciclo catalítico de las peroxidasas	28
2.6.2. Fuentes de extracción de peroxidasas	30
2.7. Electroodos serigrafiados.....	32
2.8. Biosensores	33
2.9. Biosensores electroquímicos.....	33
2.10. Biosensores electroquímicos con peroxidasas	34
2.11. Generalidades de la pasto guinea (<i>Panicum Maximum</i>).....	34
2.12. Voltamperometría cíclica.....	35
3.Metodología	39
3.1. Reactivos.....	39
3.2.Recolección y extracción de la peroxidasa	39

3.3. Eliminación de pigmentos por reparto bifásico	39
3.4. Ultrafiltración.....	40
3.5. Medición de la concentración de proteína por el método BCA.....	40
3.6. Determinación de la actividad enzimática	40
3.7. Inmovilización de la peroxidasa en los electrodos de nanopartículas de oro	41
3.7.1. Evaluación de la respuesta del electrodo modificado frente al peróxido de hidrógeno.....	42
3.8. Preparación de muestras a partir de pastillas de LD	42
3.8.1. Caracterización de muestras por FT-IR y UV-VIS.....	43
3.9. Determinación de la concentración óptima de LD mediante cinética enzimática por UV-Vis...	43
3.10. Evaluación de respuesta del electrodo modificado frente a L-Dopa	44
4. Análisis y resultados	45
4.1 Extracción y semi-purificación de la PPG	45
4.1.1 Tratamiento estadístico de la actividad enzimática durante las etapas de extracción y semipurificación de la PPG.....	50
4.2 Inmovilización de la peroxidasa en los electrodos de nanopartículas de oro	52
4.2.1. Evaluación de la respuesta del electrodo modificado frente al peróxido de hidrógeno.....	53
4.3. Caracterización de las muestras de L-Dopa a través de FT-IR y UV-Vis	55
4.4 Determinación de la concentración óptima de LD mediante cinética enzimática por UV-Vis	56
4.5. Evaluación de respuesta del electrodo modificado frente a L-Dopa a través de voltamperometría cíclica.....	58
4. Conclusiones	62

5. Recomendaciones.....	64
Referencias Bibliográficas	65
APÉNDICES.....	78

Lista de tablas

Tabla 1 Descripción general de varios enfoques electroquímicos reportados para la detección de la L-DOPA.....	18
Tabla 2 Biosensores electroquímicos para la detección de H ₂ O ₂ basados en peroxidasas extraídas de fuente vegetal.....	20
Tabla 3 Clasificación de la superfamilia PCAT según su origen	28
Tabla 4 Fuentes de extracción y actividades de las peroxidasas vegetales	31
Tabla 5 Clasificación de reversibilidad en CV	38
Tabla 6 Tabla de purificación para la PPG	49
Tabla 7 Resultados estadísticos del primer proceso de extracción de la PPG	50
Tabla 8 Resultados estadísticos del segundo proceso de extracción de la PPG	50
Tabla 9 Valores de corriente y potencial de los picos anódicos y cátodicos de voltamperogramas cíclicos de los sistemas estudiados	59

Lista de figuras

Figura 1 Estructura molecular de la dopamina	21
Figura 2 Neurona dopaminérgica en enfermedad de Parkinson (Disminución de la producción de dopamina.....	22
Figura 3 Estructura molecular de la LD.....	23
Figura 4 Reacción de oxidación catalizada por la peroxidasa a partir de hojas de pasto guinea (PPG) de L-DOPA a Dopaquinona.....	25
Figura 5 Ciclo catalítico de la peroxidasa, grupo hemo	30
Figura 6 Esquema de un SPE con sus partes	32
Figura 7 Esquema generalizado de un biosensor.....	34
Figura 8 Imagen de la pasto guinea	35
Figura 9 Esquema de barrido triangular de potencial y la respuesta redox en Voltamperometría cíclica	36
Figura 10 Forma de un voltamperograma cíclico.....	37
Figura 11 Montaje experimental para las mediciones de voltamperometría cíclica.....	41
Figura 12 Etapas de extracción y semi-purificación de la peroxidasa pasto guinea (A) Extracción (B) Centrifugación (C) Reparto bifásico (D) Ultrafiltración	46
Figura 13 Modificación de los Au-SPGE con PPG.....	52
Figura 14 Voltamperograma cíclico de los electrodos con solucion 0,1 mM de H ₂ O ₂ a 50 mV/s de (a) Au-SPGE (b) Au-SPGE/PPG	54
Figura 15 Mecanismo de la reducción bioelectrocatalítica del peróxido de hidrógeno en electrodos modificados con PPG	54
Figura 16 Espectro experimental FT-IR de L-DOPA.....	55

Figura 17 Espectro experimental UV-Vis de L-DOPA	56
Figura 18 Generación del dopacromo a partir de la oxidación de la LD	58
Figura 19 Voltamperogramas cíclicos evaluados en tres diferentes sistemas: (a) Electrodo Au-SPCE con PPG inmovilizada, LD y H ₂ O ₂ 5 mM, (b) Electrodo Au-SPCE con PPG inmovilizada y LD y (c) Electrodo Au-SPCE y LD	58
Figura 20 Voltamperogramas cíclicos del electrodo Au-SPCE con PPG inmovilizada a diferentes concentraciones de LD	60

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice A Curva de Calibración para cuantificación de proteínas.	78
---	----

Abreviaturas

°C: Grados Celsius

μL: Microlitros

AH₂: Sustrato reductor

BSA: Albúmina de Suero Bovino

DA: Dopamina

PPG: Peroxidasa de hojas de pasto guinea

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HRP: Peroxidasa de Rábano Picante

I: Corriente

kDa: Kilodalton

LD: Levodopa

mA: Miliamperios

mL: Mililitros

mM: Milimolar

mV: Milivoltios

nm: Nanómetros

p/p: Peso/peso

PEG: Polietilenglicol

POD: Peroxidasa

RB: Reparto bifásico

UF: Ultrafiltrado

VC: Voltamperograma cíclico

Au-SPCE: Electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de oro

Au-SPCE/PPG: Electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de oro con PPG inmovilizada

Resumen

Título: Desarrollo de un biosensor electroquímico voltamperométrico para la detección de L-DOPA utilizando peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*) inmovilizada sobre electrodo modificados con nanopartículas de oro.

Autor: Laura Cecilia Rojas Garcia

Palabras Clave: levodopa, peroxidasa, biosensores, electrodos serigrafiados.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo crónico y progresivo causado por la deficiencia de dopamina en el sistema nervioso central, cuyo tratamiento farmacológico de primera línea es la levodopa (LD). Dado que su manejo clínico requiere un monitoreo continuo de los niveles del fármaco en matrices biológicas, y que los métodos analíticos convencionales como el HPLC presentan limitaciones de costo y accesibilidad, en el presente trabajo se desarrolló y caracterizó un biosensor electroquímico basado en un electrodo serigrafiado de oro (Au-SPCE) modificado con la peroxidasa de pasto guinea (*Panicum maximum*, PPG) para la detección de LD.

La extracción y purificación parcial de la PPG se realizó a partir de una incubación en buffer fosfato (PB) a pH 7, seguida de centrifugación para la eliminación de residuos, fraccionamiento mediante sistema de reparto bifásico acuoso con polietilenglicol (PEG) al 14% y sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 10% y ultrafiltración con membranas Amicon de 30 kDa, obteniéndose una actividad específica de 223,3 U/mg.

La evaluación electroquímica del electrodo Au-SPCE permitió identificar una señal de oxidación de la levodopa alrededor de +0,18 V. La incorporación de PPG y H_2O_2 modificó la respuesta voltamétrica, evidenciando la participación del componente enzimático en el proceso de detección. El potencial obtenido fue comparable e incluso ligeramente inferior al reportado para otros sistemas de detección de levodopa, lo que destaca el potencial del sistema desarrollado como alternativa para su detección electroquímica.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director John Jairo Castillo León. Doctor en química. Codirector Hermínul de Jesús Cano Calle. Doctor en química.

Abstract

Title: Development of a voltammetric electrochemical biosensor for the detection of L-DOPA using guinea grass peroxidase (*Panicum maximum*) immobilized on gold nanoparticle-modified electrodes.

Author: Laura Cecilia Rojas Garcia **

Key Words: Levodopa, Peroxidase, Biosensors

Parkinson's disease is a chronic and progressive neurodegenerative disorder caused by dopamine deficiency in the central nervous system, whose first-line pharmacological treatment is levodopa (LD). Since its clinical management requires continuous monitoring of drug levels in biological matrices, and conventional analytical methods such as HPLC present cost and accessibility limitations, this work reports the development and characterization of an electrochemical biosensor based on a gold screen-printed electrode (Au-SPCE) modified with guinea grass peroxidase (*Panicum maximum*, PPG) for the detection of LD.

The extraction and partial purification of PPG was performed by incubation of the plant material in phosphate buffer (PB) at pH 7, followed by centrifugation to remove cellular debris, fractionation through an aqueous two-phase system with 14% polyethylene glycol (PEG) and 10% ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), and ultrafiltration using 30 kDa Amicon membranes, yielding an enzymatic preparation with a specific activity of 223.3 U/mg.

The electrochemical evaluation of the Au-SPCE electrode allowed the identification of a levodopa oxidation signal at approximately +0.18 V. The incorporation of PPG and H₂O₂ modified the voltammetric response, evidencing the participation of the enzymatic component in the detection process. The potential obtained was comparable to, and slightly lower than, those reported for other levodopa detection systems, highlighting the potential of the developed system as an alternative for its electrochemical detection.

*Degree Work

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director John Jairo Castillo León. Doctor in chemistry. Codirector Herminul de Jesús Cano Calle. Doctor in chemistry.

Introducción

La dopamina (DA) es un neurotransmisor monoamínico importante para la señalización en el sistema nervioso central y periférico, es responsable de funciones importantes en el cerebro humano como lo es la memoria, el aprendizaje y el movimiento (Tai, M. et al., 2024). Desequilibrios en los niveles neurotransmisor conllevan a diversas patologías neurodegenerativas complejas para el ser humano. Niveles bajos de dopamina conducen a la enfermedad del Parkinson, la cual es un trastorno crónico y progresivo que afecta a millones de personas en todo el mundo, siendo la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente después del Alzheimer. La carencia de DA compromete críticamente funciones motoras, manifestándose en temblor en reposo, rigidez muscular, inestabilidad postural, entre otros. (Bloem, B. et al, 2021; Tai, M. et al., 2024)

La levodopa (LD) es la molécula precursora de la dopamina en el cuerpo humano, las neuronas dopaminérgicas la convierten en dopamina por acción de la enzima DOPA descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, debido a que la dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica y la LD sí, esta es utilizada como tratamiento farmacológico para tratar la enfermedad del Parkinson, siendo el más utilizado alrededor del mundo. Si bien la LD ha demostrado ser el fármaco más eficaz para el control de la enfermedad, su manejo clínico es complejo; presenta gran variabilidad farmacocinética entre pacientes, y su uso prolongado es asociado con complicaciones como las fluctuaciones motoras y la discinesia provocada por el fármaco. Debido a esto, un monitoreo a los niveles de LD en matrices biológicas es fundamental para garantizar un buen régimen de dosificación y mejora en el tratamiento. (Quintino, M. et al., 2006; Mazloun-Ardakani, M. et al., 2006; Crapnell, R. y Banks, C- 2023; LeWitt, P. (2008).

Si bien, los métodos analíticos convencionales utilizados para la detección de la LD, tales como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrometría de masas, garantizan alta sensibilidad y selectividad, dichas técnicas requieren equipos caros, personal especializado y demás limitaciones que dificultan su implementación en entornos con recursos limitados y perjudica al monitoreo continuo del tratamiento. (Aradi, S. y Hauser, R. 2020)

Debido a esto, los sensores electroquímicos surgen como alternativa para la detección ofreciendo rapidez de respuesta y bajo costo operativo, es el caso de los electrodos serigrafiados de carbono que al ser modificados con nanopartículas de oro (AuNPs) aportan buena conductividad eléctrica, biocompatibilidad y capacidad de facilitar la transferencia electrónica con moléculas biológicas (Ruan et al, 1998). Sobre esta plataforma, la incorporación de una peroxidasa de origen vegetal confiere al biosensor su carácter enzimático (Ruzgas T. et al., 1996) Las peroxidases vegetales catalizan la oxidación de sustratos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno y teniendo en cuenta la presencia del grupo catecol en la estructura molecular de la LD, esta clase de enzima resulta adecuada para mediar la respuesta electroquímica frente al analito de interés, en esta investigación se empleó una peroxidasa extraída del pasto guinea (*Panicum maximum*), una gramínea tropical de amplia distribución en América latina y con alta disponibilidad en Colombia.

En este ámbito, el presente trabajo propone el desarrollo y caracterización de un biosensor electroquímico basado en un electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de oro e inmovilizado con la peroxidasa parcialmente extraída de *Panicum maximun*, orientado a la detección de LD. El uso de esta enzima, extraída de una fuente vegetal de bajo costo y amplia

disponibilidad, junto con electrodos serigrafiados desechables, representa una alternativa económicamente viable frente a métodos analíticos convencionales para la detección de LD. Además, las capacidad de la PPG de establecer la transferencia de electrones sin necesidad de mediadores redox externos proporciona al sistema una configuración simplificada y libre de mediadores externos, con potencial para su aplicación en el monitoreo terapéutico del fármaco en entornos clínicos y de recursos limitados.

1. Marco de referencia

La levodopa (L-DOPA) (LD), aislada por primera vez a inicios del siglo XX a partir de plantas de *Vicia Faba* en su primer etapa de desarrollo por Torquato Torquati y cuya estructura química fue establecida por Guggenheim en 1913, adquirió importancia neuro farmacológica cuando Peter Holtz describió en 1938 la enzima L-Dopa descarboxilasa, responsable de su conversión a dopamina. Posteriormente, los resultados de Kathleen Montagu en 1957, junto con los estudios de Bertler y Rosengren, y de Sano et al. en 1959, demostraron la presencia y distribución de la dopamina en el encéfalo, mientras que Ehringer y Hornykiewicz realizaron en 1961 el primer ensayo clínico con LD intravenosa, observando una mejoría significativa, y Cotzias et al. Consolidaron en 1967 el tratamiento farmacéutico, estableciendo a la LD como el tratamiento de referencia en la enfermedad de Parkinson. El desarrollo de diferentes sistemas de detección para la cuantificación de LD ha sido objeto de interés científico, promovido principalmente por la necesidad de contar con herramientas analíticas que faciliten el monitoreo de la inducción de LD en pacientes con la enfermedad del Parkinson.

Los métodos electro analíticos destacan por su selectividad y sensibilidad, en la tabla 1 se presenta una descripción general de detección de LD a través de diferentes métodos, los cuales, comparados

con el trabajo realizado, uno de los trabajos más relevantes fue publicado por Bergamini et al. (2005) quienes desarrollaron un sensor electroquímico basado en un electrodo serigrafado de oro para la cuantificación de L-DOPA bajo condiciones de oxidación electroquímica en tampón acetato pH 3,0, el método mostró una respuesta lineal entre $9,9 \times 10^{-5}$ y $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, con un límite de detección de $6,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, en modo amperométrico, la linealidad se amplió desde $1,0 \times 10^{-6}$ hasta $6,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, con un límite de detección de $9,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Tabla 1

Descripción general de varios enfoques electroquímicos reportados para la detección de L-DOPA

Electrodo	Método de detección	Rango lineal	Límite de detección	Medio de muestra	Referencia
Oro -SPE	AMP	1-660 μM	0,99 μM	Farmacéutico	Bergamini et al. (2005)
Ru-red/NaY	CV	120 μM a 10 mM	85 μM	Farmacéutico	Teixeira et al. (2004)
AuNP/PPy/GCE	AMP	0.1–6.0 μM	0.075 μM	Farmacéutico	Ayyadurai et al. (2020)
PCFCuNP/GE	DPV	0.2 μM a 1.0 mM	0.06 μM	Farmacéutico	Rajendran et al. (2016)

Oro -SPE: electrodo serigrafado de oro, Ru-red/NaY: $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}-\text{O}-\text{Ru}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4-\text{O}-\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5]^{6+}/\text{NaY}$ zeolita, AuNP/PPy/GCE: Nanopartícula de oro/polipirrol/electrodo de carbono vítreo, PCFCuNP/GE: Nanopartícula de cobre funcionalizada con policisteína/electrodo de grafito, DPV: voltametría de pulso diferencial, AMP: Detección amperométrica.

El primer biosensor considerado como tal fue desarrollado por Leland C. Clark Jr. en 1956 para la detección de oxígeno, dispositivo que llevaría su nombre y a Clark se le conocería como el “padre de los biosensores”. Posteriormente, en 1962, Clark demostró el primer electrodo enzimático amperométrico para la detección de glucosa, hito que marcó el inicio de la era de los biosensores enzimáticos. Este avance fue seguido en 1969 por el desarrollo del primer biosensor potenciométrico para la detección de urea, reportado por Guilbault y Montalvo, y en 1975 por la

comercialización del primer biosensor por parte de Yellow Spring Instruments (YSI). Desde entonces, el campo de los biosensores ha evolucionado hacia un área de investigación multidisciplinaria que integra principios de física, química, biología, micro y nanotecnología, electrónica y medicina aplicada, contando con más de 84.000 publicaciones indexadas en Web of Science entre 2005 y 2015 según *Bhalla N. et al* en el 2016, lo que refleja el creciente interés científico en el desarrollo de estas plataformas analíticas.

El desarrollo de biosensores enzimáticos para la detección de peróxido de hidrógeno ha sido ampliamente explorado en la literatura científica, en la *Tabla 2* se resumen algunos estudios realizados para la detección de H_2O_2 con biosensores electroquímicos con peroxidasas extraídas de alguna fuente vegetal. dado que el H_2O_2 constituye tanto un analito de relevancia clínica e industrial como un producto intermedio de numerosas reacciones enzimáticas de interés analítico. Entre las enzimas más empleadas para este propósito se encuentran las peroxidasas, particularmente la peroxidasa de rábano picante (HRP), cuya capacidad para catalizar la reducción del H_2O_2 acoplada a la oxidación de sustratos dadores de electrones ha sido aprovechada en el diseño de plataformas electroquímicas sensibles y selectivas. (Ruan, C. et al., 1998; Delprat, N. et al., 2024; Rodionov, P. et al., 2016; Liu, X. 2020)

Tabla 2

Biosensores electroquímicos para detección de H₂O₂ basados en peroxidasas extraídas de fuente vegetal.

Fuente de peroxidasa	Rango lineal [μM]	Límite de detección	Referencia
Raíz de rábano picante (<i>Armoracia rusticana</i>)	0.175 a 6.125	58 nm	(Tamborelli et al., 2024)
Cáscara de batata (Ipomea batatas)	250 a 5000	4.6 mM	(Vega, M y Castillo, J.J. 2024)
Hojas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	6 a 900	1.8 μM	(Ciogli et al., 2021)
Hojas de palma real (<i>Roystonea regia</i>)	100 a 5000	87 μM	(Villamizar et al., 2016)

En el caso de desarrollo de biosensores electroquímicos utilizando PPG, los trabajos de investigación mas relacionados son Guarín et al. (2019) quienes desarrollaron un biosensor electroquímico para la detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) basado en PPG sobre electrodos serigrafiados de puntos cuánticos (SPQDE). La PPG fue parcialmente purificada a partir de hojas de *Panicum maximum*. La enzima fue inmovilizada por adsorción física sobre la superficie del electrodo y el comportamiento electroquímico fue evaluado mediante voltamperometría cíclica y cronoamperometría. Este trabajo estableció la viabilidad de la PPG como biorreceptor funcional en plataformas electroquímicas serigrafiadas, sentando las bases para su uso en biosensores enzimáticos orientados a otras aplicaciones.

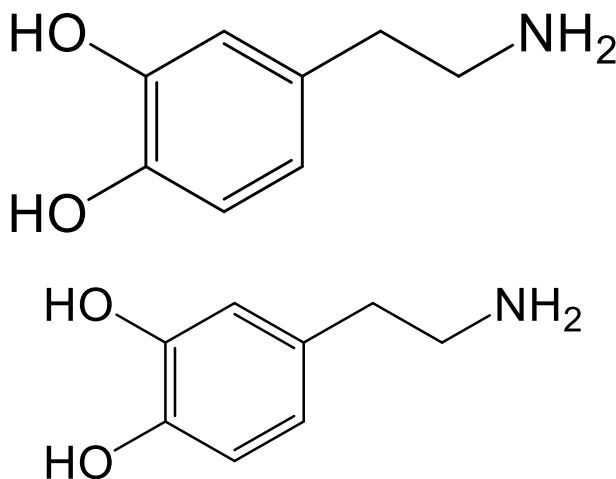
2. Marco teórico

2.1. Dopamina

La dopamina (3,4-dihidroxifenilamina) (DA) es uno de los neurotransmisores más importantes de la familia de las catecolaminas que circula ampliamente en el sistema nervioso central (SNC) para la comunicación entre neuronas, desempeña papeles muy importantes en el SNC, sistema renal, cardiovascular y hormonal (Tai, M. et al., 2024). Un nivel alto de dopamina indica cardiotoxicidad que conlleva a frecuencias cardíacas rápidas, insuficiencia cardíaca, hipertensión y adicción a las drogas, en cambio, niveles bajos pueden causar estrés, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y depresión. La dopamina tiene muchos análogos, entre los cuales se destaca la L-Dopa, Tiramina y L-Tirosina. (Bloem, B. et al, 2021)

Figura 1

Estructura molecular de la dopamina.



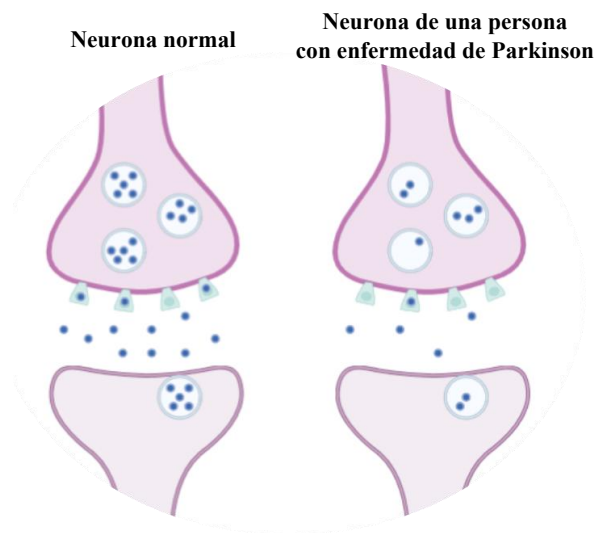
La DA es una feniletilamina, con un anillo bencénico (catecol) con dos grupos hidroxilo en posiciones 1 y 2, y un grupo amino unido a través de una cadena de etilo. Es soluble agua, propiedad vital para su transporte y su función como neurotransmisor.

2.2 Enfermedad del Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) descrita claramente por primera vez en 1817 por James Parkinson en su obra titulada “An Essay on the Shaking Palsy”, es el segundo trastorno neurodegenerativo que afecta alrededor del 2% de la población humana mayor a 65 años, afectando más hombres que mujeres con una proporción (2:1) y el más rápido de crecimiento a nivel mundial. Se define por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y la acumulación de α -sinucleína en diferentes partes del cerebro, la cual, llevan a la degeneración y posterior pérdida de DA en los ganglios basales que controlan el área muscular y movimiento. Suele comenzar con síntomas motores, como bradicinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural, sin embargo, también se presenta con síntomas no motores tales como estreñimiento, trastorno del sueño, depresión, trastorno cognitivo y demás (Aradi, S. 2020). El diagnóstico es principalmente clínico luego de que la mayoría de los pacientes acuden por alguno de los síntomas anteriormente mencionados, principalmente por el temblor en reposo. La EP no tiene cura, por lo tanto, el tratamiento más eficaz para los síntomas motores es la LD oral combinada con carbidopa, la cual es absorbida en el intestino y se convierte en DA en la periferia. (LeWitt, P. 2008)

Figura 2

Neurona dopaminérgica en enfermedad de Parkinson (disminución de la producción de dopamina)

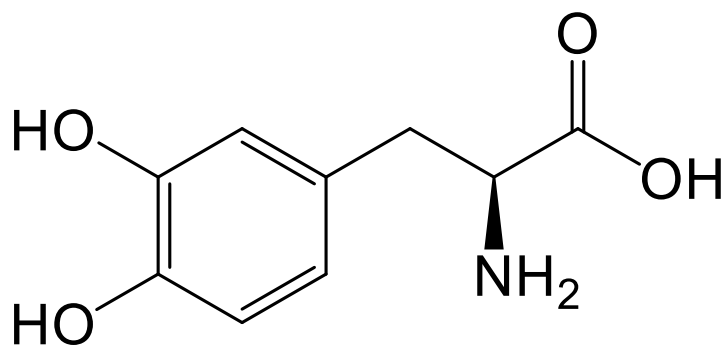


2.3 L-DOPA

La L-DOPA (LD), también conocida como levodopa o L-3,4-dihidroxifenilalanina, es un aminoácido aromático que actúa como precursor metabólico de la dopamina. Su fórmula química es $C_9H_{11}NO_4$ y posee dos grupos hidroxilo (-OH) en el anillo bencénico, lo que le confiere solubilidad en agua y alta reactividad química. Esta molécula es biológicamente activa en su forma L, mientras que la forma D no tiene actividad biológica significativa. (Hornykiewicz, O. 2010)

Figura 3

Estructura molecular de la LD.



En la fisiología humana, la L-DOPA es convertida en dopamina principalmente en las terminales presinápticas de las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central, a través de la acción de la enzima descarboxilasa. La dopamina resultante cumple un papel esencial en la regulación del movimiento, la motivación y el estado de ánimo. (Probst, D. et al., 2024; Zafar, S. et al., 2023)

En la práctica clínica, es el medicamento más eficaz utilizado para tratar la enfermedad de Parkinson, donde se produce una disminución progresiva de la dopamina cerebral. Su administración permite restaurar temporalmente los niveles de dopamina, mejorando los síntomas motores del paciente. La absorción del medicamento se realiza principalmente en el intestino delgado, donde puede verse afectada por la presencia de otros aminoácidos y la alimentación. Para maximizar su disponibilidad en el sistema nervioso central, suele administrarse junto con inhibidores de la descarboxilasa periférica (como carbidopa), que evitan su conversión en dopamina fuera del cerebro y reducen los efectos secundarios. (Aldred, J. et al., 2008)

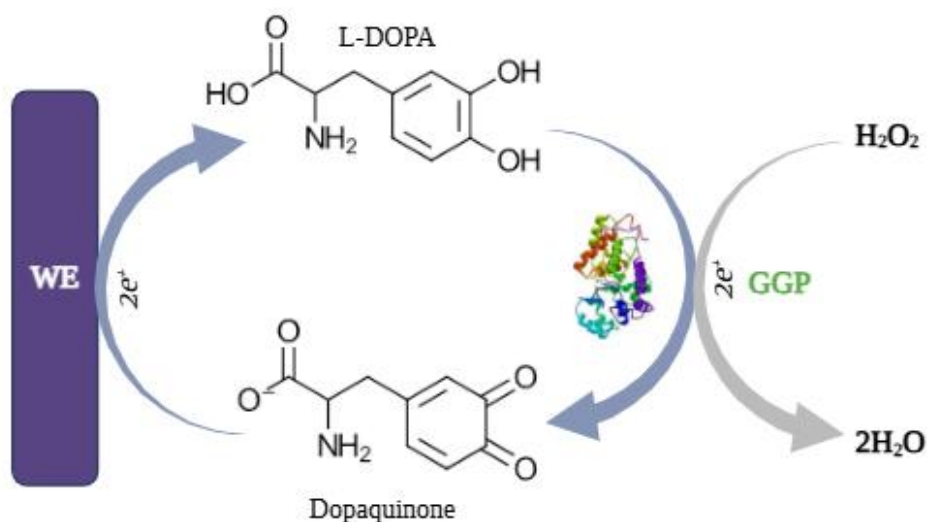
2.3.1. Oxidación de la L-DOPA

La oxidación de la levodopa es un proceso químico complejo que involucra la transferencia de electrones y la formación de especies intermedias altamente reactivas. En condiciones fisiológicas, puede oxidarse por acción de oxidantes biológicos o en presencia de oxígeno molecular (O_2), dando lugar inicialmente a un orto-quinona (L-dopa quinona) mediante la pérdida de dos electrones y dos protones desde los grupos catecol (hidroxilos en posición 3 y 4 del anillo bencénico).

Bioelectroquímicamente, la oxidación de la LD en un biosensor implica la transferencia de electrones desde la molécula de LD hacia el electrodo, detectándose como una corriente eléctrica proporcional a la concentración de LD. (Quintino, M. et al., 2006; Crapnell, R. D. y Banks, C. 2023)

Figura 4

Reacción de oxidación catalizada por la peroxidasa a partir de hojas de pasto guinea (PPG) de L-DOPA en Dopaquinona.



2.4. Enzimas

Las enzimas son biomacromoléculas grandes que lideran casi todos los procesos metabólicos por dentro y fuera de la célula con la capacidad de acelerar la velocidad de las reacciones químicas, por lo cual, son consideradas catalizadores biológicos esenciales para todas las funciones fisiológicas dentro de los organismos vivos. La función principal de las enzimas es influir en la cinética con alta selectividad, logrando que una reacción química se desarrolle en un tiempo considerablemente menor. (Palemr, T., y Bonner, P. L. 2011; Hou, M., y Ge, J. 2017)

La actividad catalítica de la mayoría de las enzimas está sujeta a un cofactor que facilita la catálisis de las reacciones y este puede ser un ion inorgánico o una pequeña molécula orgánica (coenzima). Según la reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en seis grupos principales los cuales son las oxidorreductasas; transferencia de electrones (iones hidruro o átomo de H), transferasas; transferencia de grupos, hidrolasas; reacciones de hidrólisis (transferencias de grupos funcionales al agua), liasas; adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos, isomerasas; transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas y ligasas; que es formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP o aun cofactor similar. (Motoyama, T. et al., 2022; Zhao, L. y Kaldis, P, 2022)

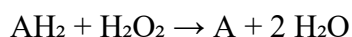
2.5. Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción. La reacción redox que catalizan implica la transferencia de electrones desde un sustrato orgánico reducido (donador) a otro compuesto químico (aceptor). Existen alrededor 26 subclases de la oxidorreductasas con base en la moléculas aceptoras o donadoras sobre las que actúan. De estas subclases destacan las oxidasas; las cuales utilizan el O₂ como aceptor de electrones, las deshidrogenasas; que transfieren hidrógenos en reacciones reversibles y las peroxidasas, cuyo aceptor de electrones es el peróxido de hidrógeno o los hidroperóxidos. (Song, X. et al 2022).

2.6. Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.X) son oxidorreductasas que utilizan el peróxido de hidrógeno para catalizar reacciones oxidativas ampliamente encontradas en ciertas plantas, microorganismos y células de mamíferos, conforman la segunda clase más importante de

enzimas utilizadas en procesos biotecnológicos (Yoo et al., 2022; Ivanec-Goranina, 2024). La peroxidasa tiene una amplia gama de especificidades para los donantes de electrones durante la oxidación, pero se selecciona específicamente como aceptor de electrones cuando los compuestos fenólicos o las aminas son donantes de hidrógeno. Algunos sitios activos de la peroxidasa contienen grupos magnesio, vanadio, selenio o flavina, a su vez, también contiene una amplia gama de sustratos catalíticos, que son principalmente compuestos aromáticos. La reacción utilizada por las peroxidasas consiste en usar el peróxido de hidrógeno como agente oxidante para oxidar un sustrato donador de protones (AH_2).



Estas enzimas desempeñan funciones biológicas diversas según el organismo en el que se encuentren en la naturaleza. Están envueltas en procesos biológicos como la degradación de toxinas, desintoxicación de metales pesados y regulación hormonales.

Las peroxidasas se clasifican según la presencia o ausencia de un grupo hemo en su núcleo, siendo el 80% las que lo presentan y el 20% restante las que no. El grupo hemo se reparte en dos superfamilias principales: peroxidasa-ciclooxigenasa (PCOXS) y peroxidasa-catalasa (PCATS). La superfamilia PCOX antiguamente conocida como superfamilia de peroxidasas animales, está conformada por peroxidasas animales tales como la mieloperoxidasa (MPO) y lactoperoxidasa (LPO), el grupo prostético de esta superfamilia está unido covalentemente a la apoproteína. A su vez, la superfamilia PCAT, antiguamente conocida como el grupo de hemoperoxidasas de plantas, hongos y bacteria, se subdivide en tres clases *Tabla 3* clasificadas según su origen. (Twala, P. P. et al., 2020)

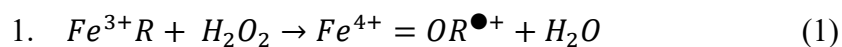
Tabla 3*Clasificación de la superfamilia PCAT según su origen.*

Clase	Origen	Características	ejemplo
I	Intracelulares procariontes y eucariotes de fuentes no animales.	Tiene un rol clave en la prevención de estrés oxidativo en bacterias.	Citocromo <i>c</i> peroxidasa (CcP).
II	Exclusivamente por hongos	Desempeña un papel importante en la degradación de la lignina en el suelo.	Lignina peroxidasa (LiP)
III	Extracelulares en plantas	Están involucradas en muchos procesos fisiológicos como el metabolismo de la pared celular, cicatrización de heridas y demás.	HRP, peroxidasa de pasto guinea (PPG), peroxidasa de turpina (TP)

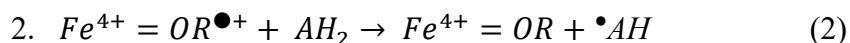
El grupo peroxidasas no hemo está constituido por cinco familias independientes, las cuales son, peroxidasas de tiol, haloperoxidasa no hemo, catalasa de manganeso, alquilhidropoxidasa y peroxidasa de NADH.

2.6.1. Ciclo catalítico de las peroxidasas

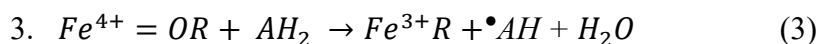
El mecanismo de reacción de las peroxidasas hemo es una oxidación con transferencia de dos electrones. Se divide en tres fases en donde la fase uno se da la formación del compuesto I, en la fase dos la formación del compuesto II y en la fase tres el retorno de la enzima nativa (Ivanec-Goranina, 2024).



Compuesto I



Compuesto II

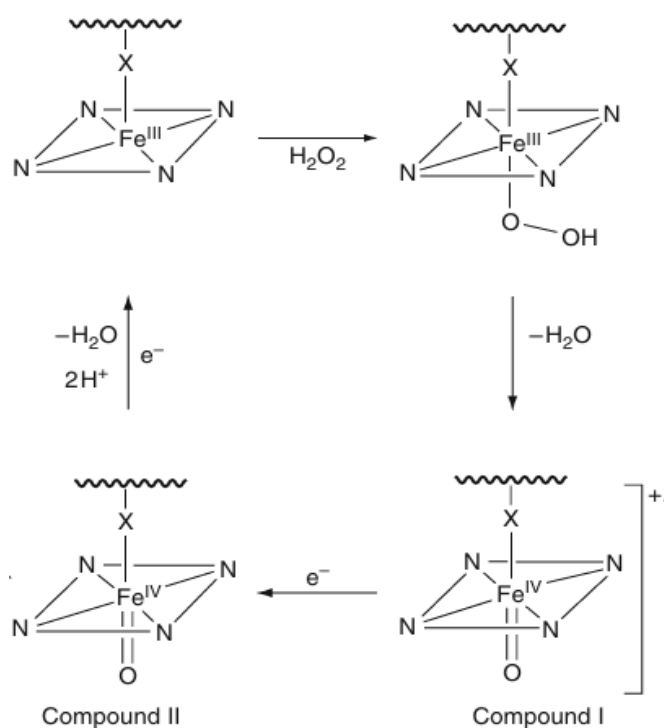


- Fase 1: Formación del Compuesto I: El H_2O_2 ingresa al sitio activo y uno de sus oxígenos establece un enlace de tipo ligando con el ion férrico (Fe^{3+}) del grupo hemo, generando el compuesto 0, un intermediario hierro-peróxido de vida media extremadamente corta. Inmediatamente, el enlace O-O y el enlace $\text{O}_1\text{-H}$ sufren una ruptura heterolítica: el hierro se oxida a Fe^{4+} estableciendo un doble enlace con el oxígeno remanente ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$), mientras que la porfirina se oxida simultáneamente perdiendo un electrón y quedando como radical catiónico. Se libera la molécula de agua y se obtiene el compuesto I: la especie oxo-ferril con radical catiónico en la porfirina.
- Fase 2: Formación del Compuesto II: En esta etapa, una molécula de sustrato donador efectúa una reducción monoelectrónica sobre el radical catiónico del anillo de porfirina del Compuesto I, neutralizando dicha especie. Como resultado, el sustrato queda en su forma oxidada de radical libre ($\text{A}\bullet$) y la enzima transita al Compuesto II, especie oxo-ferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) que conserva el hierro en estado de oxidación +4 pero carece del radical catiónico porfirínico.
- Fase 3: Una segunda molécula de sustrato donador reduce al Compuesto II mediante una segunda transferencia monoelectrónica, liberando una segunda molécula de agua y una segunda especie de sustrato oxidado en forma de radical libre ($\text{A}\bullet$), regenerando así la peroxidasa a su estado nativo con el hierro en estado Fe^{3+} . Los dos radicales de sustrato ($\text{A}\bullet$) generados a lo largo de las fases 2 y 3 pueden experimentar reacciones

subsecuentes de combinación, desproporción u oxidación adicional en función del contexto bioquímico.

Figura 5

Ciclo catalítico de la peroxidasa, grupo hemo.



Nota. Tomado de E. Torres y M. Ayala. Biocatalysis Based on Heme Peroxidases, pag 81

2.6.2. Fuentes de extracción de peroxidasas

La principal peroxidasa extraída de fuente vegetal es la peroxidasa de la raíz de rábano picante, sin embargo, muchos vegetales sirven como fuente para diferentes aplicaciones. Las peroxidasas vegetales suelen tener sus propias características en cuanto a estabilidad térmica, pH óptimo, especificidad de sustrato y composición de aminoácido (Motamed et al., 2009), por lo cual,

dependiendo de estas sirven para diferentes campos. En la *Tabla 4* se encuentra recapitulado algunas peroxidasas de fuente vegetal.

Tabla 4

Fuentes , extracción y actividades de las peroxidasas vegetales

Fuente	Solución extractora	Actividad enzimática específica	Actividad enzimática	Referencia
Palmera	SPB 100 mM pH 6	53,3 U mg ⁻¹	406,1	Al-Senaigy e Ismael, 2011
Rábano	PPB 200 mM pH 6,5	572 U mL ⁻¹	1,144	Bueno y Pereira, 2015
Batata	PB 200 mM pH 6.5	342 U mL ⁻¹	684	Bueno y Pereira, 2015
Hoja de soja	PPB 100 mM pH 7,0	8 U mg ⁻¹	-	Al-Sa'ady et al, 2018

SPB: Buffer fosfato de sodio, PPB: Buffer fosfato de potasio, PB: Buffer fosfato.

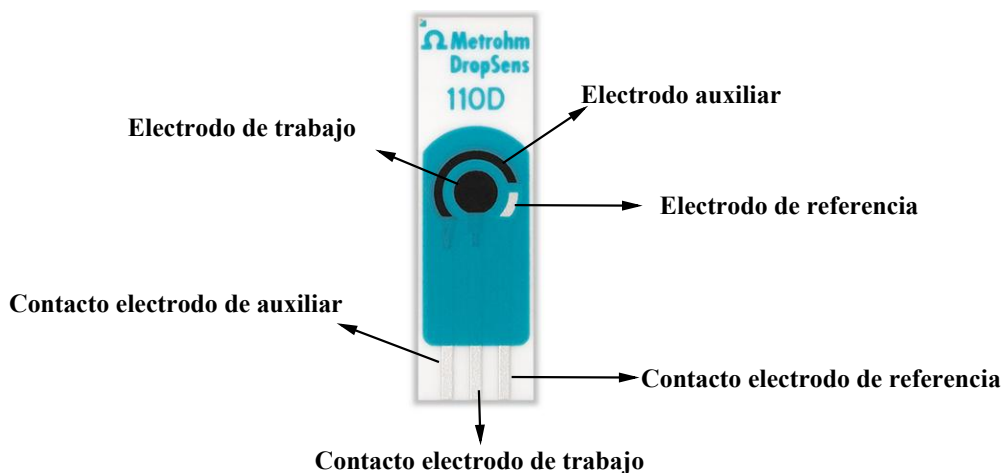
La actividad de la peroxidasa se puede determinar en función de la absorción de luz por la muestra a una longitud de onda específica, para determinar cuál es la actividad enzimática de la peroxidasa de interés, se definió que la unidad enzimática (U) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 micromol (μmol) de sustrato por minuto (min) en condiciones estándar y la actividad específica es el número de unidades por miligramos de proteína. (Narváez, A., & Domínguez, E. 2005)

2.7. Electrodos serigrafiados

Los electrodos serigrafiados (SPE) son dispositivos electroquímicos que han revolucionado el desarrollo de sensores y biosensores modernos. Su producción se basa en la técnica de serigrafía, un proceso de impresión que consiste en depositar tintas conductoras sobre sustratos sólidos mediante el paso controlado de dichas tintas a través de una malla tensada sobre un marco, donde algunas zonas han sido bloqueadas con una emulsión fotosensible para definir el patrón geométrico del electrodo. Dichas tintas empeladas contienen materiales tales como grafito, carbono vítreo, oro, platino o plata que tras un proceso otorga conductividad eléctrica a la capa depositada. Los SPE suelen estar compuestos por una celda electroquímica que consta de tres electrodos, a saber, el pseudo electrodo de referencia (RE), el electrodo auxiliar y el electrodo de trabajo (WE), que se imprimen en un sustrato sólido (*Figura 6*). (Nesakumar, N., Berchmans, S., & Alwarappan, S. 2018)

Figura 6

Esquema de un SPE con sus partes



2.8. Biosensores

Los biosensores son dispositivos de reconocimiento que detectan y cuantifican moléculas químicas o biológicas en matrices complejas a través de la conversión de una interacción biomolecular a una señal cuantificable con ayuda de un transductor. El biorreceptor es la molécula con la capacidad de capturar selectivamente el analito target y puede ser una enzima, un anticuerpo o un ácido nucleico. La interacción entre el biorreceptor y el target genera un cambio en una propiedad medible (luz, pH, carga, masa) produciendo así una señal que es recibida por el transductor y que además es proporcional a la concentración del analito. Existen diferentes tipos de biosensores dependiendo del tipo de transductor o de biorreceptor que se utilicen. Considerando el tipo de transductor pueden ser ópticos, piezoeléctricos, magnéticos, nanomecánicos y electroquímicos, y dependiendo del biorreceptor pueden ser biocatalíticos o de afinidad. (Ruan, C, et al., 1998; Delprat, N. et al., 2024)

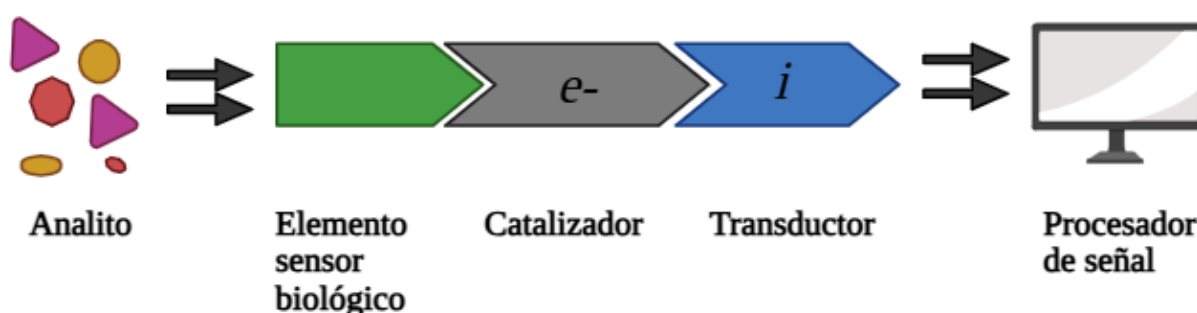
2.9. Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son dispositivos que contienen transductores electroquímicos que transforman información bioquímica, poseen cualidades como la instrumentación simple, alta sensibilidad, rentabilidad y posibilidad de miniaturización. Estos biosensores normalmente dependen de la reacción de catálisis enzimática entre las biomoléculas inmovilizadas y el analito objetivo que produce electrones y afecta las propiedades eléctricas de la solución. Pueden ser clasificados dependiendo del principio de detección y aplicación como potenciométricos, amperométricos, conductimétricos, voltamperométricos, polarográficos, impedimétricos, capacitivos y piezoeléctricos. Un biosensor electroquímico puede monitorear las actividades de células vivas o enzimas

midiendo la interacción ente el analito y el biorreceptor (Clark Jr y Sachs, 1968).. Las enzimas son los biorreceptores más usados para este tipo de sistemas debido a su especificidad y actividad biocatalítica. Estas catalizan la formación de la especie electroactiva que es detectada en el dispositivo de diferentes maneras. (S. Singh et al., 2020).

Figura 7

Esquema generalizado de un biosensor



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

2.10. Biosensores electroquímicos con peroxidasas

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

2.11. Generalidades de la pasto guinea (*Panicum Maximum*)

La pasto guinea (*Panicum Maximum*) es una especie presente en el suelo colombiano, la cual presenta un crecimiento erecto y en macollas que pueden llegar a medir hasta los tres metros de alturas, se adaptan en suelos con un pH que oscila entre 5 y 7.5, resiste a largas

temporadas de sequía y a encharcamiento temporales, se establece en alturas entre 0 y 1600 m.s.n.m. y requiere precipitaciones anuales de 800 – 2500 mm.

Dentro de sus propiedades biocatalíticas, se encuentra que la peroxidasa de la pasto guinea presenta una alta estabilidad térmica, con condiciones óptimas de trabajo a pH 8 y a los 66 °C, su límite máximo de cuantificación es de 3.5 mM

Figura 8

Imagen de la pasto guinea.

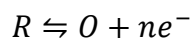


Nota: Fotografía tomada por Arisaema.

2.12. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica electroanalítica que se utiliza para estudiar procesos de reducción y oxidación de especies químicas en solución. Se aplica un potencial eléctrico variable (Figura 9) a un electrodo en donde se encuentra la solución, mientras se mide la

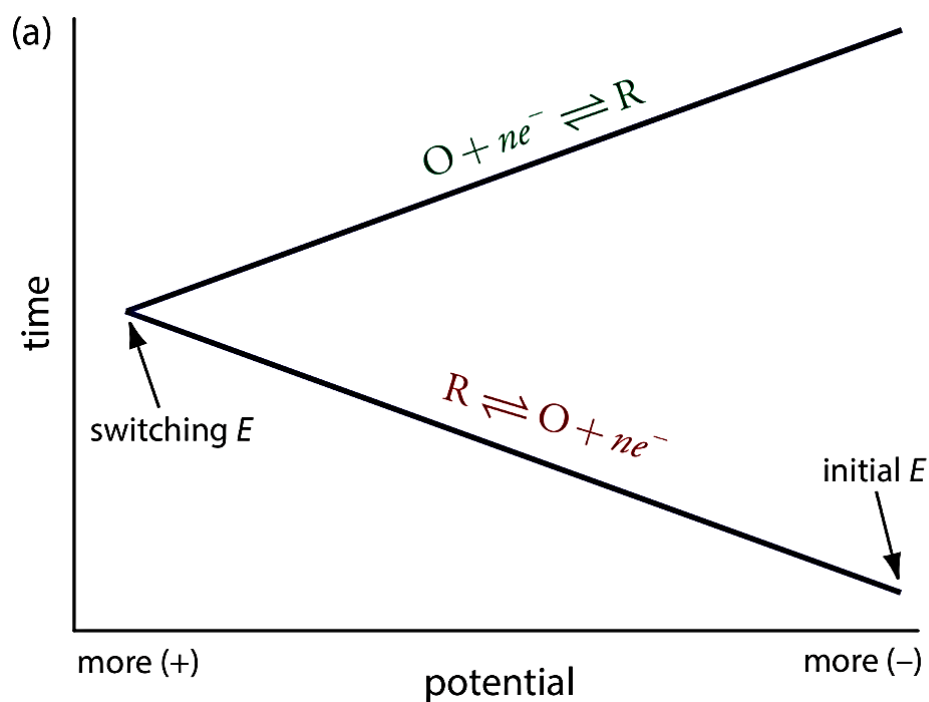
corriente (Harvey, D. 2022). La gráfica llamada voltamperograma cíclico (Figura 10) es generada de tal forma que, el potencial sube desde un valor inicial hasta un máximo y luego regresa al punto de partida, lo que provoca una reacción y luego su inversa, la gráfica se registra corriente vs. Potencial. La reacción general del electrodo es:



Donde; O es la especie oxidada, R es la especie reducida y n el número de electrones transferidos.

Figura 9

Esquema del barrido triangular de potencial y la respuesta redox en voltamperometría cíclica

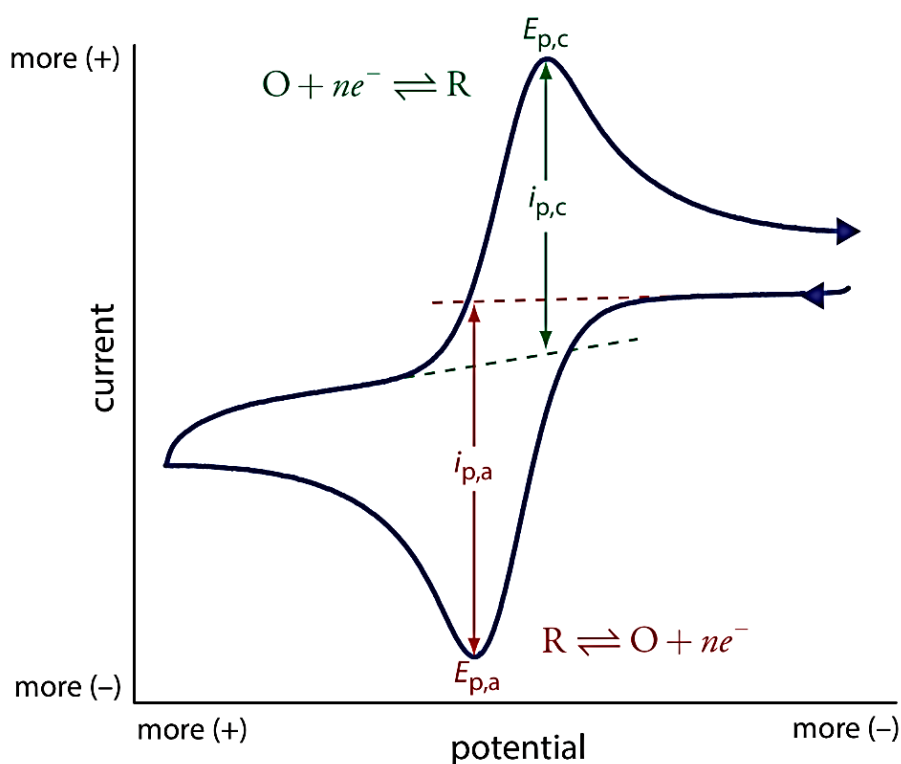


Nota. Tomado de Harvey (2022)

En el voltamperograma cíclico resultan dos picos importantes: el pico anódico (I_{pa}), asociado a la oxidación, y el pico catódico (I_{pc}), asociado a la reducción. Los potenciales de pico (E_{pa} , E_{pc}) se asocian a qué voltaje ocurre la reacción (Harvey, D. 2022)..

Figura 10

Forma de un voltamperograma cíclico



Nota. Tomado de Harvey (2022)

El sistema experimental requiere de tres electrodos: el electrodo de trabajo, donde ocurre la reacción de interés, el electrodo de referencia, que es el que mantiene un potencial constante y conocido y el contraelectrodo, que cierra el circuito eléctrico, todo esto es controlado por el instrumento potenciostato. En el presente trabajo se utiliza electrodos serigrafiados (SPE) que cuenta con todos los electrodos en un mismo dispositivo. (Elgrishi et al., 2017)

Al usar CV se puede obtener información como la velocidad de transferencia de electrones, el coeficiente de difusión y el potencial redox. Existe el concepto de reversibilidad en CV la cual hace referencia a qué tan fácilmente una reacción electroquímica puede ocurrir en ambas direcciones. Se clasifica en tres; reversible, cuasi reversible e irreversible (*Tabla 5*)

Tabla 5

Clasificación de reversibilidad en CV

Clase	Descripción	Características
Reversible	La transferencia de electrones ocurre muy rápido en ambas direcciones	Diferencia entre potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p) es de 57 mV a 25°C
Cuasirreversible	La transferencia de electrones tiene una velocidad moderada.	Los picos se encuentran asimétricos.
Irreversible	La transferencia de electrones es lenta	El pico anódico y catódico están muy separados o uno desaparece.

Nota: Tomado y ajustado de Yamada et al. (2022)

Esta técnica electroanalítica es ampliamente utilizada para desarrollar materiales para baterías, estudiar catalizadores electroquímicos y diseñar biosensores. El gran beneficio de esta es que ofrece en una sola medición información cualitativa y cuantitativa sobre el comportamiento electroquímico del compuesto de interés. (Elgrishi et al., 2017)

3. Metodología

3.1.Reactivos

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de: SIGMA-ALDRICH: guayacol $C_7H_8O_2$; PanReac AppliChem ITW Reagents: sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, J.T. Baker: peróxido de hidrógeno H_2O_2 (30% p/p), fosfato de potasio monobásico K_2HPO_4 , fosfato de potasio dibásico KH_2PO_4 ; Genfar: Levodopa/carbidopa 250 mg.

3.2.Recolección y extracción de la peroxidasa

Para la recolección y extracción de la peroxidasa de las hojas de pasto guinea (*Panicum maximum*) fue empleada una metodología similar a la descrita por Centeno, Solano y Castillo (2017), las hojas fueron recolectadas en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander, ubicada en Bucaramanga, Santander, Colombia. Posteriormente, fueron lavadas suavemente, trituradas e incubadas con agitación constante en un tampón fosfato de 30 mM, pH 8.0, durante 48 horas a temperatura ambiente. Luego, el homogeneizado obtenido fue filtrado y centrifugado a 5000 rpm durante 20 minutos, desechando el pellet y conservando el sobrenadante para posteriores análisis y ensayos.³⁵

3.3.Eliminación de pigmentos por reparto bifásico

Para la eliminación de pigmentos, se empleó un sistema bifásico compuesto por 14 % (p/v) de polietilenglicol (PEG) y 10 % (p/v) de sulfato de amonio $((NH_4)_2SO_4)$. Tras doce horas de incubación, se formaron dos fases: una fase superior conteniendo compuestos coloreados, y una fase inferior acuosa que contiene la peroxidasa y otras proteínas. La fracción con actividad enzimática fue recolectada y almacenada a 4°C para posterior medición de actividad enzimática.

3.4. Ultrafiltración

Finalmente, como proceso final de la purificación parcial de la peroxidasa, el extracto se centrifugó a 5000 rpm y 4 °C durante 30 utilizando amicones de 30 kDa de la marca Merck Millipore. Se evaluó la actividad enzimática en el filtrado y el concentrado para identificar cual contenía la POD, recolectando y almacenando el concentrado para las posteriores mediciones.

3.5. Medición de la concentración de proteína por el método BCA

La cuantificación de proteínas en los extractos de cada fase de purificación se llevó a cabo mediante el método de ácido bicinchonínico (BCA) (Thermo Scientific, 2024), realizando una curva de calibración elaborada usando albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 20 a 2000 µg/mL, y lecturas realizadas en el lector de microplacas de Multiskan Sky (Thermo Scientific).

3.6. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática del extracto se determinó a través del seguimiento de las velocidades iniciales de reacción utilizando un espectrofotómetro de doble haz (UV-1800 SHIMADZU). Para medir la cantidad de tetraguayacol ($\epsilon=26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) formado de la reacción entre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el sustrato guayacol, que es catalizada por la peroxidasa, se cuantificó la variación de absorbancia a 470 nm durante los primeros 60 segundos. Se preparó la solución de sustratos en 20 mL de PBS 100mM a pH 6.0 adicionando 40 µL de guayacol y 10 µL de peróxido de hidrógeno 30% (p/p). Para la medición en la celda del espectrofotómetro se añadieron 33 µL de extracto diluido y 1 mL de solución de sustratos.

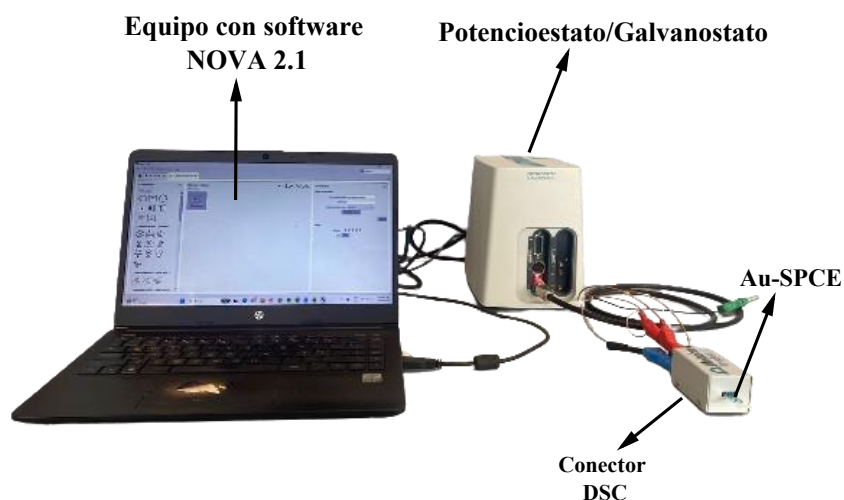
3.7. Inmovilización de la peroxidasa en los electrodos de nanopartículas de oro

La inmovilización de la peroxidasa en los electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas de oro (AuNPs) se realizó mediante adsorción física. Se depositaron 10 μL de extracto en el electrodo de trabajo y se dejó secar por 24 horas en un lugar oscuro y seco. Durante todos los ensayos posteriores se utilizaron controles (electrodos sin modificar) para comparar el resultado del electrodo modificado.

El pontenciostato/galvanostato utilizado para los experimento fue el AUTOLAB PGSTAT204 y el software para la elaboración de datos fue NOVA (NOVA 2.1 software para instrumentos Autolab disponible en la página oficial de NOVA). Los electrodos utilizados son de la marca Metrohm Dropsens con referencia DRP-110GNP, estos electrodo cuentan con el electrodo de trabajo modificado con nanopartículas de oro, el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia Ag/AgCl. En la *figura 11* se muestra el montaje utilizado para los ensayos electroquímicos.

Figura 11

Montaje experimental para las mediciones de voltamperometría cíclica



3.7.1. Evaluación de la respuesta del electrodo modificado frente al peróxido de hidrógeno

Para evaluar la respuesta del electrodo modificado frente al H_2O_2 , se utilizó una solución de 1 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y se depositaron 60 μL en el electrodo modificado, se corroboró que la gota depositada cubriera toda la zona de trabajo del electrodo. Los resultados fueron comparados con los resultados de VCs de los electrodo de control (Electrodo con PB 30 mM pH 7). La medición se realizó a una velocidad de barrido de $-\text{mVs}^{-1}$ y en un rango de potencial de 1.0 V a -1,0 V.

3.8.Preparación de muestras a partir de pastillas de LD

Para la preparación de la muestra se utilizó una tableta farmacéutica de levodopa/carbidopa (Genfar®), como fuente del analito. Se molió en un mortero la mitad de una pastilla hasta obtener un polvo homogéneo. De este polvo, se pesó una cantidad equivalente a 50 mg, la cual se solubilizó en una mezcla agua:metanol (70:30 v/v) para eliminar los excipientes presentes en la tableta farmacéutica. La solución se llevó a centrifugar durante 5 min a una velocidad de 5000 rpm a 4°C . El sobrenadante obtenido constituyó la solución madre de la cual se realizaron diluciones con buffer fosfato a pH 7 para las posteriores mediciones electroquímicas. Debido a que la solución de LD suele oxidarse fácilmente por exposición a luz, oxígeno y demás, cada vez que se realizaban pruebas se volvía a preparar la muestra de LD.

3.8.1. Caracterización de muestras por FT-IR y UV-VIS

Con el propósito de verificar la identidad química de las muestras previo a su uso en las diferentes pruebas, se llevó a cabo la caracterización espectroscópica de LD a través de dos técnicas complementarias: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopía de absorción en el ultravioleta-visible (UV-Vis). Para el caso de FTIR, las muestras fueron analizadas en el intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . En el caso de la caracterización por UV-Vis se realizó en solución acuosa, registrando el espectro en el intervalo de 200 a 500 nm.

3.9.Determinación de la concentración óptima de LD mediante cinética enzimática por UV-Vis

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de LD para el desarrollo del biosensor, se evaluó la cinética de la reacción enzimática a diferentes concentraciones del sustrato mediante espectroscopía UV-Vis en modo cinético. Se prepararon soluciones de LD en un rango de concentraciones de 25,5 mM a 0,25 mM en buffer fosfato 30 mM a pH 7, a las cuales se les adicionó una cantidad fija de PPG en presencia de peróxido de hidrógeno 0,1 mM, bajo condiciones controladas de temperatura a 25°C. El seguimiento cinético de la reacción se llevó a cabo registrando la variación de absorbancia a 475 nm en función del tiempo, longitud de onda correspondiente a la absorción del producto generado por la oxidación de la LD catalizada por la PPG. Las mediciones se realizaron durante un intervalo de 60 segundos. Con base a los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración de trabajo que proporcionó una respuesta enzimática acorde y dentro del intervalo lineal de detección.

3.10. Evaluación de respuesta del electrodo modificado frente a L-Dopa

Con el fin de evaluar la respuesta electroquímica del electrodo modificado frente a la LD, se realizaron mediciones por voltamperometría cíclica (VC) a diferentes concentraciones del analito. Se evaluaron cuatro condiciones experimentales, tampón fosfato únicamente, tampón fosfato en presencia de H_2O_2 , soluciones de LD a diferentes concentraciones (0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM) y soluciones de LD a la misma concentración en presencia de H_2O_2 . Para cada condición se registraron los VCs en un en un rango de potencial de 1.0 V a -1,0 V, a una velocidad de barrido de – mV/s. Para presentar una comparación objetiva, todas las mediciones fueron realizadas en paralelo empleando electrodos de control, correspondiente a electrodos serigrafiados sin modificar sometidos a las mismas condiciones experimentales. La comparación de los voltamperogramas obtenidos con el electrodo modificado frente al electrodo de control permitió evaluar el efecto de la modificación sobre la respuesta electroquímica hacia la L-Dopa. Los parámetros analizados incluyeron la posición e intensidad de los picos de oxidación y reducción característicos.

4. Análisis y resultados

4.1 Extracción y semi-purificación de la PPG

Las plantas contienen compuestos como proteínas, metabolitos secundarios, fenoles, lípidos, pigmentos, ácidos orgánicos, carbohidratos (*Nelson y Cox, 2017*), y otros compuestos que interfieren en cualquier medición de la enzima que se desea extraer, por lo tanto, las hojas que fueron recolectadas de *Panicum maximum* fueron trituradas e incubadas durante 48 h en shaker con tampón fosfato 30 mM pH 8.0, se centrifugaron a 5000 rpm y 4°C por 20 minutos. Seguidamente, se llevó a cabo el procedimiento de separación en sistema acuoso de dos fases (reparto bifásico) con PEG 12000 Da al 10% y sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 14% (*Centeno et al., 2017*) en la que se recolectó la fase clara (fase con actividad enzimática) tras 12 horas de separación. La separación sucede debido a que las proteínas se distribuyen entre ambas fase dependiendo de su carácter hidrofóbico e hidrofílico, su tamaño y carga superficial. El sulfato de amonio desempeña un papel fundamental en la formación del sistema, debido a su elevada fuerza iónica y promover el fenómeno conocido como salting-out, en el cual los iones sulfato compiten con las proteínas por las moléculas de agua, disminuyendo la capa de hidratación proteica y favoreciendo la separación de biomoléculas según su afinidad por el polímero o en sales, Al ser una POD vegetal, estas se caracterizan por su carácter hidrofílico, dado a que contiene grupos cargados que interactúan con el entorno salino del sistema acuoso (*Henriksen et al. 2010*).

Por último, el extracto se centrifugó por 30 minutos a 4000 rpm y 4 °C usando los filtros Amicon de 30 kDa y se reservó el concentrado que contenía las especies de mayor tamaño, que fue donde se detectó actividad enzimática. El uso de estos filtros permite separar y concentrar proteínas con masas moleculares superiores al límite de exclusión de la membrana,

mientras que, moléculas de menor tamaño atraviesan el filtro y ayudan al enriquecimiento de la concentración de la peroxidasas. En la *Figura 12* se muestran imágenes de referencia de las etapas de extracción.

Figura 12

Etapas de extracción y semi-purificación de la peroxidasa de pasto guinea (A) Extracción (B) Centrifugación (C) Reparto bifásico (D) Ultrafiltración.



Con el fin de evaluar la eficiencia del proceso de extracción y de las etapas de semipurificación, se determinó la actividad enzimática de los diferentes extractos obtenidos. La cuantificación se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico basado en la variación de absorbancia del sistema de reacción en función del tiempo.

El cálculo de la actividad enzimática se efectuó a partir de la velocidad de formación del producto, utilizando la expresión derivada de la ley de Lambert-Beer (Ecuación 5) respecto al tiempo, que relaciona la absorbancia con la concentración del analito en una muestra. Así, se obtiene la fórmula utilizada (Ecuación 6) donde V_t es el volumen total de la celda en mL, FD

es el factor de dilución del extracto, dA/dt es la pendiente de la medición cinética expresada en s^{-1} , ε es el coeficiente de absortividad molar en $mM^{-1}cm^{-1}$ y b es la longitud del paso óptico en la celda en cm.

$$A = \varepsilon bc \quad (5)$$

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

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

$$Actividad\ enzímica = \frac{dA/dt}{\varepsilon b} \times FD \times Vt \quad (6)$$

Para cada medición en el UV-Vis, se utilizaron 33 μL del extracto de cada fase con 1 mL de solución de sustrato compuesto por peróxido de hidrógeno y guayacol. Este procedimiento permitió estudiar la reacción de oxidación del guayacol a tetraguayacol en 60 segundos, catalizada por la POD. El tetraguayacol es un compuesto coloreado naranja-rojizo que presenta una absorbancia máxima a 470 nm y un coeficiente de extinción molar ε de $26,6 M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Con el fin de determinar la actividad específica, se cuantificó previamente la concentración de proteínas presentes en cada extracto mediante un kit de ensayo BCA. Para ello, se elaboró una curva de calibración utilizando estándares de BSA en un intervalo de 25 a 2000 $\mu g/mL$ (Anexo A). Este método se fundamenta en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} en presencia de proteínas, seguida de la formación de un complejo entre el ion cuproso y el reactivo BCA, lo que origina una coloración púrpura cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración proteica de la muestra. La absorbancia se midió a 562 nm. A partir de estos datos y del contenido total de proteína, se calculó finalmente la actividad específica.

Con los valores obtenidos de la reacción catalizada por la peroxidasa en el espectrofotómetro UV-Vis, la ecuación 6 y los resultados de actividad específica se construye la *Tabla 4* de purificación, en donde se observa que a medida que avanza el proceso, disminuyen el volumen y la cantidad de proteína total, mientras que la actividad específica aumenta de forma progresiva lo que indica un enriquecimiento de la enzima de interés.

En la etapa de centrifugación, la actividad total disminuye muy poco debido a que esta fase ocurre más en pro de eliminar material insoluble y restos celulares, sin producir una purificación significativa de la enzima. En el reparto bifásico, en cambio, se observa un crecimiento en la actividad total y, más aún, actividad específica, lo que induce a una separación más selectiva de la peroxidasa con respecto a otros compuestos presentes en el extracto, este comportamiento se puede fundamentar en que la partición diferencial de las moléculas presentes en las fases formadas por el PEG y la sal, dependen del carácter hidrofílico, carga superficial y afinidad por alguno de los sistemas formados. Además, se pueden remover compuestos inhibidores o interferentes presentes, que hace que la concentración enzimática sea más relevante. (Iqbal et al., 2016)

Por último, la ultrafiltración produce el mayor aumento en actividad específica debido a que concentra la fracción enzimática y permite el paso de moléculas pequeñas, sales e impurezas a través de la membrana semipermeable, mientras retiene las macromoléculas de mayor tamaño, como la peroxidasa. Este tipo de separación por tamaño suele reducir la concentración de proteína no deseadas y aumentar notablemente la concentración de actividad enzimática.

Tabla 6*Tabla de purificación para la peroxidasa extraída de las hojas de pasto guinea*

Etapas	Volumen [ml]	Proteínas [mg/mL]	Actividad [U] $\pm$ IC95%	Actividad volumétrica [U/mL]	Actividad específica [U/mg]	Factor de purificación	Rendimiento [%]
Extracto 48h	320	3,042	$0,350 \pm 0,015$	10,603	3,486	1,000	7
Centrífuga	272	2,962	$0,282 \pm 0,014$	8,544	2,884	0,827	6
Reparto Bifásico	122	1,853	$0,685 \pm 0,023$	20,759	11,200	3,213	14
Ultrafiltración	0,205	0,665	$4,880 \pm 0,080$	147,877	222,256	63,756	100

La *Tabla 6* muestra el comportamiento de la actividad total de la PPG a lo largo del proceso de semipurificación. Partiendo de un valor de $0,350 \pm 0,015$ U en el extracto crudo, la actividad total disminuyó ligeramente a $0,282 \pm 0,014$ U tras la centrifugación, lo cual es esperado dado que esta etapa implica una pérdida de volumen y de material soluble durante la eliminación del sedimento. Sin embargo, a partir de la etapa de reparto aumenta, registrándose un valor de $0,685 \pm 0,023$ U. Este comportamiento se atribuye a la eliminación de compuestos inhibitorios presentes en el extracto crudo que suprimían parcialmente la actividad catalítica de la enzima. El incremento más pronunciado ocurrió tras la ultrafiltración, donde la actividad total alcanzó su valor máximo de $4,880 \pm 0,080$ U, representando un aumento eficaz respecto al extracto crudo, lo que confirma que esta etapa no solo concentró eficazmente la enzima, sino que también eliminó los últimos inhibidores residuales, permitiendo expresar la actividad catalítica completa de la PPG y que el proceso de semi-purificación de la PPG cumplió con lo esperado.

4.1.1 Tratamiento estadístico de la actividad enzimática durante las etapas de extracción y semipurificación de la PPG

Con el fin de evaluar el método de extracción y semipurificación de la PPG se realizaron dos procesos independientes bajo las mismas condiciones experimentales. Inicialmente se llevó a cabo una primera extracción (*Tabla 7*) con el propósito de observar el comportamiento de la enzima y posteriormente, se realizó una segunda extracción (*Tabla 8*) para verificar la consistencia de los resultados obtenidos.

Tabla 7

Resultados estadísticos del primer proceso de extracción y semipurificación de la PPG

Etapas	1° Medición	2° Medición	3° Medición	Promedio	Desviación estándar	%RSD	Actividad enzimática (U)	IC95% Actividad	Actividad enzimática (U) ± IC95%
Extracto 48h	0,0938	0,0972	0,0961	0,0957	0,0017	1,8129	0,3716	0,0167	0,372 ± 0,017
Centrifugación	0,0815	0,0846	0,0832	0,0831	0,0016	1,8681	0,3227	0,0150	0,323 ± 0,015
Reparto Bifásico	0,1805	0,186	0,1837	0,1834	0,0028	1,5061	0,7122	0,0266	0,712 ± 0,027
Ultrafiltración	1,274	1,2924	1,283	1,2831	0,0092	0,7171	4,9830	0,0888	4,983 ± 0,089

Tabla 8

Resultados estadísticos del segundo proceso de extracción y semipurificación de la PPG

Etapas	1° Medición	2° Medición	3° Medición	Promedio	Desviación estándar	%RSD	Actividad (U)	IC95% Actividad	Actividad enzimática (U) ± IC95%
Extracto 48h	0,0884	0,0915	0,0904	0,0901	0,0016	1,7443	0,350	0,0152	0,350 ± 0,015
Centrifugación	0,0711	0,074	0,0727	0,0726	0,0015	2,0008	0,282	0,0140	0,282 ± 0,014
Reparto Bifásico	0,1738	0,1785	0,1769	0,1764	0,0024	1,3546	0,685	0,0231	0,685 ± 0,023
Ultrafiltración	1,2483	1,2648	1,2567	1,2566	0,0083	0,6566	4,880	0,0796	4,880 ± 0,080

En ambos procesos se observó una tendencia similar en la actividad enzimática a medida que avanzaban las etapas de semipurificación. En la primera extracción, la actividad enzimática aumentó desde $0,372 \pm 0,017$ U en el extracto crudo hasta $4,983 \pm 0,089$ U después de la ultrafiltración. De manera similar, en la segunda extracción la actividad pasó de $0,350 \pm 0,015$ U a $4,880 \pm 0,080$ U. Asimismo, las etapas intermedias presentaron valores comparables entre ambas extracciones. Durante la centrifugación se registraron actividades de $0,323 \pm 0,015$ U y $0,282 \pm 0,014$ U, mientras que en la etapa de reparto bifásico se obtuvieron actividades de $0,712 \pm 0,027$ U y $0,685 \pm 0,023$ U para la primera y segunda extracción, respectivamente.

La precisión de las mediciones fue evaluada mediante la desviación estándar, el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) y el intervalo de confianza al 95 %. Los valores de desviación estándar obtenidos fueron bajos en todas las etapas del proceso. En la primera extracción, las desviaciones estándar variaron entre 0,0016 y 0,0092, mientras que en la segunda extracción oscilaron entre 0,0015 y 0,0083. Estos resultados evidencian una baja dispersión entre las tres mediciones realizadas para cada muestra. Al analizar la variabilidad relativa mediante el %RSD, se encontró que todos los valores permanecieron por debajo del 3%, con intervalos comprendidos entre 0,66 y 2,00 %, indicando una baja variabilidad entre las mediciones realizadas para cada etapa. Por otra parte, los intervalos de confianza al 95 % fueron estrechos en relación con los valores promedio reportados. Esto indica que la incertidumbre asociada a las mediciones es reducida y que los valores promedio obtenidos presentan una dispersión limitada alrededor de la media.

La comparación entre ambos procesos muestra una tendencia similar en el comportamiento de la actividad enzimática a lo largo de las diferentes etapas de extracción y semipurificación. En ambos casos, la ultrafiltración produjo el mayor incremento en la actividad enzimática, siendo la etapa donde se obtuvieron los valores más altos de actividad.

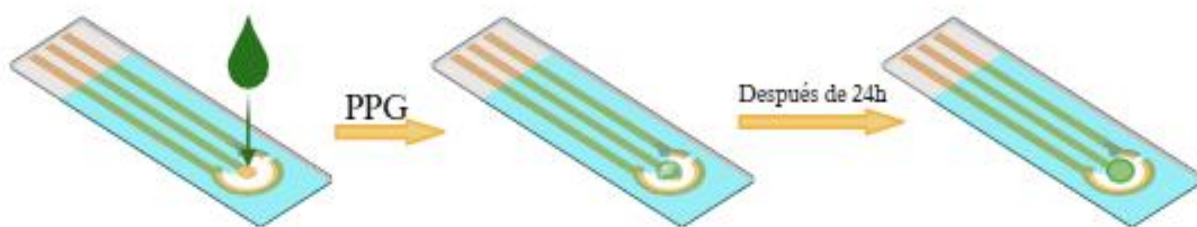
Dado que los resultados obtenidos en ambas extracciones presentaron comportamientos semejantes, se emplearon los valores obtenidos en la segunda extracción para la construcción de la tabla de purificación (*Tabla 6*) y análisis posteriores desarrollados en este trabajo.

4.2 Inmovilización de la peroxidasa en los electrodos de nanopartículas de oro

A través de adsorción física (Figura 13) se inmovilizó la PPG en los Au-SPCE. Esto se hizo depositando 10 μ L del extracto enzimático sobre el electrodo de trabajo, dejando secar a la oscuridad y a temperatura ambiente por 24 horas. De esta manera se modificaron los electrodos Au-SPGE/PPG con el extracto ultrafiltrado.

Figura 13

Modificación de los Au -SPGE con PPG



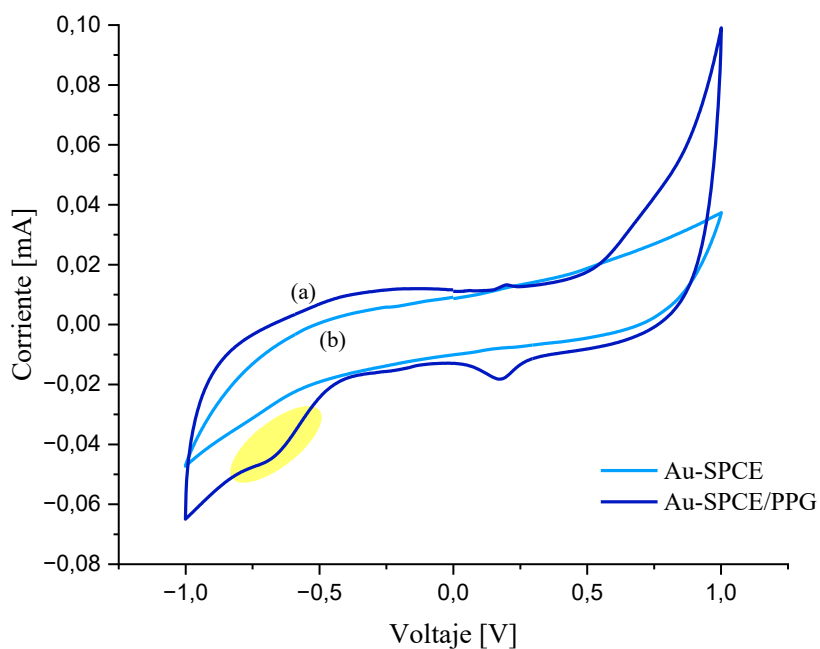
4.2.1. Evaluación de la respuesta del electrodo modificado frente al peróxido de hidrógeno

Se realizó un ensayo para evaluar si los electrodos modificados con los extractos de PPG tenían respuesta frente al peróxido de hidrógeno, para esto se tomaron VCs del electrodo modificado y el electrodo sin modificar en una solución de H_2O_2 0,1mM a 50 mVs^{-1} (Figura 14). Se observa que en el electrodo modificado surge una señal a -0,63V que no se presentan en el electrodo sin modificar por lo que se relaciona a la reducción del H_2O_2 mediada por la enzima.

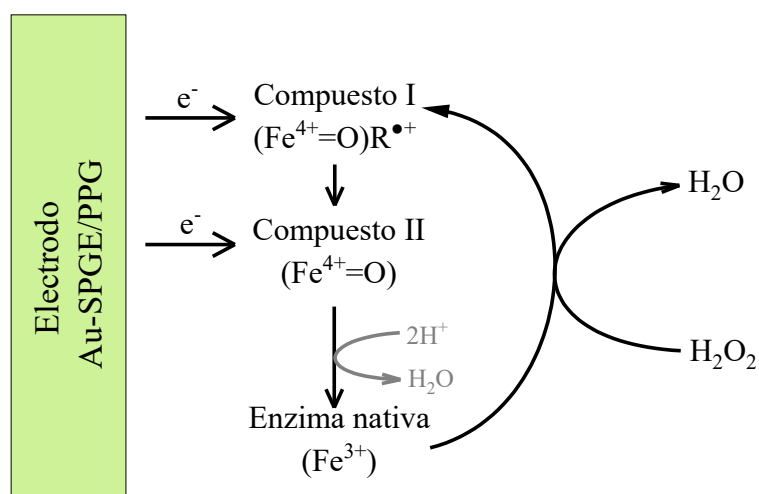
Lo anterior es posible debido al mecanismo de transferencia electrónica directa de las peroxidasas sobre electrodos (*Figura 15*), en el cual, durante un primer paso del ciclo catalítico, la enzima reduce al H_2O_2 y, a su vez, este oxida a la enzima mediante una reacción de transferencia de dos electrones al compuesto I, este intermediario recibe un electrón para generar el compuesto II, el cual acepta un segundo electrón para regenerar el estado nativo Fe^{3+} , ambas reducciones secuenciales son realizadas por el electrodo sin la necesidad de utilizar mediadores redox externos. La ausencia o disminución del pico anódico en presencia del peróxido de hidrógeno es atribuido a que el ciclo enzimático consume continuamente los intermediarios reducidos (Compuestos I y II), desplazando el equilibrio hacia la reducción y suprimiendo la respuesta de oxidación en el barrido de retorno. (*Ruan et al. 1997*).

Figura 14

Voltamperograma cíclico de los electrodos con solución 0,1 mM de H_2O_2 a 50 mV/s de (a) Au-SPGE (b) Au-SPGE/PPG.

**Figura 15**

Mecanismo de la reducción bielectrocatalítica directa del peróxido de hidrógeno en electrodo modificados con PPG.



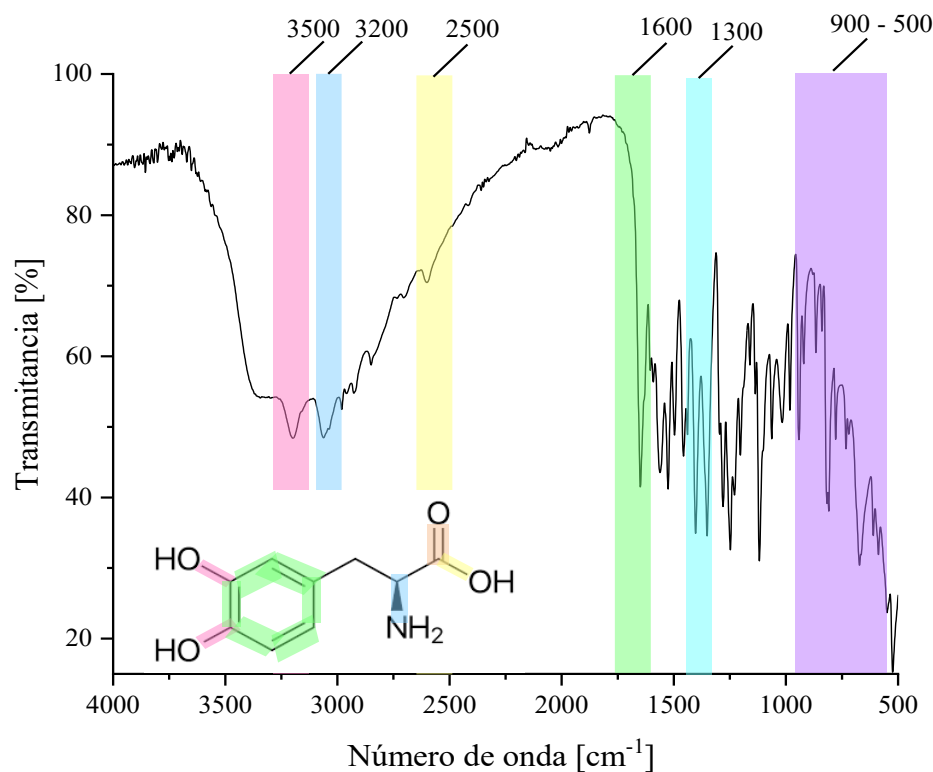
Nota. Adaptado de Ruzgas et al. (1996):

4.3. Caracterización de las muestras de L-Dopa a través de FT-IR y UV-Vis

El espectro infrarrojo de la muestra presenta las bandas características correspondientes a la estructura de la L-DOPA (*Figura 16*), mismas que validan la integridad química del compuesto y la presencia de sus grupos funcionales importantes como el grupo amino, carboxilo y catecol según reportes hechos por Bismi E. y Hubert J en el 2017.

Figura 16

Espectro experimental FT-IR de L-Dopa

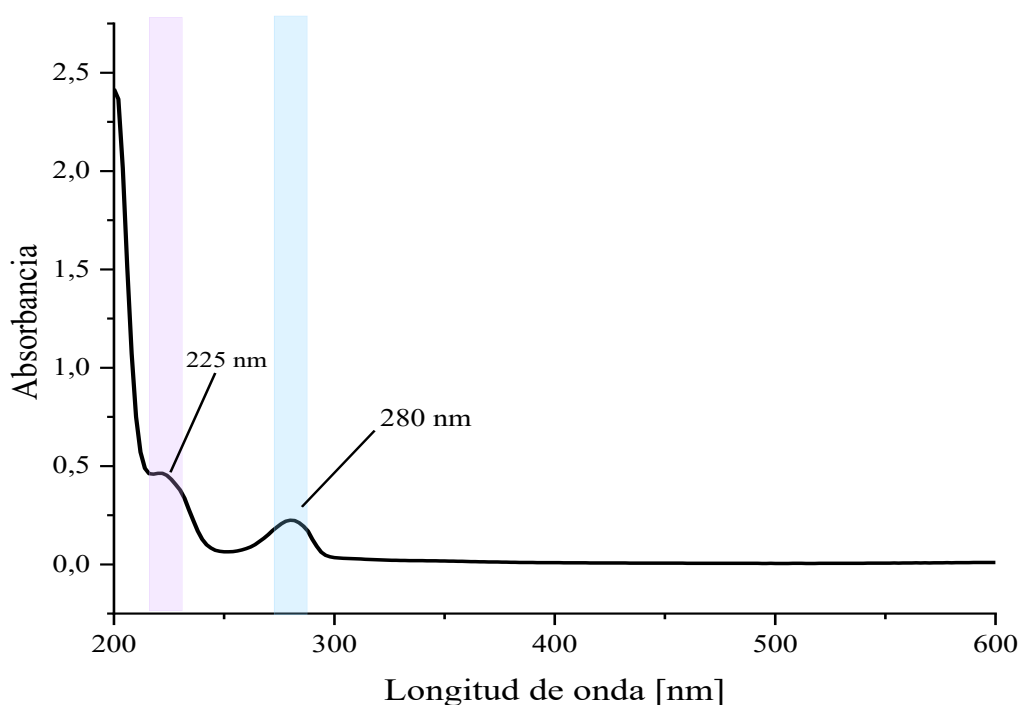


El análisis del espectro UV-Vis de la LD registrado en disolución acuosa (*Figura 17*) muestra dos máximos de absorción claramente diferenciados a 225 nm y 280 nm. Según *Andrade et al. (2021)* la banda centrada a 280 nm se atribuye a la transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema aromático del catecol. La banda a 225 nm corresponde a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de

mayor energía, también asociada al anillo aromático, pero solapada con contribuciones de transiciones $n \rightarrow \pi^*$ de los pares electrónicos no enlazantes de los oxígenos fenólicos y del grupo carboxilo. La ausencia de absorción significativa por encima de 400 nm descarta la degradación extensiva del anillo a o-quinona, indicando que la muestra se encuentra en su forma reducida.

Figura 17

Espectro experimental UV-Vis de L-Dopa



4.4 Determinación de la concentración óptima de LD mediante cinética enzimática por UV-Vis

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de LD para la operación del biosensor, se realizó el seguimiento cinético de la reacción entre la LD y la PPG en presencia de H_2O_2 evaluando tres concentraciones del analito (0,25 mM, 2,54 mM y 25,4 mM) a través de

espectrofotometría a 475 nm. Esta determinación es importante para garantizar que el biosensor trabaje bajo condiciones en las que se obtenga una detección electroquímica de la LD.

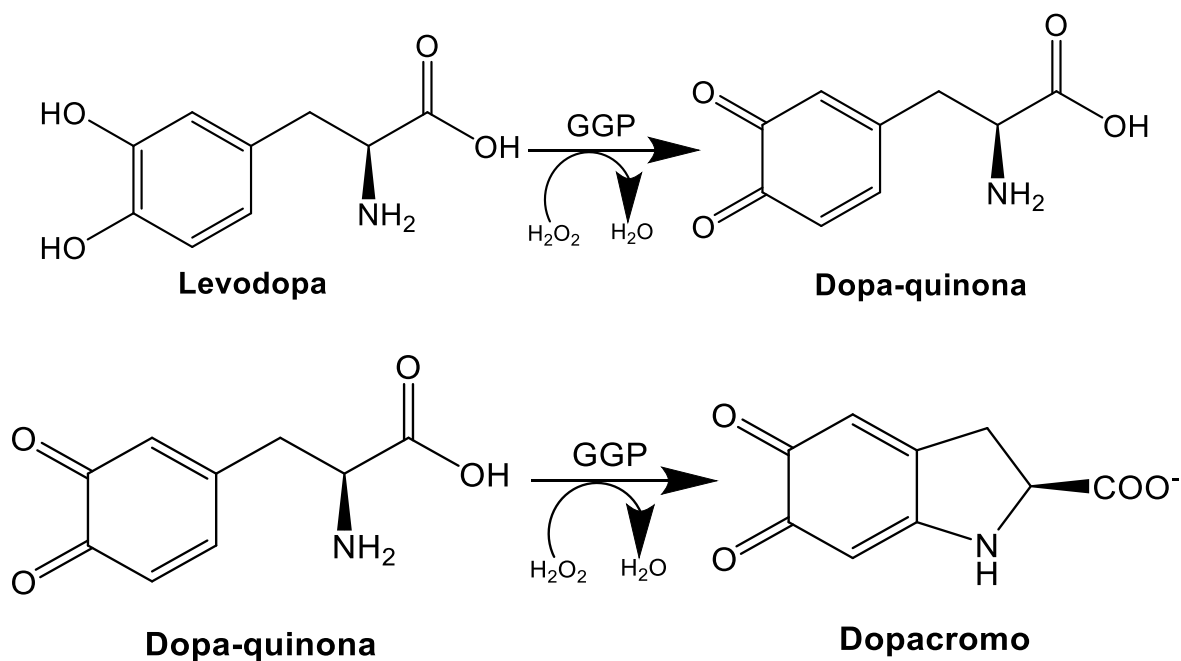
El seguimiento de la reacción enzimática de las tres concentraciones evaluadas reveló que a valores de 25,4 mM y 2,54 mM de LD, la variación de absorbancia a 475 nm mostró una tendencia negativa a lo largo del tiempo, es decir, una disminución progresiva de la señal en lugar del incremento esperado por la acumulación del producto de oxidación. Este comportamiento puede atribuirse a dos fenómenos concurrentes: en primer lugar, a la inhibición por exceso de sustrato, suceso que ocurre en cinética enzimática descrito por Segel (2013) en donde concentraciones de sustrato muy superiores a la K_m saturan el sitio activo de la enzima e inhiben su actividad catalítica; en segundo lugar, a la reducción no enzimática de la dopaquinona generada por el exceso de LD presente en el medio, en el cual el producto oxidado (dopacromo, absorbente a 475 nm) es reducido nuevamente al sustrato de partida por las moléculas de LD en exceso, impidiendo la acumulación neta del producto coloreado y generando así la caída observada en la absorbancia. Ambos efectos combinados explican que a concentraciones elevadas el sistema no genere una señal analíticamente útil. (Wenzel *et al*, 2024).

Por el contrario, a concentración de 0,25 mM de LD se registró un incremento sostenido de la absorbancia a 475 nm en función del tiempo, correspondiente a la acumulación progresiva del producto de oxidación catalizado por la PPG en presencia de H_2O_2 . Esta respuesta positiva y lineal indica que a dicha concentración el sustrato se encuentra dentro del intervalo donde la enzima opera bajo condiciones cinéticas favorables, sin fenómenos de inhibición ni de consumo competitivo del producto. En consecuencia, 0,25 mM fue seleccionada como la concentración de

trabajo para el desarrollo del biosensor, al ser la única condición evaluada que proporcionó una respuesta enzimática detectable y dentro del intervalo lineal de detección requerido para fines analíticos. (Prah *et al.* 2024)

Figura 18

Generación del dopacromo a partir de la oxidación de la LD



Nota. Tomado y ajustado de Zhu et al (1994)

4.5. Evaluación de respuesta del electrodo modificado frente a L-Dopa a través de voltamperometría cíclica.

Figura 19

Voltamperogramas cíclicos evaluados en tres diferentes sistemas: (a) Electrodo Au-SPCE con PPG inmovilizada, LD y H_2O_2 5 mM, (b) Electrodo Au-SPCE con PPG inmovilizada y LD y (c) Electrodo Au-SPCE y LD.

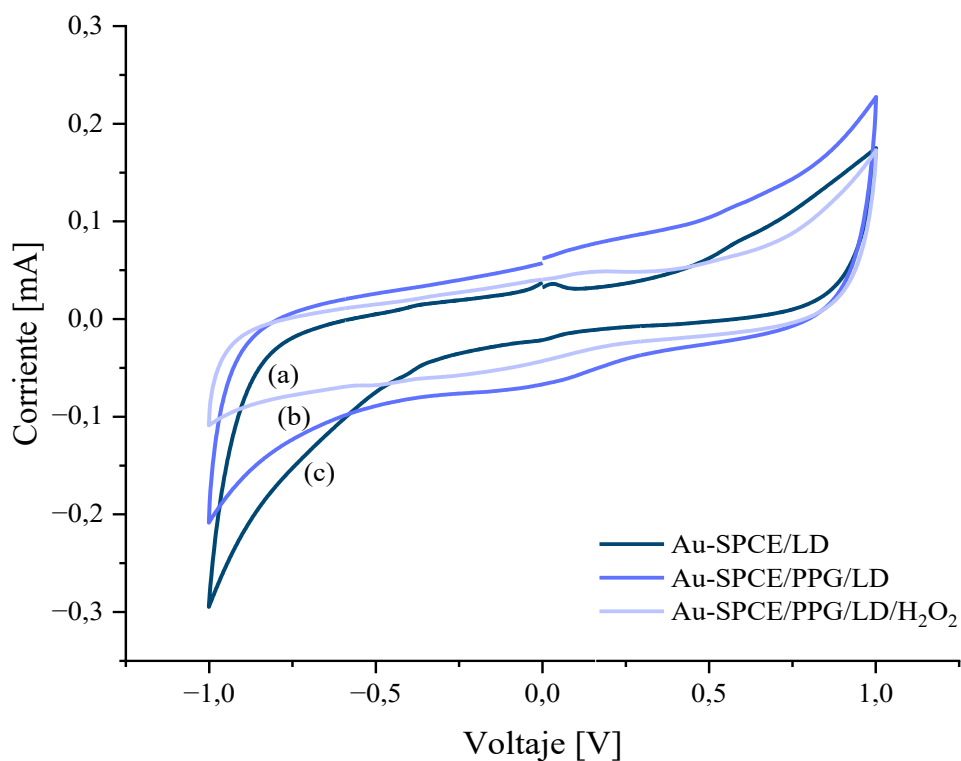


Tabla 9

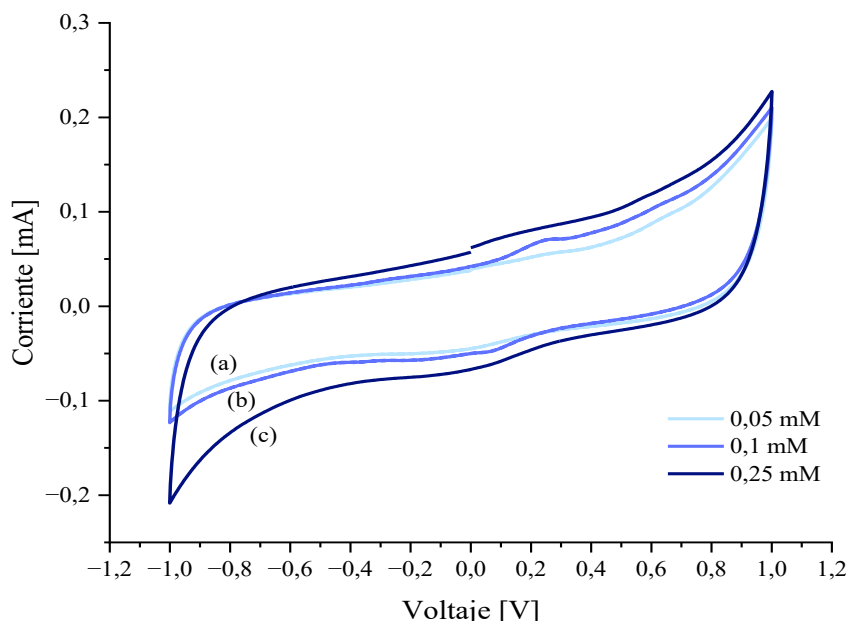
Valores de corriente y potencial de los picos anódicos y catódicos de voltamperogramas cíclicos de los sistemas estudiados.

Sistema	E _{pa} [mV]	E _{pc} [mV]	I _{pc} [μA]	I _{pa} [μA]	ΔE _p [mV]	I _{pc} /I _{pa}
Au-SPCE/LD	590	-22	-50	80	612	-0,63
Au-SPCE/PPG/LD	600	-40	-60	120	640	-0,5
Au-SPCE/PPG/LD/H₂O₂	127	-110	-29	48	237	-0,6

La evaluación electroquímica del electrodo Au-SPCE frente a la detección de levodopa (LD) se realizó mediante voltamperometría cíclica, considerando tres sistemas: LD, LD en presencia de H_2O_2 (5 mM) y PPG inmovilizada en presencia de LD y H_2O_2 (5 mM). Como se observa en la Figura 14, el sistema que contiene únicamente LD presenta una respuesta electroquímica asociada con su proceso de oxidación, evidenciándose una señal alrededor de +0,18 V. La incorporación de H_2O_2 modifica la respuesta del sistema, debido a su participación como cosustrato en el ciclo catalítico de la peroxidasa. Por su parte, al incorporar la PPG inmovilizada junto con LD y H_2O_2 , se observa una modificación de la respuesta voltamétrica, lo que permite evidenciar la participación del componente enzimático en el proceso de detección. El potencial de oxidación obtenido para el sistema desarrollado (+0,18 V) resulta comparable con los valores reportados para otros sistemas electroquímicos empleados en la detección de LD, cuyos potenciales se encuentran entre +0,19 y +0,20 V. En particular, el valor obtenido en este trabajo es ligeramente inferior al reportado para sistemas basados en HRP, DOPA-dioxigenasa y porfirina de Co(II), lo que representa un resultado favorable, ya que el empleo de potenciales relativamente bajos puede contribuir a disminuir la oxidación de otras especies electroactivas presentes en una matriz y, por tanto, reducir posibles interferencias. No obstante, esta comparación debe realizarse con precaución debido a las diferencias existentes entre las técnicas electroquímicas, los materiales de electrodo y las condiciones experimentales empleadas en cada estudio. En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que el electrodo modificado con Au y PPG presenta una respuesta electroquímica frente a LD y constituye una alternativa potencial para su detección mediante un sistema bioelectroquímico.

Figura 20

Voltamperogramas cíclicos del electrodo Au-SPCE con PPG inmovilizada a diferentes concentraciones de LD



Los CVs reflejados en la *Figura 20* obtenidos para el electrodo Au-SPCE/PPG mostraron un incremento progresivo de la corriente conforme aumentó la concentración de LD desde 0,05 mM hasta 0,25 mM. Este comportamiento evidencia una respuesta electroquímica dependiente de la concentración del analito, indicando que la POD inmovilizada mantiene su actividad catalítica sobre la superficie del electrodo y favorece la transferencia electrónica durante el proceso redox de la LD.

La ausencia de deformaciones significativas o desplazamientos pronunciados en los picos electroquímicos sugiere que el proceso de transferencia electrónica ocurre de manera estable dentro del rango de concentraciones evaluado. Estos resultados respaldan el potencial del electrodo Au-SPCE/PPG como plataforma bioelectroquímica para la detección de LD.

4. Conclusiones

La extracción y purificación parcial de la peroxidasa de pasto guinea permitió incrementar la actividad total de la enzima, pasando de 0,350 U en el extracto crudo a 4,880 U tras la etapa de ultrafiltración. Asimismo, se obtuvo un factor de purificación de 63,756 y un rendimiento de 1395%, lo que sugiere que las etapas aplicadas eliminaron progresivamente los inhibidores endógenos presentes en el extracto que suprimían la actividad catalítica de la enzima. Estos resultados validan el protocolo de semi-purificación como una estrategia adecuada para obtener una preparación enzimática con actividad suficiente para su uso en aplicaciones bioanalíticas.

La realización de las muestras de LD y posterior análisis mediante espectroscopía FT-IR y UV-Vis confirmó la identidad química e integridad estructural del compuesto utilizado como analito.

La inmovilización de la PPG sobre el electrodo Au-SPCE fue confirmada mediante voltamperometría cíclica, evidenciada por la aparición de la señal catódica a $-0,6$ V atribuida a la reducción secuencial del Compuesto I y el Compuesto II del ciclo catalítico de la peroxidasa, señales completamente ausentes en el electrodo sin modificar, algo que también se evidencia en otras POD de plantas. Esto confirmó la transferencia directa de electrones entre el centro hemo de la PPG y la superficie del electrodo, sin necesidad de mediadores redox externos, validando la funcionalidad del electrodo modificado.

La evaluación electroquímica del sistema de detección de LD demostró que el electrodo Au-SPCE/PPG en presencia de LD, sin adición de H_2O_2 externo, presentó el mejor desempeño analítico. Este sistema produjo la mayor corriente de pico anódica ($120 \mu\text{A}$), correspondiente

a un incremento respecto al electrodo sin modificar ($80 \mu\text{A}$), este comportamiento confirma que la inmovilización de la PPG favoreció la transferencia de electrones y potenció la respuesta electroquímica del sistema hacia la oxidación de la LD.

Por otro lado, la adición de H_2O_2 a 5 mM suprimió la señal analítica debido a la inhibición de la actividad de la enzima ocasionada por exceso de cosustrato, estableciendo así que la detección de LD sin adición externa de peróxido de hidrógeno constituye la condición óptima del sistema, resaltando el potencial del electrodo Au-SPCE/PPG como plataforma bioelectroquímica eficiente para la detección del analito de interés.

5. Recomendaciones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las limitaciones identificadas a lo largo del desarrollo del presente trabajo, se plantean las siguientes recomendaciones para investigaciones futuras:

- Respecto a la inmovilización de la PPG sobre el electrodo, se recomienda evaluar otras estrategias alternativas de inmovilización, con el objetivo de optimizar la accesibilidad del centro hemo al electrodo y maximizar la eficiencia de la transferencia directa de electrones.
- Una limitación importante del presente trabajo fue la disponibilidad reducida de electrodos serigrafiados, lo que impidió realizar experimentos adicionales de gran relevancia analítica. En este sentido, se recomienda prioritariamente llevar a cabo mediciones por cronoamperometría, técnica que permitiría establecer la respuesta de corriente del biosensor en función del tiempo a un potencial fijo, obteniendo información cuantitativa sobre la cinética de detección de la LD. Complementariamente, se recomienda evaluar la selectividad del biosensor frente a interferentes de relevancia clínica presentes en matrices biológicas reales, tales como ácido ascórbico, dopamina, ácido úrico y glucosa, compuestos que comparten características electroquímicas similares a la LD y que podrían generar señales solapadas en condiciones de aplicación real. Estos experimentos, que no pudieron realizarse en el presente trabajo por las limitaciones mencionadas, son indispensables para establecer la selectividad, sensibilidad y viabilidad clínica del biosensor desarrollado a partir de la peroxidasa de pasto guinea.

Referencias Bibliográficas

- Tai, M. D. S., Gamiz-Arco, G., & Martinez, A. (2024). Dopamine synthesis and transport: current and novel therapeutics for parkinsonisms. *Biochemical Society Transactions*, 52(3), 1275-1291. <https://doi.org/10.1042/bst20231061>
- Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (s. f.). Parkinson's disease. *The Lancet*, 397(10291), 2284-2303. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00218-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00218-x)
- Octobre, G., Delprat, N., Doumèche, B., y Leca-Bouvier, B. (2024). Herbicide detection: A review of enzyme- and cell-based biosensors. *Environmental Research*, 249(2024), 118330. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118330>
- Songa, E. A., Arotiba, O. A., Owino, J. H., Jahed, N., Baker, P. G., y Iwuoha, E. I. (2009). Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry* (Amsterdam, Netherlands), 75(2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.02.007>
- Rodionov, P.V., Alieva, E.A., Sergeeva, E.A., Veselova, I. A. y Shekhovtsova, T. N. (2016). Determination of hydrogen peroxide and organic peroxides in micellar and aqueous–organic media using a spectrophotometric biosensor based on horseradish peroxidase. *Journal of Analytical Chemistry*, 71, 932–943. <https://doi.org/10.1134/S1061934816090148>

Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Bastida, J., y Máximo, M. F. (2006). Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemosphere*, 63(4), 626-632.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.007>"

Dave, B., Sanghvi, G. (2022). Enzyme Action for Dye Degradation. En S.S. Muthu y A. Khadir. (Ed.), *Dye Biodegradation, Mechanisms and Techniques. Sustainable Textiles: Production, Processing, Manufacturing & Chemistry* (p. 141-163). Springer Nature Singapore.

https://doi.org/10.1007/978-981-16-5932-4_6"

Chattopadhyay, K., y Mazumdar, S. (2000). Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH. *Biochemistry*, 39(1), 263-270.

<https://doi.org/10.1021/bi990729o>"

Wang, T., Tian, J., Li, T., y Li, J. (2016, March). Enzyme properties and thermal stability of horseradish peroxidase (HRP-DL). *Proceedings of the 2016 International Conference on Engineering and Technology Innovations*. <https://doi.org/10.2991/iceti-16.2016.40>

Alpeeva, I. S., Niculescu-Nistor, M., Leon, J. C., Csöregi, E., y 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>

Simmonds, P. K., Nyhan, D., & Berkowitz, D. E. (2008). Cardiovascular Pharmacological agents. En Elsevier eBooks (pp. 17-60). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-01810-4.10002-1>

Liu, X., & Liu, J. (2020). Biosensors and sensors for dopamine detection. View, 2(1).
<https://doi.org/10.1002/viw.20200102>

Mujahid, A., & Dickert, F. L. (2016). Molecularly imprinted polymers. En Elsevier eBooks (pp. 79-101).
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801301-4.00005-0>

Palmer, T., & Bonner, P. L. (2011). An Introduction to Enzymes. En Elsevier eBooks (pp. 2-13).
<https://doi.org/10.1533/9780857099921.1.2>

Hou, M., & Ge, J. (2017). Armoring Enzymes by Metal–Organic Frameworks by the Coprecipitation Method. Methods In Enzymology On CD-ROM/Methods In Enzymology, 59-75.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.12.002>

Motoyama, T., Yamamoto, Y., Ishida, C., Hasebe, F., Kawamura, Y., Shigeta, Y., Ito, S., y Nakano, S. (2022). Reaction Mechanism of Ancestral l-Lys α -Oxidase from *Caulobacter* Species Studied by Biochemical, Structural, and Computational Analysis. ACS Omega, 7(48), 44407-44419.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06334>

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

Song, X., Liu, J., & Wang, B. (2022). Emergence of Function from Nonheme Diiron Oxygenases: A Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study of Oxygen Activation and Organophosphate Catabolism Mechanisms by PhnZ. *ACS Catalysis*, 12(3), 2009–2022. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c05116>

Enzymes by class (2024). ExplorEnz - the Enzyme Database. Recuperado de https://www.enzyme-database.org/class.php?c=1&sc=*&ssc=0

Motoyama, T., Yamamoto, Y., Ishida, C., Hasebe, F., Kawamura, Y., Shigeta, Y., Ito, S., y Nakano, S. (2022). Reaction Mechanism of Ancestral l-Lys α -Oxidase from *Caulobacter* Species Studied by Biochemical, Structural, and Computational Analysis. *ACS Omega*, 7(48), 44407-44419. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06334>

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

Song, X., Liu, J., & Wang, B. (2022). Emergence of Function from Nonheme Diiron Oxygenases: A Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study of Oxygen Activation and" Catabolism Mechanisms by PhnZ. *ACS Catalysis*, 12(3), 2009–2022. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c05116>

Yoo, S., Kim, S., Jeon, S., y Han, M. S. (2022). Aldehyde N,N-dimethylhydrazone-based

fluorescent substrate for peroxidase-mediated assays. *RSC Advances*, 12(14), 8668–8673.

<https://doi.org/10.1039/D2RA00087C>"

Elmetwalli, A., Allam, N. G., Hassan, M. G., Albalawi, A. N., Shalaby, A., El-Said, K., y Salama, A. F. (2023). Evaluation of *Bacillus aryabhattai* B8W22 peroxidase for phenol removal in waste water effluents. *BMC Microbiology*, 23(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02850-9>

Ivanec-Goranina, R. (2024). Kinetic Study of *Coprinus cinereus* Peroxidase-Catalyzed Oxidation of 2,2'-Dihydroxyazobenzene. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 828. <https://doi.org/10.3390/ijms25020828>"

Wanjari, V. P., Reddy, A. S., Duttagupta, S. P., y Singh, S. P. (2023). Laser-induced graphene-based electrochemical biosensors for environmental applications: a perspective. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(15), 42643–42657. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21035-x>

Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. y Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors -Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>

Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., y Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/B714449K>"

Clark Jr, L. C., y Sachs, G. (1968). BIOELECTRODES FOR TISSUE METABOLISM*. *Annals of*

the New York Academy of Sciences, 148(1), 133-153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb20346.x>"

Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D. S., Datta, S., Prasad, R., y Singh, J. (2020). Biological Biosensors for Monitoring and Diagnosis. En J. Singh, A. Vyas, S. Wang, y R. Prasad (Eds.), *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications* (pp. 317–335). SpringerSingapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2817-0_14

Rafaqat, S., Perveen, B., Raqba, Imran, W., Hussain, A., y Ali, N. (2024). Development of manganese peroxidase based voltammetric biosensor for detection of textile Azo dyes RR 195 & RB 221. *Materials Chemistry and Physics*, 312, 128647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.128647>

Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L., y Marko-Varga, G. (1996). Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica*"

Centeno, D. A., Solano, X. H., & Castillo, J. J. (2017). A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry*, 116, 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.03.005>

Raghu, P., Reddy, T. M., Gopal, P., Reddaiah, K., & Sreedhar, N. (2014). A novel horseradish peroxidase biosensor towards the detection of dopamine: A voltammetric study. *Enzyme And Microbial Technology*, 57, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.01.002>

Aldred, J., Nutt, J., & Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA. (2008). LEVODOPA. ELSERVIER.

Quintino, M. S. M., Yamashita, M., & Angnes, L. (2006). Voltammetric Studies and Determination of Levodopa and Carbidopa in Pharmaceutical Products. *Electroanalysis*, 18(7), 655-661. <https://doi.org/10.1002/elan.200503445>

Mazloun-Ardakani, M., Ganjipour, B., Beitollahi, H., Amini, M. K., Mirkhalaf, F., Naeimi, H., & Nejati-Barzoki, M. (2011). Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and tryptophan using nanostructured electrochemical sensor based on novel hydroquinone and carbon nanotubes: Application to the analysis of some real samples. *Electrochimica Acta*, 56(25), 9113-9120. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.07.021>

Crapnell, R. D., & Banks, C. E. (2023). Electroanalytical Overview: The Determination of Levodopa (L-DOPA). *ACS Measurement Science Au*, 3(2), 84-97. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00071>

LeWitt, P. A. (2008b). Levodopa for the Treatment of Parkinson's Disease. *New England Journal Of Medicine*, 359(23), 2468-2476. <https://doi.org/10.1056/nejmct0800326>

Hijaz, B. A., & Volpicelli-Daley, L. A. (2020). Initiation and propagation of α -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6>

Ji, J. L., Spronk, M., Kulkarni, K., Repovš, G., Anticevic, A., & Cole, M. W. (2018). Mapping the human brain's cortical-subcortical functional network organization. *NeuroImage*, 185, 35-57. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.10.006>

Crapnell, R. D., & Banks, C. E. (2023c). Electroanalytical Overview: The Determination of Levodopa (L-DOPA). *ACS Measurement Science Au*, 3(2), 84-97. <https://doi.org/10.1021/acsmasuresciau.2c00071>

Bergamini, M. F., Santos, A. L., Stradiotto, N. R., & Zanoni, M. V. B. (2005). A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 39(1-2), 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.03.014>

Hornykiewicz, O. (2010). A brief history of levodopa. *Journal Of Neurology*, 257(S2), 249-252. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5741-y>

Probst, D., Batchu, K., Younce, J. R., & Sode, K. (2024). Levodopa: From Biological Significance to Continuous Monitoring. *ACS Sensors*, 9(8), 3828-3839. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c00602>

Crapnell, R. D., & Banks, C. E. (2023). Electroanalytical Overview: The Determination of Levodopa (L-DOPA). *ACS Measurement Science Au*, 3(2), 84-97. <https://doi.org/10.1021/acsmasuresciau.2c00071>

Zafar, S., Lui, F., & Yaddanapudi, S. S. (2025, 15 septiembre). Parkinson Disease. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470193/>

Checking your browser - reCAPTCHA. (s. f.). <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3234454/>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539412000497>

Echarri, B. E. (2015, 24 abril). Haba (Vicia faba). Leguminosas papilionaceas. Revista Acofarma. <https://revistaacofarma.com/articulos/fitoterapia/haba-vicia-faba-leguminosas-papilionaceas/>

Narváez, A., & Domínguez, E. (2005). ENZYMES | Overview. En Elsevier eBooks (pp. 508-523). <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00140-0>

De Oliveira, F. K., Santos, L. O., & Buffon, J. G. (2021). Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. Food Research International, 143, 110266. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>

Twala, P. P., Mitema, A., Baburam, C., & Feto, N. A. (2020). Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. AIMS Microbiology, 6(3), 330-349. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020020>

Yamada, H., Yoshii, K., Asahi, M., Chiku, M., & Kitazumi, Y. (2022). Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals. Electrochemistry, 90(10), 102005. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>

- Abu, R. S.; Prabhu, P.; Narayanan, S. S. Highly Selective Determination of L-Dopa Using Ionic Liquid Medium Synthesized Copper Nanoparticles Modified Electrode. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2016, 16 (8), 8711– 8718, DOI: 10.1166/jnn.2016.11709
- Kannan, A.; Radhakrishnan, S. Fabrication of an electrochemical sensor based on gold nanoparticles functionalized polypyrrole nanotubes for the highly sensitive detection of l-dopa. *Materials Today Communications* 2020, 25, 101330, DOI: 10.1016/j.mtcomm.2020.101330
- Teixeira, M. F. S.; Bergamini, M. F.; Marques, C. M. P.; Bocchi, N. Voltammetric determination of L-dopa using an electrode modified with trinuclear ruthenium ammine complex (Ru-red) supported on Y-type zeolite. *Talanta* 2004, 63 (4), 1083– 1088, DOI: 10.1016/j.talanta.2004.01.018
- Bergamini, M. F.; Santos, A. L.; Stradiotto, N. R.; Zanoni, M. V. B. A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 39 (1), 54– 59, DOI: 10.1016/j.jpba.2005.03.014
- Edwin, B., & Joe, I. H. (2012). Vibrational spectral analysis of anti-neurodegenerative drug Levodopa: A DFT study. *Journal Of Molecular Structure*, 1034, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.09.004>
- Ruan, C., Yang, R., Chen, X., & Deng, J. (1998). A reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalently binding horseradish peroxidase and thionine using a thiol-modified

gold electrode. Journal Of Electroanalytical Chemistry, 455(1-2), 121-125.
[https://doi.org/10.1016/s0022-0728\(98\)00153-3](https://doi.org/10.1016/s0022-0728(98)00153-3)

Wenzel, T. (2023, 16 marzo). 1.2: Beer's Law. Chemistry LibreTexts.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Molecular_and_Atomic_Spectroscopy_\(Wenzel\)/1:_General_Background_on_Molecular_Spectroscopy/1.2:_Beers_Law](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Molecular_and_Atomic_Spectroscopy_(Wenzel)/1:_General_Background_on_Molecular_Spectroscopy/1.2:_Beers_Law)

Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K. G., & Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. Protein Science, 10(1), 108-115. <https://doi.org/10.1110/ps.37301>

Harvey, D. (2022, 2 noviembre). 25.4: Voltamperometría cíclica. LibreTexts Español.
https://espanol.libretexts.org/Bookshelves/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/An%C3%A1lisis_Instrumental_%28LibreTextos%29/25%3A_Voltamperometr%C3%ADa/25.04%3A_Voltamperometr%C3%ADa_c%C3%ADlica

Mercy, Oyitabu Ifunanya; Nayana, D. N.; Shreya, K.; Sumeer, J. Baseer U. L.; Lingesh Kumar, M. S.; Nayak, Gagana D.; Bukka, Rama; Nargund, Rama; Bhaskar, Vijaya S.; Nargund, Shravan L.; Nargund, Shachindra L.; Devi, Vemula Kusum; Joshi, Vijaya G.; Nidhi, Malviya. (s. f.). UV-Visible Spectrophotometric method development and validation for the estimation of levodopa in nasal medium.
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawl>

er&jrnl=22501177&AN=189243756&h=DRrbyFB4LoaZE3huPq1vuksN4YJ%2FJ7bCTBXVAR0wl3AcIuiKuoQ8hktj6m7XAgKQ0fi8rb7EfTRPgcCnKSeMPA%3D%3D&crl=c

Twala, P. P., Mitema, A., Baburam, C., & Feto, N. A. (2020b). Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. *AIMS Microbiology*, 6(3), 330-349. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020020>

Narváez, A., & Domínguez, E. (2005b). ENZYMES | Overview. En Elsevier eBooks (pp. 508-523). <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00140-0>

Nesakumar, N., Berchmans, S., & Alwarappan, S. (2018). Chemically modified carbon based electrodes for the detection of reduced glutathione. *Sensors And Actuators B Chemical*, 264, 448-466. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.224>

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2017). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal Of Chemical Education*, 95(2), 197-206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>

Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. A. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., & Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>

Segel, I. (2013). Enzyme kinetics. En Encyclopedia of Biological Chemistry (pp. 216-220).

<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378630-2.00012-8>

APÉNDICES

Apéndice A Curva de Calibración para cuantificación de proteínas.

Figura 21

Curva de calibración BCA para la determinación de concentración de proteínas.

