

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Inmovilización De La Enzima Peroxidasa de Rábano Picante Sobre Óxido de Grafeno

Angie Nathalia Larrotta Garcés

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Hermisul de Jesús Cano Calle

PhD en Química

Codirector

Enrique Mejía Ospino

PhD en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

“Este trabajo está dedicado especialmente a Dios, por ser mi guía en este camino académico, por su misericordia, resiliencia y sabiduría. A mi nona, Lilia Amaya, por apoyarme en cada paso de mi vida y confiar en mí. A mis papás, Fabio Larrotta Amaya y Sonia Garcés Cediel, por su guía, apoyo y amor infinito. A mi hermana, Alejandra Larrotta Garcés, por su compañía y ser mi motor cada día. A María Gabriela Gámez, por vivir este recorrido conmigo y su apoyo incondicional. Este logro es para todos ustedes que nunca me han soltado, los amo.”

Agradecimientos

Agradezco a Dios por la vida y la oportunidad de esta formación académica, que me abrió el horizonte a nivel profesional.

A mi director, PhD Herminul de Jesús Cano y mi co-director, PhD Enrique Mejía Ospino, por su paciencia, apoyo y orientación científica. Su conocimiento ha sido fundamental en mi desarrollo profesional y en la culminación de este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander por brindarme la formación académica y los espacios necesarios para el desarrollo de mi formación académica. Su compromiso con la educación y la investigación fue fundamental para fortalecer mis conocimientos y habilidades durante este proceso.

Al grupo de investigación LEAM, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de grado allí, por las personas que conocí que me aportaron conocimiento y tiempo.

A mis evaluadores, por el tiempo de la lectura y evaluación de este trabajo.

Tabla de contenido

Introducción	10
1 Marco Conceptual.....	13
1.1 Enzimas como Catalizadores Biológicos.....	13
1.2 Inmovilización Enzimática	13
1.2.1 Adsorción Física	14
1.2.2 Enlazamiento Covalente	14
1.2.3 Atrapamiento.....	15
1.2.4 Entrecruzamiento	15
1.3 Peroxidasa de Rábano Picante	15
1.4 Nanomateriales Como Soporte Para Enzimas	17
1.5 Óxido de Grafeno.....	18
1.6 Acoplamiento OG-HRP	19
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivo General.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3 Materiales y Metodología	21
3.1 Reactivos.....	21
3.2 Síntesis Óxido de Grafeno	21
3.3 Inmovilización Peroxidasa de Rábano Picante en Óxido de Grafeno	22
3.4 Evaluación de la Actividad Enzimática	24
3.5 Evaluación Ciclos de Reutilización del Sistema OG-HRP.....	24
4 Resultados y Discusión.....	25
4.1 Síntesis del OG	25
4.1.1 Espectroscopia Raman.....	27

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

4.2	Acoplamiento y Evaluación Catalítica del sistema OG-HRP.....	28
4.2.1.1	Actividades de los Sobrenadantes	31
4.2.1.2	Actividad del Sistema OG-HRP	35
4.2.2	Evaluación de los Ciclos de Reutilización.....	35
	Conclusiones.....	41
	Recomendaciones	44
	Referencias Bibliográficas	45

Lista de figuras

Figura 1 Reacción General de la Enzima y Mecanismo de la Reacción Catalítica de la HRP durante la reducción del peróxido de hidrógeno.....	16
Figura 2 Estructura del Oxido de Grafeno y el Proceso de Oxidación Química.....	18
Figura 3 Dispersión exfoliada de óxido de grafeno y material liofilizado obtenido.	26
Figura 4 Espectros Raman del grafito y del óxido de grafeno sintetizado, mostrando las bandas D y G características de materiales carbonosos.....	27
Figura 5 Curvas de absorbancia en función del tiempo para los sobrenadantes de las diferentes condiciones OG-HRP.....	34
Figura 6 Actividad enzimática del sistema OG-HRP en función del número de ciclos de reutilización.....	36
Figura 7 Curvas de absorbancia en función del tiempo para los diferentes ciclos de reutilización del sistema OG-HRP.....	37

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones de inmovilización del sistema OG-HR.	29
Tabla 2. Resultados de pendientes, actividad enzimática, actividad volumétrica de los sobrenadantes y porcentaje de inmovilización de cada una de las condiciones.	32
Tabla 3 Resultados de la actividad enzimática con respecto a los ciclos de reutilización.....	38
Tabla 4. Porcentaje de actividad relativa de cada ciclo de reutilización.....	39

Resumen

Título: Inmovilización de la enzima peroxidasa de Rábano picante sobre óxido de grafeno. *

Autor: Angie Nathalia Larrotta Garcés. **

Palabras clave: inmovilización, actividad enzimática, peroxidasa de rábano picante, óxido de grafeno.

Descripción:

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis del óxido de grafeno (OG) para su posterior uso como soporte sólido para la inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) mediante la formación de enlaces tipo covalente. El OG fue obtenido a partir del grafito mediante oxidación química, dando como resultado un material con abundantes grupos funcionales que favorecen su modificación y uso como soporte. La inmovilización de la HRP se realizó mediante la activación de los grupos carboxilo del OG utilizando el sistema EDC/NHS, permitiendo la formación de enlaces covalentes con los grupos amino (-NH₂) de la enzima. Se realizaron diferentes relaciones OG-HRP y tiempos de acoplamiento, gracias a esto se evidenció que la condición 10:1 con 4 horas de acoplamiento fue la que presentó mayor porcentaje de inmovilización. La actividad enzimática fue determinada por medio de la oxidación del guayacol, analizando la cantidad de enzima en los sobrenadantes y el sistema, se observó que la enzima conserva su actividad catalítica después de inmovilizada. Finalmente, se evaluó la estabilidad del sistema mediante 4 ciclos de reutilización con 5 días de diferencia, observándose una disminución controlada de la actividad enzimática asociada al número de ciclos y no al tiempo. Sin embargo, el sistema mantuvo el 85.4% de su actividad inicial después de 4 ciclos, demostrando su potencial como catalizador biológico.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Herminul de Jesús Cano. Doctor en Química. Co-director: Enrique Mejía Ospino. Doctor en Química.

Abstract

Title: Immobilization of the enzyme horseradish peroxidase on graphene oxide. *

Autor: Angie Nathalia Larrotta Garcés. **

Key words: Graphene oxide, horseradish peroxidase, immobilization, enzymatic activity.

Description:

In this work, graphene oxide (GO) was synthesized for its subsequent use as a solid support for the immobilization of the enzyme horseradish peroxidase (HRP) through the formation of covalent bonds. GO was obtained from graphite via chemical oxidation, resulting in a material with abundant functional groups that favor its modification and use as a support. The immobilization of HRP was carried out through the activation of carboxyl groups on GO using the EDC/NHS system, enabling the formation of covalent bonds with the amino groups (-NH₂) of the enzyme. Different GO:HRP ratios and coupling times were evaluated, demonstrating that the 10:1 ratio with 4 hours of coupling presented the highest immobilization efficiency. Enzymatic activity was determined through guaiacol oxidation, analyzing both the supernatants and the immobilized system, showing that the enzyme retains its catalytic activity after immobilization. Finally, the stability of the system was evaluated through four reuse cycles conducted over a five-day period, showing a controlled decrease in enzymatic activity associated with the number of cycles rather than time. However, the system retained 85.4% of its initial activity after four cycles, demonstrating its potential as a reusable biocatalyst.

*Degree project

**Faculty of Sciences. School of Chemistry. Advisor: Hermínsul de Jesús Cano, Ph.D. in Chemistry Co-advisor: Enrique Mejía Ospino, Ph.D. in Chemistry.

Introducción

A lo largo de los años, el uso de enzimas como biocatalizadores ha tomado gran importancia en procesos químicos, biotecnológicos, ambientales e industriales. Esto se debe a su capacidad de acelerar reacciones químicas de manera específica y eficiente bajo condiciones controladas. Su acción catalítica se basa en la unión de la enzima a un sustrato, seguido de la catálisis de la reacción y, por último, formar un producto sin ser consumidas en el proceso. Además, las enzimas pueden ser usadas en medios acuosos y a temperaturas moderadas, en comparación con muchos catalizadores químicos tradicionales. Sin embargo, el uso de enzimas en su forma libre presenta limitaciones, como su sensibilidad a cambios drásticos en temperatura y pH, dificultando su recuperación y reutilización, además de favorecer procesos de desnaturalización y pérdida de actividad. (Singh et al., 2025).

Debido a estas limitaciones, la inmovilización enzimática surge como una estrategia clave para mejorar su estabilidad y reutilización, este proceso consiste en fijar la enzima sobre un soporte sólido, facilitando la recuperación después de la reacción y aumentando la resistencia a cambios de pH, temperatura y otras condiciones del medio. Como resultado, las enzimas inmovilizadas pueden ser usadas en aplicaciones a mayor escala y por más ciclos catalíticos (Mohidem et al., 2023).

De acuerdo con lo anterior, los nanomateriales son ampliamente usados como soportes para la inmovilización enzimática, gracias a su gran área superficial que permite la unión de sus grupos funcionales por medio de enlaces fuertes y la interacción enzima-soporte.

El grafito corresponde a un material carbonoso tridimensional compuesto por múltiples capas de carbono sp^2 apiladas mediante interacciones $\pi-\pi$ y fuerzas de Van der Waals. A partir de este material puede obtenerse grafeno, definido como una monocapa bidimensional de átomos de

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

carbono organizados en una red hexagonal con alta conductividad eléctrica y gran área superficial. Cuando el grafeno es sometido a procesos de oxidación química se obtiene óxido de grafeno (OG), un derivado funcionalizado que contiene grupos oxigenados como hidroxilos, epóxidos, carbonilos y carboxilos distribuidos sobre la superficie y bordes de las láminas. Por otro lado, el óxido de grafeno reducido (rGO) se obtiene mediante la eliminación parcial de estos grupos funcionales, recuperando parcialmente la red sp^2 y aumentando la conductividad del material.

Debido a estas propiedades, el óxido de grafeno (OG) ha sido ampliamente estudiado como soporte para inmovilización enzimática, destacándose por su gran área superficial, versatilidad química y capacidad de funcionalización superficial que facilita la unión de biomoléculas (Zhou & Hartmann, 2013). Estructuralmente el óxido de grafeno presenta grupos funcionales como epóxido, hidroxilo y carboxilo distribuidos en su superficie, permitiendo una fácil funcionalización y una fuerte interacción con enzimas mediante enlaces covalentes o interacciones físicas (Dreyer et al., 2010).

En este trabajo se seleccionó OG como soporte para la inmovilización de HRP debido a la alta densidad de grupos funcionales oxigenados presentes en su superficie, especialmente grupos carboxilo, los cuales favorecen procesos de inmovilización covalente mediante activación EDC/NHS. Aunque el rGO presenta mayor conductividad eléctrica y menor resistencia a la transferencia electrónica, el OG ofrece una química superficial adecuada para la formación de enlaces con biomoléculas, siendo ampliamente utilizado en procesos de inmovilización enzimática donde la prioridad es maximizar el acoplamiento enzima-soporte.

Por otro lado, la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) es una enzima aislada de la raíz de la planta perenne Rábano Picante (*Armoracia rusticana*) mayormente. Su estructura contiene un grupo prostético hemo en su centro activo, el cual se encuentra rodeado por una cadena polipeptídica que estabiliza la conformación y regula la actividad catalítica (Gajhede

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

et al., 1997). Entre sus propiedades más destacadas se encuentran su capacidad para catalizar la oxidación de diferentes sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y facilidad de purificación bajo condiciones controladas.

Este trabajo de investigación inició con la síntesis del OG a partir del grafito mediante oxidación química, posteriormente se realizó el acoplamiento de HRP mediante activación química con EDC/NHS, permitiendo la formación de enlaces covalentes entre los grupos carboxilo del soporte y los grupos amino de la enzima. Para evaluar la eficiencia de la inmovilización, se determinó la actividad enzimática del sistema OG-HRP mediante la oxidación de guayacol. Adicionalmente se evaluó la actividad enzimática de los sobrenadantes resultantes del acoplamiento, con el fin de determinar la cantidad de HRP que no se inmovilizó en el soporte. Y para finalizar, se analizó el comportamiento catalítico de la inmovilización a lo largo de varios ciclos para evaluar su capacidad de reutilización y estabilidad.

1 Marco Conceptual

1.1 Enzimas como Catalizadores Biológicos

Las enzimas son mayoritariamente de naturaleza proteica que actúan como catalizadores biológicos capaces de acelerar reacciones específicas mediante la disminución de energía de activación, facilitando la transformación de sustratos en productos (Cornish-Bowden, 2015). Debido a su alta eficiencia catalítica y especificidad, las enzimas son cada vez más usadas en la industria farmacéutica, alimentaria, ambiental y en procesos de biocatálisis.

Una de las principales propiedades de las enzimas es su alta especificidad que cuenta con la presencia de un sitio activo en donde cada enzima reconoce y cataliza la transformación de un sustrato o un grupo de sustratos. Su selectividad y menor consumo energético es una gran ventaja frente a otros catalizadores químicos, así como la posibilidad de reacciones en medios acuosos (Sheldon & van Pelt, 2013).

Sin embargo, las enzimas libres presentan limitaciones que están directamente relacionadas con su baja estabilidad frente a cambios de temperatura, pH o presencia de inhibidores, su dificultad para reutilización y recuperación después de la reacción catalítica. Es por esto, que a lo largo de los años han surgido estrategias de mejora para el estudio de su estabilidad y reutilización (Datta et al., 2013).

1.2 Inmovilización Enzimática

La inmovilización enzimática es una estrategia muy usada que consiste en fijar las enzimas sobre soportes sólidos con el fin de mejorar su estabilidad estructural, facilitar la recuperación y permitir más ciclos catalíticos de reutilización para prolongar su vida útil.

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Este proceso contribuye a incrementar la estabilidad frente a cambios de pH, temperatura y condiciones operacionales, además de disminuir la pérdida de actividad catalítica durante su uso. La selección del método de inmovilización depende tanto de las propiedades de la enzima como de las características fisicoquímicas del soporte, pudiéndose emplear mecanismos como adsorción física, atrapamiento, entrecruzamiento o unión covalente. En los últimos años, materiales nanométricos han despertado gran interés como soportes debido a su elevada área superficial, presencia de grupos funcionales y capacidad de interacción con biomoléculas, favoreciendo sistemas biocatalíticos más estables y reutilizables (Maghraby et al., 2023).

1.2.1 *Adsorción Física*

La enzima se une a la superficie de soporte mediante interacciones débiles como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas (Jesionowski et al., 2014). Estas interacciones presentan energías menores en comparación con los enlaces covalentes; por ejemplo, las fuerzas de Van der Waals suelen encontrarse en rangos aproximados de 0.4–4 kJ/mol, mientras que las interacciones electrostáticas pueden variar entre 20–80 kJ/mol dependiendo del medio y la distancia entre cargas.

Este tipo de inmovilización puede conservar una alta actividad catalítica debido a que la estructura de la enzima se altera muy poco durante la fijación. Sin embargo, la estabilidad y reutilización del sistema pueden verse limitadas debido a la naturaleza reversible de estas interacciones, la enzima puede desprenderse del soporte bajo cambios de pH, fuerza iónica o temperatura.

1.2.2 *Enlazamiento Covalente*

Los grupos funcionales de la enzima y los grupos presentes en la superficie del soporte son unidos mediante enlaces covalentes, dando mayor estabilidad entre enzima-material y reduciendo

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

la pérdida o desnaturalización de la enzima frente a cambios de pH, temperatura o fuerza iónica. Este tipo de inmovilización suele favorecer la reutilización y estabilidad operacional del biocatalizador. Sin embargo, puede presentar pérdida de actividad catalítica debido a limitaciones en el acceso al sustrato si la unión ocurre cerca del sitio activo o modifica la orientación de la enzima sobre el soporte.

1.2.3 *Atrapamiento*

La enzima queda confinada dentro de una matriz polimérica o porosa sin una unión directa entre enzima-soporte, químicamente la enzima está dentro de la estructura del material mientras que los sustratos y productos atraviesan la matriz para que ocurra la reacción catalítica. Este método permite que la estructura de la enzima se mantenga, sin embargo, la actividad catalítica puede verse afectada por la facilidad con la que los sustratos entran al sitio activo. En algunos casos, la estructura del material o la formación de agregados puede dificultar parcialmente el transporte de moléculas hacia la enzima inmovilizada, generando limitaciones difusionales que afectan la velocidad de reacción observada.

1.2.4 *Entrecruzamiento*

Las moléculas de la enzima se unen entre sí mediante agentes químicos que reaccionan con sus grupos funcionales, no es necesario un soporte sólido ya que se unen entre ellas mismas por medio de una red tridimensional formando agregados insolubles con mayor estabilidad, sin embargo, si las condiciones no son bien controladas la estructura y actividad catalítica se ven comprometidas.

1.3 Peroxidasa de Rábano Picante

La peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés Horseradish peroxidase) pertenece a las oxidorreductasas dentro del grupo hemo (EC 1.11.1.7) que se encuentra presente

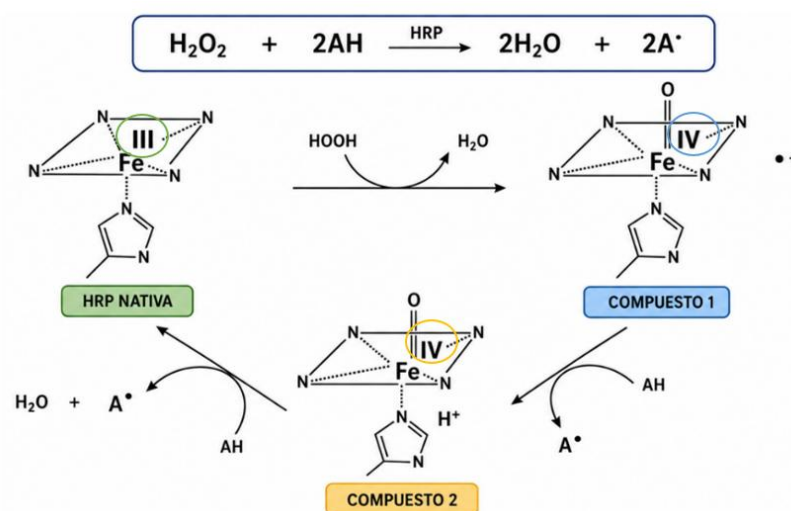
ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

en su sitio activo siendo este el responsable de la actividad catalítica y en presencia de peróxido de hidrogeno oxida compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo fenoles aromáticos, ácidos fenólicos, indoles, aminas y sulfonatos (Bej et al., 2022; Mohammadi et al., 2022).

El mecanismo catalítico de la HRP se da mediante reacciones de oxido-reducción en donde la enzima reacciona con peróxido de hidrogeno que actúa como agente oxidante. Inicialmente, la HRP en su estado nativo (Fe^{3+}) reacciona con H_2O_2 formando el **compuesto 1** un intermediario altamente oxidante caracterizado por la presencia de hierro en estado (Fe^{4+}) y un radical asociado al grupo hemo. Posteriormente, el Compuesto I oxida una molécula de sustrato donador de electrones (AH), generando un radical libre ($A\cdot$) y dando lugar al **compuesto 2**. Finalmente, el compuesto 2 oxida una segunda molécula de sustrato, formando nuevamente un radical ($A\cdot$) y permitiendo que la enzima retorne a su estado nativo (Fe^{3+}). Este ciclo catalítico permite la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y la oxidación simultánea del sustrato. El mecanismo general de reacción de la HRP se presenta en la Figura 1.

Figura 1

Reacción General de la Enzima y Mecanismo de la Reacción Catalítica de la HRP durante la reducción del peróxido de hidrógeno



Nota. Adaptada de (Azevedo et al., 2003).

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

A lo largo de los años esta enzima ha sido utilizada en aplicaciones analíticas y biotecnológicas, sin embargo, puede presentar ciertas limitaciones de forma libre, por lo que nace la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para mejorar su estabilidad y reutilización, siendo la inmovilización con soportes sólidos de las alternativas más estudiadas.

1.4 Nanomateriales Como Soporte Para Enzimas

Los nanomateriales como soportes enzimáticos son relevantes debido a su capacidad para proporcionar sitios activos para la unión de enzimas, así como, una elevada relación área superficial-volumen que hace posible una mayor interacción entre el material-enzima. Por otro lado, muchos nanomateriales presentan propiedades químicas y estructurales que permiten una modificación superficial, esto hace posible que diferentes grupos funcionales sean introducidos e interaccionen mediante enlaces covalentes o interacciones físicas (Sheldon & van Pelt, 2013).

Las nanopartículas metálicas, nanomateriales poliméricos y nanomateriales basados en carbono son de los soportes más utilizados, siendo estos últimos relevantes en aplicaciones de biocatálisis, biosensores e investigación, ya que su estructura facilita la funcionalización con enzimas sin que se afecte su estructura tridimensional. De igual manera, los nanotubos de carbono, grafeno y óxido de grafeno destacan entre los nanomateriales de carbono y son ampliamente estudiados por su estabilidad química, buena conductividad eléctrica y una gran área superficial.

Gracias a estas características, los nanomateriales son ampliamente usados como soportes para la inmovilización enzimática permitiendo desarrollar biocatalizadores que puedan ser reutilizables, más estables y eficientes.

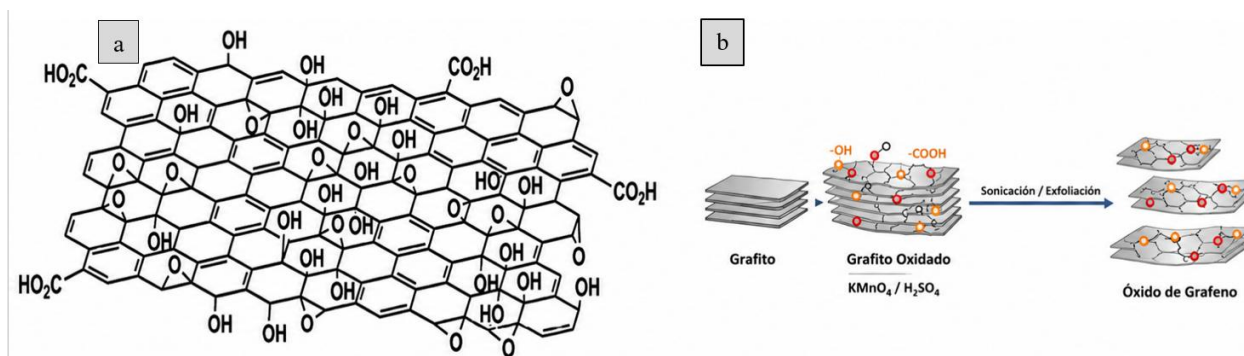
ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

1.5 Óxido de Grafeno

El óxido de grafeno (OG) es un nanomaterial que se obtiene a partir de la oxidación química del grafito en medios ácidos. Estructuralmente está compuesto por láminas de átomos de carbono organizadas en una red hexagonal, durante el proceso de oxidación se introducen grupos funcionales distribuidos en su superficie, tales como hidroxilo (-OH), époxido (-O-) y carboxilo (-COOH). La distancia entre capas de carbono se aumenta debido a estos grupos funcionales facilitando la exfoliación del material y permitiendo que se formen láminas de óxido de grafeno dispersables en agua (Mushahary et al., 2024). La estructura del oxido de grafeno y el proceso de oxidación química se muestran la figura 2 a continuación

Figura 2

Estructura del Oxido de Grafeno y el Proceso de Oxidación Química



Nota. a) Estructura del óxido de grafeno mostrando la distribución de grupos funcionales oxigenados como hidroxilos (-OH), epóxidos (C-O-C), carbonilos (C=O) y carboxilos (-COOH) sobre el plano.

b) Representación esquemática del proceso de oxidación y exfoliación del grafito para la obtención de óxido de grafeno mediante el método de Hummers modificado. La oxidación introduce grupos funcionales oxigenados entre las capas grafiticas, aumentando la separación interlamilar y facilitando la exfoliación de las láminas durante la sonicación.

Una de las principales características del óxido de grafeno es su gran área superficial, permitiendo la adsorción o inmovilización de moléculas en su superficie. Por otro lado, la gran cantidad de grupos funcionales reactivos hace que la modificación química sea posible, ya que al introducir diferentes grupos van a interactuar con biomoléculas mediante enlaces de tipo

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

covalente o interacciones electrostáticas. Es por esto, el interés de uso del OG como soporte para inmovilización de biomoléculas, como proteínas y enzimas (Singh et al., 2025).

1.6 Acoplamiento OG-HRP

El acoplamiento de HRP sobre OG es posible gracias a la formación de enlaces covalentes entre los grupos carboxilo (-COOH) del soporte y los grupos amino la enzima mediante reacciones químicas específicas que facilitan la inmovilización de la enzima en el soporte (Prabhakar et al., 2025).

La activación del OG con el sistema EDC/NHS es de gran importancia para que esta inmovilización sea eficiente. La adición del EDC permite la activación de los grupos carboxilo del OG que serán los que se unan con los grupos reactivos de la enzima, y la adición del NHS, permite la formación de esteres intermediarios más estables y reactivos, los cuales reaccionan con los grupos amino de la HRP mediante enlaces tipo amida favoreciendo el acoplamiento covalente de la enzima (Koenig et al., 2019).

El enlace amida es covalente y muy estable, esto permite que la enzima se una al óxido de grafeno reduciendo la de perdida durante su uso y mejorando la estabilidad de unión a diferentes condiciones de reacción. Se ha determinado que, este tipo de inmovilización covalente no solo mejora la estabilidad de la enzima, sino que también mantiene su actividad catalítica y gracias a la gran área superficial del OG favorece la interacción enzima-soporte (Smith et al., 2020).

Gracias a esto, el acoplamiento OG-HRP mediante la activación con EDC/NHS es útil en aplicaciones biotecnológicas y ambientales, permitiendo mantener la actividad enzimática durante varios ciclos y el sistema es más estable.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Sintetizar y evaluar óxido de grafeno como soporte sólido para la inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano picante.

2.2 Objetivos Específicos

Sintetizar óxido de grafeno a partir del grafito mediante oxidación química, para su uso como soporte sólido.

Inmovilizar la peroxidasa de rábano picante sobre el óxido de grafeno mediante activación química de los grupos carboxilo del OG mediante el sistema (EDC/NHS), optimizando las condiciones para maximizar la cantidad de enzima fijada y su actividad residual.

Evaluar la actividad, estabilidad y reutilización de la HRP inmovilizada en OG.

3 Materiales y Metodología

3.1 Reactivos

Grafito en polvo (de Merck), permanganato de potasio (KMnO_4 , de Merck), ácido fosfórico (H_3PO_4 , de J.T Baker), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , de J.T Baker), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , de Sigma Aldrich), peroxidasa de rábano picante (HRP, de Sigma Aldrich), EDC (Hidrocloruro de N-(3-Dimetil aminopropil)-N'-etilcarboimida, de Sigma Aldrich), NHS (N-hidroxisuccinimida, de Sigma Aldrich), acetato de sodio (CH_3COONa , de Sigma Aldrich), ácido acético glacial (CH_3COOH , de Sigma Aldrich), PBS (Solución salina tamponada con fosfato) pH 7, guayacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$, Sigma Aldrich). El agua ultrapura (resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega$) utilizada para todos los experimentos fue producida en un sistema MilliQ, del grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología del parque tecnológico de Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander.

3.2 Síntesis Óxido de Grafeno

La preparación del óxido de grafeno (OG) se realizó mediante la metodología implementada en el LEAM (Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular) de la Universidad Industrial de Santander (Gómez Robayo, 2012).

El óxido de grafeno (OG) fue sintetizado mediante una adaptación del método de Hummers modificado, basado en la oxidación química del grafito en polvo para obtener OG. Para iniciar, se pesó 1 g de grafito en polvo que se dispersó en 100 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y 10 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) manteniendo agitación continua a 300 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La oxidación del grafito se dio mediante la adición de 6 g de permanganato de potasio (KMnO_4) en estado sólido por cada gramo de grafito usado, el cual fue añadido lentamente durante

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

5 minutos aproximadamente bajo agitación constante, controlando la temperatura del sistema para evitar reacciones exotérmicas violentas. Una vez finalizada la adición del oxidante, la dispersión se dejó reaccionando a una temperatura de 50°C durante 24 horas, el control de temperatura durante la reacción se realizó utilizando un baño de aceite. La temperatura de la mezcla de reacción fue monitoreada mediante un termómetro sumergido directamente en el sistema, mientras que la temperatura del baño fue controlada mediante una sonda térmica externa.

Pasadas 24 horas, se adicionaron 20 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 100mL agua destilada, para posteriormente realizar 6 ciclos de lavados con agua destilada y centrifugación a 8000 rpm con tiempos entre 10 y 40 minutos, incrementando progresivamente la duración de cada ciclo. En el último lavado se midió el pH de la dispersión con un valor de 5.5, se añadió agua tipo I y se almacenó temporalmente en refrigeración.

Finalmente se sometió la dispersión a ultrasonido de sonda para favorecer la exfoliación de las láminas de grafeno oxidado, se realizaron cinco ciclos de sonicación manteniendo controlada la temperatura del sistema con un baño de hielo. Como último paso, el material fue liofilizado para eliminar el agua presente y obtener el óxido de grafeno en estado sólido para poder llevar a cabo la inmovilización de la enzima HRP.

3.3 Inmovilización Peroxidasa de Rábano Picante en Óxido de Grafeno

La inmovilización de la peroxidasa de rábano picante (HRP) sobre óxido de grafeno (OG) se realizó mediante el acoplamiento covalente por medio de la activación con EDC/NHS de los grupos carboxilo presentes en la superficie del OG, los cuales favorecen la formación de enlaces amida con los grupos amino de la HRP.

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Inicialmente se preparó una dispersión stock de óxido de grafeno a una concentración de 1 mg/mL, dispersando 20 mg de OG en 20 mL de buffer fosfato a pH 5 y se sometió a ultrasonido con el fin de obtener una dispersión homogénea, esto se realizó por 5 ciclos de 10 minutos cada uno, manteniendo la temperatura controlada entre cada ciclo. De igual forma, se preparó una solución stock de HRP a una concentración de 1 mg/mL en donde se disolvió 1 mg de enzima en 1 mL de PBS (pH 7), la cual fue almacenada a 4°C hasta que llegó el momento de usarla.

Posteriormente en la activación del óxido de grafeno, se tomaron 500 μ L de la dispersión de OG en buffer fosfato pH, se añadieron 0.5 mg de EDC y 0.3 mg de NHS respectivamente. Se mantuvo bajo agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la activación de los grupos carboxilo por medio del EDC y los esteres que reaccionaran posteriormente con los grupos amino del HRP.

Una vez finalizado este tiempo, se procedió a añadir la solución de HRP preparada previamente, empleando diferentes relaciones masa/masa y también dos tiempos de inmovilización entre el óxido de grafeno y la enzima (OG: HRP) con el fin de evaluar el efecto de la cantidad de enzima sobre el proceso de inmovilización. Las relaciones evaluadas fueron 1:1, 5:1 y 10:1, esto a 2h y 4h manteniéndose en agitación, para así permitir el acoplamiento de la enzima a los grupos carboxilo activados del óxido de grafeno mediante la formación de enlaces amida.

Con el fin de separar el material OG-HRP del sobrenadante que contiene la fracción de enzima no inmovilizada, la suspensión se sometió a centrifugación a 8700 rpm durante 10 minutos con lavados entre cada ciclo con PBS. El sobrenadante recuperado fue utilizado posteriormente para la determinación de la actividad enzimática residual, permitiendo evaluar la eficiencia del proceso de inmovilización.

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Finalmente, el material obtenido se congeló durante 3 semanas, para su posterior caracterización, evaluación de actividad enzimática y ciclos reutilización.

3.4 Evaluación de la Actividad Enzimática

La actividad enzimática de la HRP libre y OG-HRP fue medida en un espectrómetro UV-vis, donde la HRP cataliza la oxidación del guayacol en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), siendo tetraguayacol el producto, un compuesto de color ladrillo el cual fue monitoreado espectrofotométricamente a 470 nm con un coeficiente de extinción molar de $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para cada uno de los ensayos.

Para cada ensayo se utilizó una mezcla compuesta por 20 mL buffer fosfato salino 100 mM (PBS, pH 7), 40 μL de guayacol y 10 μL de peróxido de hidrógeno al 30% (H_2O_2). Inicialmente se midió la actividad enzimática de la HRP libre 1mg/mL, los sobrenadantes resultantes de la centrifugación de las condiciones reportadas 1:1 (OG: HRP), 5:1(OG: HRP) y 10:1(OG: HRP), y por último, la actividad del acoplamiento OG-HRP. En celdas del espectrofotómetro (de 2mLy 1mL) se añadió 0.066 mL y 0.033 mL respectivamente de la muestra a evaluar con el volumen respectivo de la solución previamente preparada de PBS, guayacol y H_2O_2 . La actividad enzimática se evaluó a partir de la absorbancia en función del tiempo.

3.5 Evaluación Ciclos de Reutilización del Sistema OG-HRP

Para la evaluación de la capacidad de reutilización del sistema OG-HRP, se eligió la condición 10:1 con 4 horas acoplamiento ya que esta fue la que presentó mejor porcentaje de inmovilización de la enzima en el soporte en los ensayos previos. Inicialmente se realizó una descongelación controlando la temperatura, para no perder propiedades enzimáticas y no poner en riesgo la unión, retirando la muestra de congelación y colocándola en hielo por aproximadamente 4 horas.

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Seguido, se sometió el sistema a una hidratación con 200 μ L de PBS (pH 7) por 10 minutos hasta obtener una dispersión homogénea y así proceder a la determinación de la actividad enzimática, se agregaron en la celda del espectrofotómetro los 200 μ L de la dispersión de OG-HRP y 1000 μ L de la solución de sustrato que contenía guayacol, PBS y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La actividad fue evaluada mediante el seguimiento de la absorbancia a 470 nm asociado a la formación del tetraguayacol.

Una vez finalizada la medición, el sistema OG-HRP se recuperó y se llevó a centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos, se realizó un lavado con 400 μ L de PBS para eliminar restos de sustrato en el sobrenadante y se recuperó el pellet que quedó en el tubo para los ciclos posteriores.

Cada ciclo se evaluó bajo las mismas condiciones experimentales, los mismos volúmenes y el procedimiento mencionado para la medición de la actividad enzimática. Este proceso fue repetido 4 veces para así evaluar los ciclos de reutilización por medio de las pendientes de cada ciclo catalítico.

4 Resultados y Discusión

4.1 Síntesis del OG

La síntesis del óxido de grafeno se realizó mediante el método modificado de Hummers durante 24 horas de oxidación. Posteriormente el material obtenido fue sometido a múltiples lavados con agua tipo 1 hasta alcanzar un pH ácido entre 5-5.5 con el fin de remover residuos ácidos y agentes oxidantes remanentes. La dispersión fue llevada a ultrasonido mediante sonda ultrasónica, obteniendo una dispersión homogénea de color café claro (Figura 3a), característica que comúnmente es reportada para dispersiones de óxido de grafeno exfoliado en medio acuoso. Esta coloración y estabilidad de dispersión se asocian con la presencia de grupos funcionales

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

oxigenados distribuidos sobre la superficie y bordes de las láminas del material (Suhaimi et al., 2022).

Posteriormente, el OG fue liofilizado, obteniéndose un material con apariencia esponjosa y porosa (Figura 3b). Esta morfología se atribuye al proceso de congelación y sublimación del solvente durante la liofilización, donde la formación de cristales de hielo favorece la separación parcial de las láminas y la generación de espacios vacíos dentro de la estructura. Este comportamiento ha sido reportado previamente para materiales basados en óxido de grafeno, en los cuales la liofilización contribuye a preservar estructuras más abiertas y con mayor área superficial.

Figura 3

Dispersión exfoliada de óxido de grafeno y material liofilizado obtenido.



Nota. a) dispersión acuosa de óxido de grafeno sonificado con coloración café clara característica de materiales oxidados y exfoliados.

b) óxido de grafeno liofilizado con morfología porosa y estructura esponjosa obtenida después del proceso de congelación y sublimación del solvente.

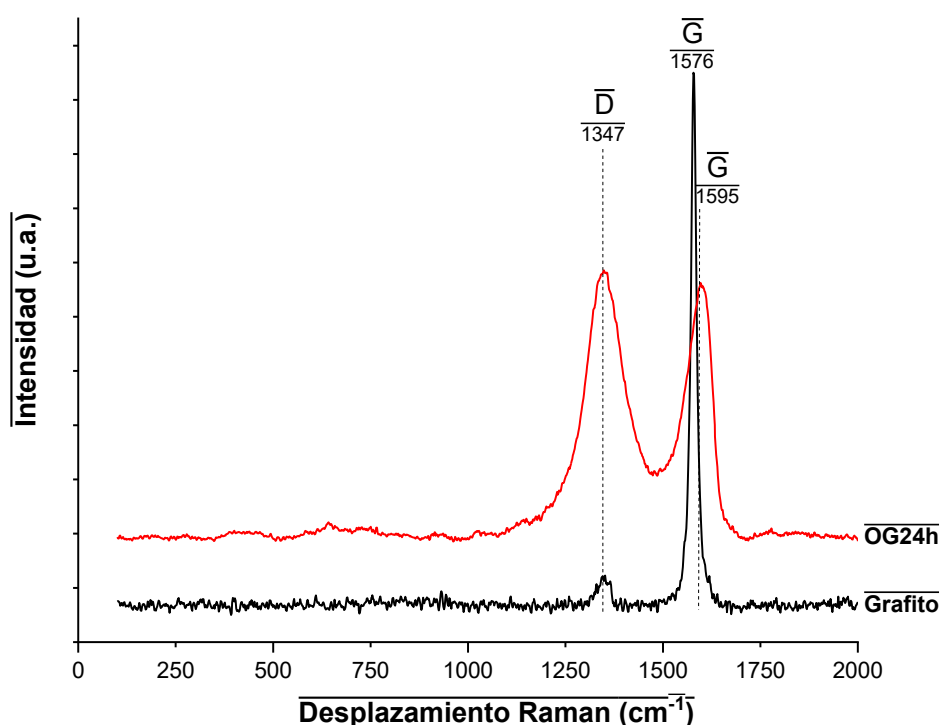
ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

4.1.1 Espectroscopia Raman

La espectroscopía Raman fue empleada para evaluar los cambios estructurales generados durante la oxidación del grafito y la formación del óxido de grafeno. En la figura 4 se presentan los espectros Raman correspondientes al grafito precursor y al óxido de grafeno ya sintetizado.

Figura 4

Espectros Raman del grafito y del óxido de grafeno sintetizado, mostrando las bandas D y G características de materiales carbonosos.



El espectro del grafito mostró principalmente la banda G alrededor de 1576 cm⁻¹, característica de las vibraciones en el plano de los átomos de carbono sp² presentes en estructuras gráficas altamente ordenadas. Después del proceso de oxidación, el espectro del óxido de grafeno presentó un incremento significativo de la banda D alrededor de 1347 cm⁻¹, asociada a defectos estructurales, distorsiones de la red cristalina y a la incorporación de grupos funcionales oxigenados sobre las láminas carbonosas.

El aumento en la intensidad y el ensanchamiento de la banda D en el OG respecto al grafito indican un incremento en el desorden estructural del material, consistente con la oxidación del grafito y la interrupción parcial de la red conjugada sp^2 . Este comportamiento ha sido ampliamente reportado para materiales tipo óxido de grafeno, donde la introducción de grupos hidroxilo, epóxido y carboxilo genera defectos y modifica la organización estructural del carbono.

Adicionalmente, la diferencia observada entre los espectros del grafito y del OG sugiere una adecuada exfoliación y oxidación de las láminas, ya que el material obtenido presenta características Raman típicas del óxido de grafeno y no únicamente de grafito oxidado parcialmente. La mayor definición de la banda D y la modificación de la relación entre las bandas D y G evidencian cambios estructurales asociados a la separación y funcionalización de las capas gráficas durante el proceso de síntesis.

Los resultados obtenidos son consistentes con reportes previos del grupo LEAM de la Universidad Industrial de Santander, donde la oxidación del grafito produjo un incremento en la banda D asociado a defectos estructurales y grupos funcionales oxigenados característicos del óxido de grafeno (Gómez et al., 2014).

4.2 Acoplamiento y Evaluación Catalítica del sistema OG-HRP

Para llevar a cabo el acoplamiento de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) sobre óxido de grafeno (OG), se establecieron condiciones experimentales teniendo en cuenta parámetros reportados en la literatura tanto de cantidades como de tiempos de acoplamiento. En este caso se mantuvo constante el volumen de la dispersión de OG/Buffer acetato de sodio (1 mg/mL) y las cantidades de EDC (10mg/mL) y NHS (10mg/mL) usados para la activación de los

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

grupos funcionales del OG, por otro lado, los volúmenes de HRP/PBS (1 mg/mL) variaban de acuerdo con cada condición. A continuación, en la tabla 1 se presentan las cantidades para cada condición.

Tabla 1.
Condiciones de inmovilización del sistema OG-HR.

Condición	Tiempo de acoplamiento (h)	OG (μl)	EDC (mg)	NHS (mg)	HRP (μl)
1:1	2	500	0.5	0.3	500
5:1	2	500	0.5	0.3	100
5:1	4	500	0.5	0.3	100
10:1	2	500	0.5	0.3	50
10:1	4	500	0.5	0.3	50

4.2.1 Actividad Enzimática

La actividad enzimática fue obtenida a partir de las pendientes obtenidas en las curvas de absorbancia en función del tiempo, la cual depende de la velocidad de formación del producto en la reacción. Para su cálculo se empleó la ecuación 1

$$\text{Actividad enzimática}(A) = \frac{(m)(V_T)}{\varepsilon * l} * FD (U) \quad (1)$$

En donde,

- **m**: pendiente de la curva de absorbancia en función del tiempo. ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$)
- **V_T**: volumen total de la mezcla en reacción (mL)
- **ε**: coeficiente de extinción molar del tetraguayacol 26.6 ($mM^{-1} * cm^{-1}$)
- **l**: longitud del recorrido de la celda (cm)
- **FD**: factor de dilución aplicado a la muestra
- **U**: unidad enzimática, definida como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 μmol de tetraguayacol por minuto bajo las condiciones experimentales evaluadas (μmol/min)

Esta ecuación se basa en la ley de Lambert-Beer estableciendo una relación directa entre la absorbancia y la concentración de un analito en solución, se produce la formación del

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

tetraguayacol mediante la oxidación del guayacol, la formación de tetraguayacol fue monitoreada espectrofotométricamente a 470 nm, longitud de onda asociada al máximo de absorción del tetraguayacol reportado en literatura. El coeficiente de extinción molar utilizado ($26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) corresponde al tetraguayacol formado durante la reacción y ha sido ampliamente empleado para la determinación de actividad peroxidasa mediante oxidación de guayacol (Gogliettino et al., 2023). De acuerdo con lo anterior, valores más altos de actividad enzimática indican una mayor velocidad de reacción, lo que se traduce en una mayor actividad catalítica de la enzima.

La actividad de la HRP libre se determinó mediante la pendiente obtenida en función del tiempo, sin embargo, previo a la medición se realizó una dilución 1:100 con el fin de ajustar su concentración a un rango adecuado y evitar sobresaturación en la lectura del espectrofotómetro. A continuación, un ejemplo de cálculo para la HRP libre

$$\text{Actividad enzimática}(A) = \frac{(0.2429)(1.033)}{(26.6)(1)} \times 100$$

$$A = 0.9434 U$$

La pendiente obtenida fue de 0.2429 ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$), este valor fue referencia para comparar las actividades de los sobrenadantes y los sistemas de OG-HRP. Este resultado sugiere que la enzima libre conserva su actividad catalítica, indicando que su estructura y sitio activo no están afectados para las mediciones.

Con el fin de evaluar la eficiencia de inmovilización, se calculó la actividad volumétrica de cada condición, la cual se expresa como la ecuación 2

$$\text{Actividad volumétrica } (A_v) = \frac{A}{V_e} \left(\frac{U}{\text{mL}} \right) \quad (2)$$

En donde,

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

- **A:** actividad enzimática calculada (U)
- **V_e:** volumen de la muestra analizada correspondiente a la enzima (mL)

$$\text{Actividad volumétrica } (A_v) = \frac{0.9434}{0.033}$$

$$A_v = 28.59 \frac{U}{mL}$$

Esto indica cuánta actividad hay en un volumen de muestra y a partir de la actividad volumétrica, se determinó la actividad total presente en los sobrenadantes, la cual fue utilizada para calcular el porcentaje de inmovilización.

4.2.1.1 Actividades de los Sobrenadantes

La actividad de los sobrenadantes resultantes del primer lavado de cada condición fue medida para poder estimar la cantidad de enzima que no se unió al soporte durante el acoplamiento, de acuerdo con esto, la actividad medida fue utilizada para hallar el porcentaje de inmovilización entre la HRP y el OG mediante la siguiente ecuación 3

$$\% \text{ inmovilización} = \frac{A_i - A_s}{A_i} \times 100 \quad (3)$$

Siendo,

$$A_i = (A_{v_{HRP}})(V_{HRP})$$

$$A_s = (A_{v_{sobrenadante}})(V_T)$$

- **A_i:** actividad enzimática inicial (U)
- **A_s:** actividad enzimática del sobrenadante (U)
- **A_{v HRP}:** actividad volumétrica de la HRP libre (U/mL)
- **A_{v sobrenadante}:** actividad volumétrica del sobrenadante (U/mL)
- **V_{HRP}:** volumen de HRP utilizado (mL)
- **V_T:** volumen total del sobrenadante recuperado (mL)

Como ejemplo de cálculo para la condición 1:1

$$A_i = (28.59)(0.5) = 14.30 U$$

$$A_s = (4.005)(1) = 4.005 U$$

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

$$\% \text{ inmovilización} = \frac{14.30 - 4.005}{14.30} * 100$$

$$\% \text{ inmovilización} = 72\%$$

En la Tabla 2 se presentan los valores de pendiente, actividad enzimática, actividad volumétrica y porcentaje de inmovilización obtenidos para cada una de las condiciones evaluadas.

Tabla 2.

Resultados de pendientes, actividad enzimática, actividad volumétrica de los sobrenadantes y porcentaje de inmovilización de cada una de las condiciones.

Condición	Dilución	Tiempo (h)	Pendiente (Δ Abs/min)	Actividad enzimática (U)	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad inicial (U)	Actividad total sobrenadante (U)	% inmovilización
HRP	1:100	-	0.2429	0.9434	28.59	-	-	-
LIBRE								
1:1	1:10	2	0.3403	0.2643	4.005	14.30	4.005	72
5:1	-	2	0.6382	0.0248	0.7515	2.859	0.4509	84.2
5:1	-	4	0.5983	0.0232	0.7030	2.859	0.4218	85.2
10:1	-	2	0.2342	0.0091	0.2745	1.429	0.1510	89.4
10:1	-	4	0.2091	0.0081	0.2461	1.429	0.1354	90.5

En la tabla 2, se observan las diferencias de las actividades enzimáticas de los sobrenadantes de cada condición, esto permite analizar la eficiencia de la inmovilización de la HRP sobre OG.

La condición 1:1 fue acoplada en un tiempo de 2 horas presentó la mayor actividad enzimática en comparación con las demás condiciones, sugiriendo que la cantidad de enzima que quedó en el sobrenadante fue significativa con respecto a la que quedó en el sistema ya

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

inmovilizado. Esto representa el menor porcentaje de inmovilización con un 72%. Este comportamiento puede atribuirse a que la cantidad de enzima fue igual a la cantidad de soporte disponible, limitando la cantidad de sitios activos accesibles sobre la superficie del óxido de grafeno y favoreciendo que parte de la HRP permaneciera libre en el medio de reacción.

Para las condiciones 5:1 a 2 y 4 horas de acoplamiento, se observa que los valores de actividad enzimática son menores, es decir, hubo mayor acoplamiento de la enzima en el soporte y sus porcentajes de inmovilización fueron 84.2% y 85.2% respectivamente, evidenciando que el porcentaje de inmovilización no aumenta de manera significativamente después de las 2 horas de acoplamiento. Sin embargo, pese a que los porcentajes fueron mayores, indica que queda una parte importante de enzima en el sobrenadante, esto puede estar relacionado con una saturación parcial de los sitios de unión disponible en el soporte. Los porcentajes de inmovilización obtenidos son comparables con valores reportados en sistemas de HRP inmovilizada sobre materiales basados en óxido de grafeno y otros nanomateriales funcionalizados, donde eficiencias de inmovilización entre 80–85% han sido asociadas a una adecuada disponibilidad de grupos funcionales y conservación de la actividad catalítica después del posible acoplamiento covalente. Resultados similares fueron reportados por Sahu et al. (2019), quienes obtuvieron eficiencias cercanas al 80% para HRP inmovilizada sobre perlas magnéticas recubiertas con óxido de grafeno.

Por otro lado, para las condiciones 10:1 a 2 y 4 horas de acoplamiento, su actividad enzimática fue mucho menor indicando una menor cantidad de enzima en el sobrenadante y mayor interacción en el sistema, por lo tanto, sus porcentajes de inmovilización fueron 89.4% y 90.5% respectivamente. Estos resultados sugieren que el incremento en la proporción de óxido de grafeno favorece la disponibilidad de grupos funcionales y sitios de unión para la enzima, promoviendo una interacción más eficiente entre la HRP y el soporte. Resultados similares han sido reportados

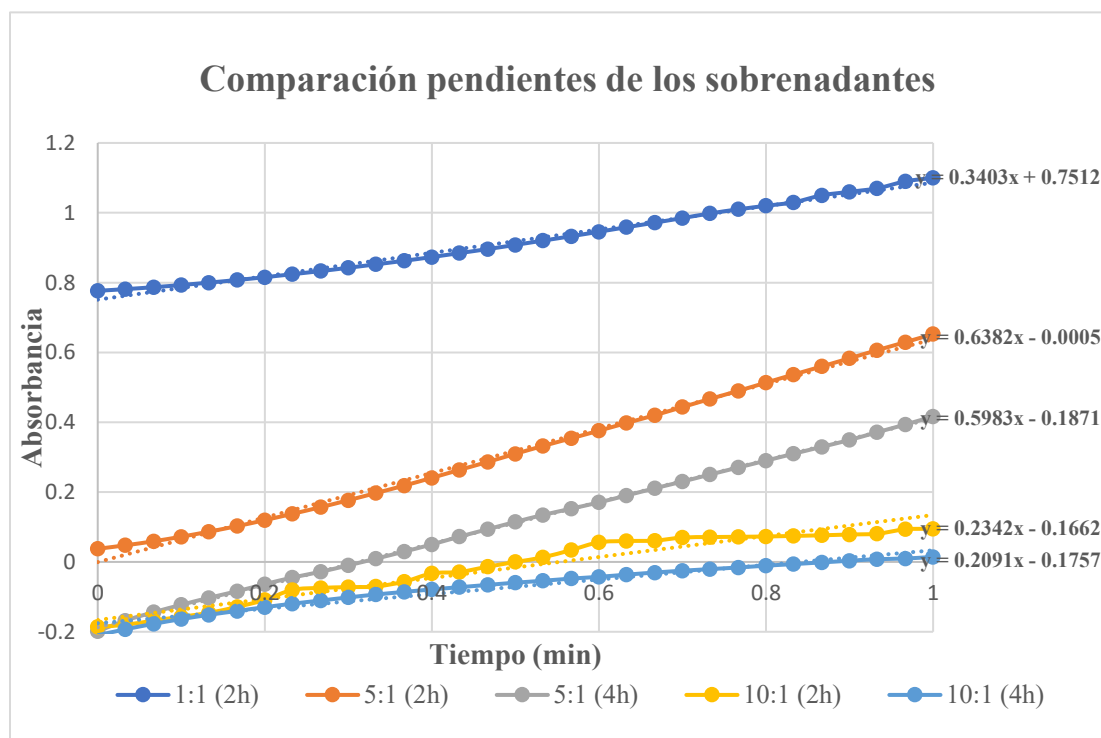
ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

en la literatura para sistemas basados en óxido de grafeno, donde eficiencias de inmovilización superiores al 85% se relacionan con la alta área superficial y la abundancia de grupos oxigenados disponibles para el acoplamiento covalente de enzimas (Sahu et al., 2019).

Para complementar el análisis anterior, la figura 5 presenta la comparación de las actividades enzimáticas teniendo en cuenta la condición de preparación y el tiempo de acoplamiento, evidenciando las diferencias del comportamiento catalítico a partir de las curvas absorbancia en función del tiempo. Se observa que la condición 10:1 con 4 horas de acoplamiento fue la mejor ya que menor actividad enzimática en el sobrenadante indica buen acoplamiento al soporte. Este comportamiento sugiere que el aumento en la proporción de óxido de grafeno favorece el anclaje de la enzima al soporte, reduciendo la cantidad de enzima libre en el sobrenadante.

Figura 5

Curvas de absorbancia en función del tiempo para los sobrenadantes de las diferentes condiciones OG-HRP



4.2.1.2 Actividad del Sistema OG-HRP

A partir de los resultados obtenidos anteriormente en el análisis de los sobrenadantes y los porcentajes de inmovilización, se seleccionó la condición de 10:1 con 4 horas de acoplamiento para la evaluación del sistema OG-HRP ya que fue el que mayor porcentaje de inmovilización presentó. Se realizó la medición de la actividad enzimática con el fin de corroborar los resultados ya obtenidos, se obtuvo una pendiente de 1.9131 ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$), lo que indica una alta velocidad de reacción y una adecuada conservación de la actividad catalítica de la HRP inmovilizada. Este comportamiento sugiere la presencia de una mayor cantidad de enzima activa y funcional sobre la superficie del soporte.

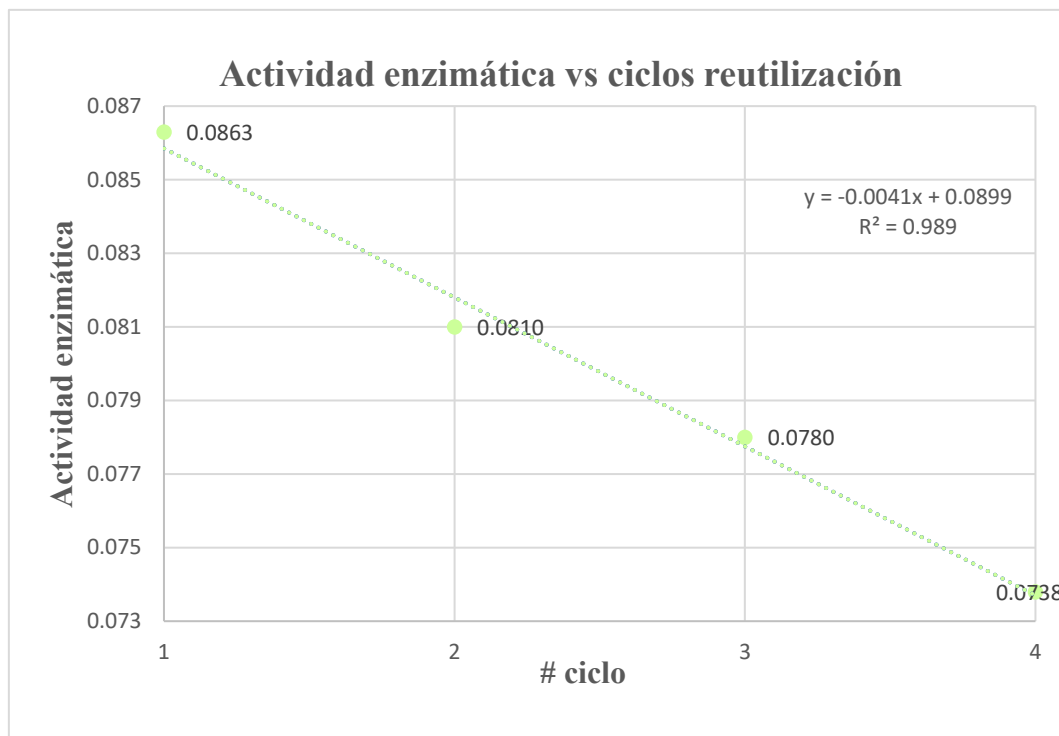
A partir de la pendiente obtenida, se calculó la actividad enzimática para el sistema, obteniéndose un valor de 0.0863 U. Este resultado evidencia una alta actividad catalítica del sistema, sugiriendo que no solo quedó anclada al sistema, sino que también conservó su actividad enzimática. La actividad obtenida fue utilizada como referencia para las pruebas posteriores de reutilización y evaluación de estabilidad catalítica del sistema OG-HRP.

4.2.2 Evaluación de los Ciclos de Reutilización

Buscando evaluar la estabilidad del sistema OG-HRP se realizaron ensayos de reutilización a la condición previamente escogida, para así analizar el comportamiento catalítico a lo largo de 4 ciclos de uso. La actividad enzimática de cada ciclo fue determinada a partir de las pendientes obtenidas de las curvas de absorbancia en función del tiempo y se tomó como referencia la primera actividad del sistema OG-HRP siendo este valor considerado como el 100% de actividad y así ver la variabilidad del sistema al pasar los ciclos. En la figura 6, se muestra la variación de la actividad enzimática en función del número de ciclos de reutilización.

Figura 6

Actividad enzimática del sistema OG-HRP en función del número de ciclos de reutilización.

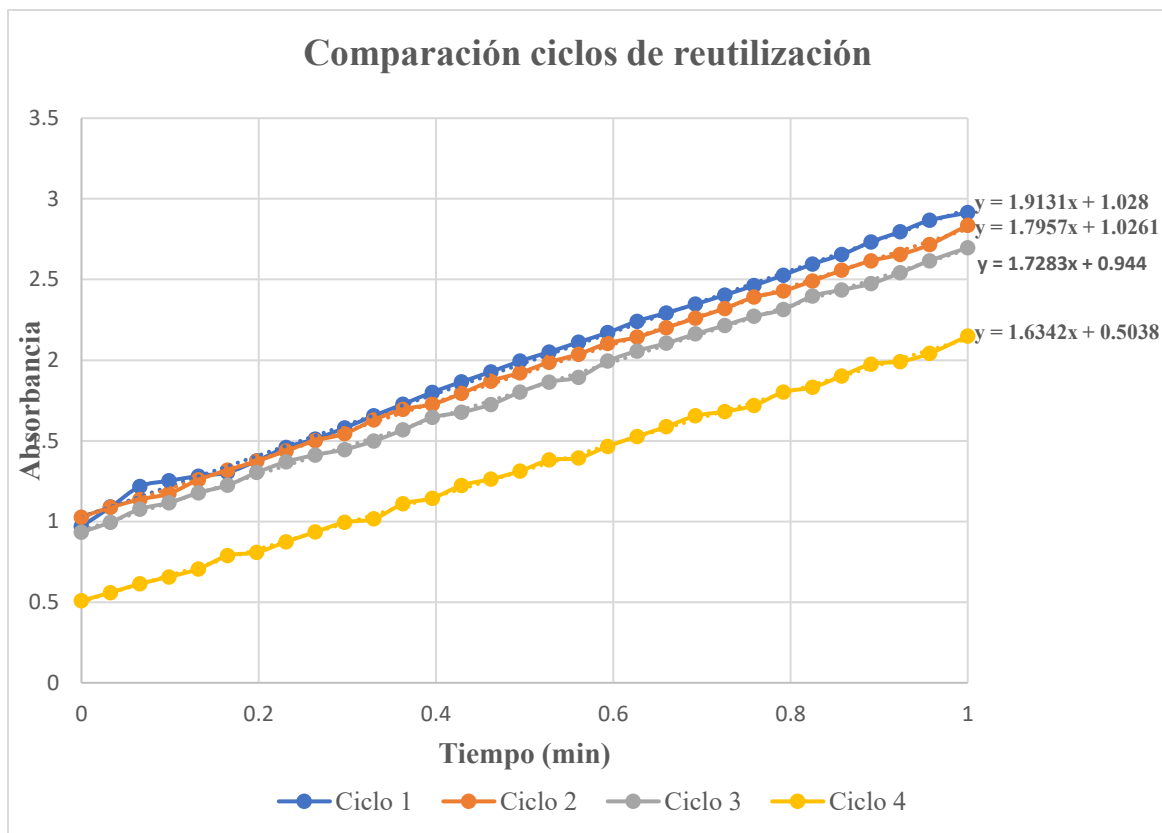


Se observa una disminución progresiva de actividad en donde inicialmente se tenía una actividad de 0.0863U y llega a 0.0738U en el último ciclo. La pérdida de actividad ocurre de manera gradual, pausada y esto puede ser comprobado por la linealidad de la ecuación presentada en la figura, por último, esto sugiere que el sistema mantiene una estabilidad estructural a lo largo de los ciclos.

La disminución de la actividad enzimática se debe a varios factores, entre los que destacan la inactivación parcial de la enzima ya que está sometida a peróxido de hidrógeno en cada ciclo y el más común, manipulación de la persona encargada y pérdida de material durante los procesos de lavados y centrifugación. La Figura 7 demuestra que la pérdida de actividad está relacionada con el número de ciclos de reutilización y no con el tiempo que tenga el sistema, ya que la actividad no varía significativamente entre la toma del ciclo 2 y 3, sin embargo, entre el ciclo 3 y 4 se presenta una mayor pérdida de actividad enzimática, estos valores se presentan a continuación

Figura 7

Curvas de absorbancia en función del tiempo para los diferentes ciclos de reutilización del sistema OG-HRP.



Por otro lado, las curvas de absorbancia en función del tiempo para cada ciclo muestran una disminución progresiva de la pendiente como en la absorbancia máxima alcanzada. Este comportamiento indica una menor velocidad de formación del tetraguayacol, por lo que la actividad catalítica del sistema también disminuye a medida que aumentan los ciclos de reutilización. La separación observada entre las curvas sugiere que, además de reducirse la velocidad de reacción, también disminuye la capacidad catalítica del sistema para oxidar el guayacol después de varios ciclos.

Con base en las pendientes obtenidas para cada ciclo de reutilización, se calcularon los valores de actividad enzimática presentados en la Tabla 3. Estos resultados permiten analizar el

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

desempeño catalítico del sistema OG-HRP y la pérdida gradual de actividad con respecto al primer ciclo.

Tabla 3.

Resultados de la actividad enzimática con respecto a los ciclos de reutilización

Ciclo	Pendiente ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$)	Actividad enzimática (U)
1	1.9131	0.0863
2	1.7957	0.0810
3	1.7283	0.0781
4	1.6342	0.0738

La medición de las curvas de absorbancia se realizó en 2 tomas, un día se tomaron ciclos 1-2 y 5 días después se midieron ciclos 3-4, esto con el fin de evidenciar si la pérdida de actividad estaba relacionada con el tiempo o con los ciclos de reutilización.

A pesar de la disminución enzimática, el sistema OG-HRP conserva una fracción significativa de su actividad catalítica después de cuatro ciclos de reutilización demostrando que la enzima inmovilizada mantiene su funcionalidad. Por otro lado, también evidencia que la inmovilización sobre óxido de grafeno favorece el anclaje de la enzima, y contribuye a mejorar su estabilidad en comparación con la enzima libre.

A partir de los valores presentados en la Tabla 3 se calculó el porcentaje de actividad relativa tomando como referencia el primer ciclo considerado como el 100% de actividad. Esto fue evaluado por medio la ecuación 4

$$\% \text{ actividad relativa} = \frac{m_n}{m_1} * 100 \quad (4)$$

- m_n : pendiente del ciclo evaluado ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$)

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

- m_1 : pendiente del primer ciclo ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$)

Como ejemplo se presenta el porcentaje de actividad relativa del ciclo 2

$$\% \text{ actividad relativa} = \frac{1.7957}{1.9131} * 100$$

$$\% \text{ actividad relativa} = 93.9$$

Y los valores de cada ciclo de reutilización son presentados a continuación en la tabla 4

Tabla 4.

Porcentaje de actividad relativa de cada ciclo de reutilización.

Ciclo	Actividad relativa (%)
1	100
2	93.9
3	90.3
4	85.4

Se observan los resultados del porcentaje de actividad relativa para cada ciclo de reutilización, se evidencia una disminución controlada al aumentar el número de ciclos. Sin embargo, el sistema conservó el 85.4% de su actividad inicial después de 4 ciclos, indicando una adecuada estabilidad catalítica del sistema OG-HRP durante las pruebas de reutilización.

Este comportamiento confirma que la inmovilización sobre el óxido de grafeno como soporte no solo favorece el acoplamiento de la enzima, sino que también contribuye a la conservación parcial de la actividad catalítica. La retención de actividad observada puede estar relacionada con la formación de enlaces estables entre la enzima y el soporte, además de la interacción entre los grupos funcionales del OG y la HRP. Estos resultados son consistentes con reportes recientes de inmovilización enzimática sobre materiales basados en óxido de grafeno, donde se ha observado que la interacción entre los grupos funcionales del soporte y la enzima favorece la conservación de la actividad catalítica durante ciclos sucesivos de reutilización.

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Estudios recientes reportan retenciones de actividad superiores al 75% después de múltiples ciclos, atribuidas a la estabilidad de los enlaces formados entre la enzima y el soporte nanométrico (Singh et al., 2024). De igual manera, este comportamiento coincide con lo reportado en estudios recientes de inmovilización enzimática sobre materiales basados en óxido de grafeno, donde ensayos de reutilización entre 3 y 10 ciclos son frecuentemente empleados para analizar la estabilidad catalítica del sistema. En general, la conservación de una alta actividad después de varios ciclos se relaciona con una adecuada interacción entre la enzima y el soporte nanométrico (Sosa et al., 2024)

Conclusiones

Se sintetizó el óxido de grafeno a partir de grafito mediante oxidación química, obteniendo un material con características compatibles con estructuras de OG. La coloración café claro observada en dispersión, junto con el comportamiento del material después de la sonicación y liofilización permitieron una adecuada dispersión y formación de una morfología porosa favorable para aplicaciones de inmovilización enzimática. La caracterización por espectroscopía Raman mostró la aparición de las bandas D y G en aproximadamente 1347 y 1595 cm^{-1} , respectivamente. El incremento y ensanchamiento de la banda D respecto al grafito indicó un aumento en el desorden estructural asociado a la incorporación de grupos oxigenados y defectos en la red grafitica, comportamiento característico de materiales tipo óxido de grafeno reportado previamente en literatura (Gómez et al., 2014). Además, las diferencias observadas entre los espectros de grafito y OG sugieren una modificación estructural consistente con procesos de oxidación y exfoliación de las láminas.

La inmovilización de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) mediante el sistema (EDC/NHS) permitió obtener un biocatalizador con alta eficiencia de inmovilización. Los resultados sugieren una posible formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales del soporte (-COOH) y los grupos amino de la enzima (-NH₂). Se observó que el aumento del tiempo de acoplamiento de 2 a 4 horas no produjo incrementos significativos en el porcentaje de inmovilización para las relaciones evaluadas. Sin embargo, la condición 10:1 con 4 horas presentó el mayor porcentaje de inmovilización (90.5%), acompañado de una menor actividad enzimática en el sobrenadante, lo que sugiere una mayor cantidad de enzima asociada al soporte. Estos resultados son consistentes con reportes previos de HRP inmovilizada sobre materiales basados en óxido de grafeno, donde altas eficiencias de inmovilización se relacionan con la elevada área

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

superficial y la disponibilidad de grupos funcionales oxigenados en el soporte (Sahu et al., 2019; Maghraby et al., 2023).

El sistema OG-HRP evaluado fue el escogido mediante el análisis de los sobrenadantes, los resultados sugieren que conservó una alta actividad catalítica, esto indica que durante la inmovilización y almacenamiento del sistema no se observó una pérdida significativa de actividad. La pendiente obtenida fue de 1.9131 (Δ Abs/min), siendo un valor elevado que demuestra que la enzima ya inmovilizada mantiene actividad y lleva a cabo la oxidación del guayacol de manera eficiente al reaccionar con peróxido de hidrógeno, sin embargo, la enzima no se consume en la reacción y puede volver a su estado inicial tras lavados.

El sistema OG-HRP presentó una disminución gradual de la actividad enzimática a lo largo de los ciclos de reutilización evaluados, pasando de 0.0863 U en el primer ciclo a 0.0738 U en el cuarto ciclo. A pesar de esta disminución, el sistema conservó el 85.4% de su actividad relativa después de cuatro ciclos, indicando una adecuada estabilidad operacional del biocatalizador.

La pérdida progresiva de actividad observada puede estar asociada a fenómenos de inactivación parcial de la enzima, limitaciones difusionales o pérdidas de material durante las etapas de lavado y recuperación. Sin embargo, la conservación de una alta fracción de actividad catalítica sugiere que la inmovilización sobre óxido de grafeno favoreció la estabilidad del sistema y permitió mantener la funcionalidad de la HRP durante reutilizaciones sucesivas. Estos resultados son comparables con reportes previos de HRP inmovilizada sobre materiales carbonosos, donde se han observado retenciones de actividad superiores al 75% después de múltiples ciclos catalíticos (Sahu et al., 2019).

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Se evidenció que la disminución de la actividad enzimática estuvo asociada principalmente al número de ciclos de reutilización y no al tiempo transcurrido entre las mediciones. Aunque las curvas de absorbancia fueron obtenidas en dos momentos diferentes, los resultados mostraron una tendencia progresiva de disminución relacionada con el uso continuo del sistema. Este comportamiento sugiere que la pérdida de actividad catalítica está más asociada a fenómenos propios de la reutilización, como inactivación parcial de la enzima o pérdida de material durante los lavados, que al almacenamiento del sistema entre mediciones.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que el óxido de grafeno actuó eficientemente como soporte para la inmovilización de la peroxidasa de rábano picante, permitiendo obtener un sistema catalíticamente activo, estable y reutilizable. La conservación de una alta fracción de actividad después de varios ciclos sugiere que el OG favoreció la estabilidad operacional de la HRP y mantuvo una adecuada interacción enzima-soporte. Estos resultados posicionan al sistema OG-HRP como una alternativa prometedora para el desarrollo de biocatalizadores soportados con potencial aplicación en procesos catalíticos y ambientales, comportamiento consistente con reportes previos de enzimas inmovilizadas sobre materiales basados en grafeno, donde se ha observado una mejora en estabilidad y reutilización frente a enzimas libres (Ashkan et al., 2021; Maghraby et al., 2023).

Recomendaciones

Se recomienda evaluar el efecto de otras variables experimentales sobre la inmovilización de la HRP, tales como pH y temperatura del medio de reacción, concentración de EDC/NHS, tiempos menores de acoplamiento.

Realizar la caracterización del sistema OG-HRP mediante técnicas espectroscópicas y microscópicas como FTIR, SEM, TEM o XPS, que permitan confirmar con mayor detalle las interacciones entre la enzima y el óxido de grafeno, así como los posibles cambios estructurales generados después del proceso de inmovilización.

Finalmente, se recomienda estudiar la inmovilización de otras enzimas sobre óxido de grafeno, con el fin de comparar el desempeño del material como soporte catalítico y establecer su aplicabilidad en distintos sistemas biocatalíticos.

Referencias Bibliográficas

- Ashkan, Z., Hemmateenejad, B., & Veisi, H. (2021). *Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.127>
- Azevedo, A. M., Cabral, J. M. S., & Fonseca, L. P. (2003). Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 9, 199–247. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(03\)09003-3](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(03)09003-3)
- Balcão, V. M., & Vila, M. M. D. C. (2015). Structural and functional stabilization of enzymes: State-of-the-art. *Advances in Drug Delivery Reviews*, 93, 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.008>
- Bej, S., Ghosh, M., Das, R., & Banerjee, P. (2022). Evaluation of nanomaterials-grafted enzymes for application in contaminants degradation. *Journal of the Indian Chemical Society*, 99(5), 100429. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100429>
- Bilal, M., Rasheed, T., Nabeel, F., Iqbal, H. M. N., & Zhao, Y. (2024). Support materials of organic and inorganic origin as platforms for horseradish peroxidase immobilization. *Molecules*, 29(3), 710. <https://doi.org/10.3390/molecules29030710>
- Bolibok, P. (2017). *Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide*. *The Science of Nature*, 104(5–6), 36. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1459-3>

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764–775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)

Cornish-Bowden, A. (2015). *Fundamentals of enzyme kinetics* (4th ed.). Wiley-Blackwell.

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., & Ruoff, R. S. (2010). The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 228–240. <https://doi.org/10.1039/B917103G>

Dwevedi, A. (2022). Enzyme immobilization: Advances in industry, agriculture, medicine, and the environment. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-7198-0>

Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 4(12), 1032–1038. <https://doi.org/10.1038/nsb1297-1032>

Gómez, I., Mejía, E., & Cabanzo, R. (2014). Caracterización espectroscópica de grafito, óxido de grafeno y grafeno químicamente reducido. *Revista Colombiana de Materiales*, (5), 177–184. <https://doi.org/10.17533/udea.rcm.19449>

Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate techniques* (3rd ed.). Academic Press.

Hummers, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>

Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5–6), 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

- Li, X., Feng, Q., Chen, G., & Guo, Z. (2017). Immobilization of horseradish peroxidase on graphene oxide for removal of phenolic pollutants. *Chemical Engineering Journal*, 316, 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.018>
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. (2023). *Enzyme immobilization technologies and industrial applications*. *ACS Omega*, 8(6), 5181–5205. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mejía Ospino, E., Cabanzo, R., & Contreras Ortiz, S. N. (2019). *Crude oil/water emulsion separation using graphene oxide and amine-modified graphene oxide particles*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 566, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.051>
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Mohidem, N. A., Mohamad, M., Rashid, M. U., Norizan, M. N., Hamzah, F., & Mat, H. B. (2023). Recent advances in enzyme immobilization strategies: An overview of techniques and composite carriers. *Journal of Composites Science*, 7(12), 488. <https://doi.org/10.3390/jcs7120488>

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

Pérez-Rodríguez, E. M., Gutierrez-Niño, N., Santos-Santos, N., et al., & Mejía-Ospino, E. (2024).

Synthesis and characterization of magnetic graphene oxide: Nanomaterial to reduce heavy oil viscosity. Results in Engineering, 21, 101878.

<https://doi.org/10.1016/j.rineng.2024.101878>

Prabhakar, N., Kumar, A., Singh, R., & Sharma, P. (2025). Recent advances in enzyme

immobilization on nanomaterials for environmental applications. Chemical Engineering

Journal, 497, 149657. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.149657>

Sahu, S., Shera, S. S., & Banik, R. M. (2019). Enhanced reusability of horseradish peroxidase

immobilized onto graphene oxide/magnetic chitosan beads for cost effective cholesterol

oxidase assay. The Open Biotechnology Journal, 13, 93–104.

<https://doi.org/10.2174/1874070701913010093>

Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and

how. Chemical Society Reviews, 42(15), 6223–6235.

<https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>

Singh, R., Singh, S., & Singh, P. (2020). Immobilization of horseradish peroxidase on graphene

oxide: Effect on activity and stability. International Journal of Biological Macromolecules,

165, 2782–2790. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.080>

Singh, R., Kumar, A., Sharma, P., & Verma, N. (2024). Recent advances in graphene oxide-based

materials for enzyme immobilization and biocatalytic applications. Molecules, 29(3), 710.

<https://doi.org/10.3390/molecules29030710>

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

- Singh, R. V., Kumar, A., Sharma, P., & Verma, N. (2025). Enzyme immobilization on nanomaterials and their applications. *Catalysts*, 15(6), 571. <https://doi.org/10.3390/catal15060571>
- Suhaimin, N. S., Hanifah, S. A., & colaboradores. (2022). *The evolution of oxygen-functional groups of graphene oxide as a function of oxidation degree*. *Materials Chemistry and Physics*, 288, 125629. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.125629>
- Tavakoli, F., Badiei, A., Ziarani, G. M., & Tarighi, S. (2017). A comparative study of immobilization of horseradish peroxidase on carbon nanospheres vs. graphene oxide. *International Journal of Environmental Research*, 11(2), 217–224. <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0067-4>
- Tran, D. N., Balkus Jr., K. J., (2020). Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catalysis*, 10(3), 1839–1854. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b04305>
- Verma, M. L., Naebe, M., Barrow, C. J., & Puri, M. (2020). Enzyme immobilisation on functional nanomaterials for applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102046. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102046>
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Wang, H., Wang, Y., & Wang, X. (2018). Enzyme immobilization on graphene oxide for biocatalysis: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.005>

ÓXIDO DE GRAFENO COMO SOPORTE PARA HRP

- Xu, S.-N., & Chen, Y. (2016). HRP immobilization on activated carbon/polyvinyl formal composite materials. *Materials Science Forum*, 847, 256–264. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.847.256>
- Zhang, C., Chen, S., Alvarez, P. J. J., & Chen, W. (2015). Reduced graphene oxide enhances HRP stability. *Carbon*, 94, 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.058>.
- Zhang, J., Yang, H., Shen, G., Cheng, P., Zhang, J., & Guo, S. (2010). Reduction of graphene oxide via L-ascorbic acid. *Chemical Communications*, 46(7), 1112–1114. <https://doi.org/10.1039/B917705A>
- Zhang, J., Zhang, F., Yang, H., Huang, X., Liu, H., Zhang, J., & Guo, S. (2010). *Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization*. *Langmuir*, 26(9), 6083–6085. <https://doi.org/10.1021/la904014z>
- Zhou, Y., Wang, S., Zhang, K., Jiang, H., Wang, X., & Xu, L. (2017). Immobilization of HRP on functionalized graphene oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.029>
- Zhou, Z., & Hartmann, M. (2013). Progress in enzyme immobilization in mesoporous materials. *Topics in Catalysis*, 56, 1963–1979. <https://doi.org/10.1007/s11244-013-0125-1>