

Fabricación de un biosensor electroquímico de peróxido de hidrógeno usando peroxidasa de caléndula (*Calendula officinalis*)

Valentina Rueda Acevedo

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Hermínul de Jesús Cano Calle

Químico, Ph.D

Codirector

John Jairo Castillo León

Químico, Ph.D

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

Agradecimientos

A mis papás y a mi familia por el cariño y apoyo.

A Rocky, Sacha y Nala por su compañía desde la virtualidad hasta este momento, que escribo esto con el perro durmiendo encima.

A Juanma, Silvia y Pedro por brindarme su amistad a lo largo de la carrera.

A Laura, por ser mi compañera de victorias, fracasos y risas en el 404 estos últimos meses gracias al poder de las peroxidasas.

A Anette, Tiare, Mar, Arlette y Nyah por su amistad y apoyo.

A los profesores John y Herminul por su orientación y acompañamiento durante el desarrollo del proyecto.

A Silvia y Tania por el préstamo de equipos para la ejecución del proyecto, a los compañeros y profesores del laboratorio 404 y 403 por la ayuda y compañía.

Al arte, la música, los juegos y todo aquello que me mantuvo cuerda en este proceso.

(Y a mí)

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Marco de Referencia	14
2. Marco Teórico.....	19
2.1. Enzimas.....	19
2.1.1. Oxidorreductasas.....	20
2.2. Peroxidasas	20
2.2.1. Clasificación de las peroxidasas	21
2.2.2 Ciclo catalítico de las peroxidasas	21
2.2.3. Efecto de pH en las peroxidasas	23
2.2.4. Efecto de temperatura en las peroxidasas	24
2.3. Generalidades de la caléndula.....	24
2.4. Peróxido de hidrógeno como analito	25
2.5. Biosensores	26
2.5.1. Biosensores electroquímicos.....	27
2.6. Electroodos serigrafiados de carbono	28
2.7. Voltamperometría cíclica.....	29
3. Metodología	32
3.1. Reactivos.....	32
3.2. Extracción y semipurificación de la PCO.....	32
3.2.1. Semipurificación del extracto de PCO.....	33
3.2.2. Determinación de actividad enzimática	33

3.3. Caracterización bioquímica de la PCO	33
3.3.1. Cuantificación de proteínas por método BCA	33
3.3.2. Estabilidad de peroxidasa a distinto pH.....	34
3.3.3. Estudio de estabilidad a diferentes temperaturas	34
3.4. Caracterización electroquímica de electrodos modificados con PCO	34
3.4.1. Modificación de electrodos con PCO	35
3.4.2. Caracterización por VC.....	35
3.4.3. Caracterización de electrodos con ferricianuro de potasio por VC	36
3.4.4. Evaluación del efecto de barrido en VC de electrodos	36
3.4.5. Evaluación de los electrodos modificados con H ₂ O ₂	36
4. Análisis y resultados	37
4.1. Ensayo preliminar de pH para optimización de extracción de la PCO	37
4.2. Extracción y semipurificación de la PCO	38
4.3. Caracterización bioquímica de la PCO	42
4.3.1. Estabilidad a diferentes pH	42
4.3.2. Estabilidad e inactivación térmica	43
4.4. Caracterización electroquímica de electrodos modificados con PCO	48
4.4.1. Caracterización de electrodos con ferricianuro de potasio	50
4.4.2. Evaluación de los electrodos con H ₂ O ₂	52
4.4.3. Efecto de la velocidad de barrido.....	55
5. Conclusiones	58
6. Recomendaciones	59
Referencias Bibliográficas	60

Apéndices.....	71
----------------	----

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Biosensores electroquímicos para detección de H₂O₂ basados en peroxidasas</i>	18
Tabla 2 <i>Clasificación de enzimas según su actividad catalítica</i>	19
Tabla 3 <i>Tabla de semipurificación de PCO</i>	41
Tabla 4 <i>Propiedades bioquímicas de diferentes peroxidasas vegetales</i>	45
Tabla 5 <i>Constante de inactivación térmica de diferentes peroxidasas vegetales a 55 °C</i>	47
Tabla 6 <i>Valores de corriente y potencial de los picos anódicos y catódicos de voltamperometría cíclica en PBS 100 mM pH 6</i>	49
Tabla 7 <i>Valores de corriente y potencial de picos catódicos y anódicos de voltamperograma cíclico en solución K₃[Fe(CN)₆] 10 mM 0.1 M KCl</i>	50
Tabla 8 <i>Valores de corriente y potencial de los picos anódicos y catódicos de voltamperogramas cíclicos con variación de velocidad de barrido</i>	57

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 <i>Esquema del biosensor de Clark</i>	15
Figura 2 <i>Mecanismos de respuesta de las diferentes generaciones de biosensores enzimáticos amperométricos</i>	17
Figura 3 <i>Esquema general del ciclo catalítico de las peroxidasas</i>	23
Figura 4 <i>Caléndula (Caléndula Officinalis)</i>	25
Figura 5 <i>Diagrama esquemático de un biosensor compuesto por un bioreceptor, un transductor y un amplificador.</i>	27
Figura 6 <i>Señales monitoreadas en los biosensores electroquímicos</i>	28
Figura 7 <i>Tipo de electrodos serigrafiados comerciales</i>	29
Figura 8 <i>Potencial aplicado en función del tiempo en un voltamperograma cíclico</i>	30
Figura 9 <i>Ejemplo de voltamperograma cíclico</i>	31
Figura 10 <i>Montaje experimental para la caracterización electroquímica de PCO</i>	35
Figura 11 <i>Actividad relativa del extracto de PCO a distintos pH</i>	38
Figura 12 <i>Procedimiento experimental de extracción y semipurificación de PCO</i>	39
Figura 13 <i>Reacción de oxidación de guayacol con H₂O₂</i>	40
Figura 14 <i>Actividad enzimática de PCO a distintos pH</i>	44
Figura 15 <i>Estudio de estabilidad térmica de PCO</i>	44
Figura 16 <i>Ensayo de inactivación térmica de peroxidasa de caléndula a 55 °C</i>	47
Figura 17 <i>Procedimiento de modificación de electrodos con PCO</i>	48
Figura 18 <i>Voltamperograma cíclico medido en solución buffer PBS 100 mM pH 6 medido a 100 mV/s</i>	49

Figura 19 <i>Voltamperograma cíclico en solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM 0.1 M KCl medido a 50 mV/s</i>	50
Figura 20 <i>Voltamperograma cíclico de solución H_2O_2 0.1 mM en PBS 100 mM pH medida a 100 mV/s en Au-SPCE/PCO y Au-SPCE</i>	52
Figura 21 <i>Mecanismo de la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 en electrodo modificado con PCO</i>	53
Figura 22	54
Figura 23 <i>Curva de calibración para H_2O_2 (0.1-1 mM)</i>	55
Figura 24 <i>Voltamperogramas cíclicos de electrodo modificado con PCO en H_2O_2 0.1 mM en PBS 100 mM pH 6 a diferentes velocidades de barrido (50–450 mV·s⁻¹)</i>	56
Figura 25 <i>Gráfica de Randles–Sevcik (I_p vs. $v^{1/2}$) en solución de 0.1 mM H_2O_2 en PBS 100 mM pH 6</i>	57
Figura 26 <i>Curva de calibración BCA para la determinación de concentración de proteínas</i>	71

Lista de Apéndices

pág.

Apéndice A. Curva de calibración para cuantificación de proteínas.	71
---	----

Glosario

°C: grados Celsius

E_{pa}: Potencial de pico anódico

E_{pc}: Potencial de pico catódico

I_{pa}: Corriente de pico anódico

I_{pc}: Corriente de pico catódico

μL: microlitros

HRP: peroxidasa de rábano picante

PEG: polietilenglicol

POD: peroxidasa

PCO: peroxidasa de caléndula

VC: voltamperograma cíclico

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

mA: miliamperios

mM: milimolar

μM: micromolar

mV: milivoltios

mL: mililitros

rpm: revoluciones por minuto

ε: coeficiente de absortividad molar

R²: coeficiente de correlación

Resumen

Título: Fabricación de un biosensor electroquímico de peróxido de hidrógeno usando peroxidasa de caléndula (*Calendula officinalis*)*

Autor: Valentina Rueda Acevedo**

Palabras Clave: peroxidasa, caléndula, biosensores

Las enzimas constituyen los bioreceptores más utilizados en el desarrollo de biosensores amperométricos, debido a su alta selectividad hacia sustratos y elevados números de recambio, lo que permite generar sistemas de detección sensibles y selectivos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar las características bioquímicas y electroquímicas de la peroxidasa de caléndula (PCO) como potencial bioreceptor.

La PCO fue extraída y semipurificada mediante maceración e incubación en buffer PBS 100 mM pH 6, seguida de centrifugación y separación en sistema de dos fases acuosas ((NH₄)₂SO₄ 10% / PEG 14%). Posteriormente, se evaluó su estabilidad térmica, inactivación térmica y estabilidad a diferentes valores de pH. Con el extracto semipurificado se modificaron electrodos serigrafados con nanopartículas de oro (Au-SPCE) para su caracterización electroquímica mediante voltamperometría cíclica en sistemas de ferricianuro de potasio [K₃Fe(CN)₆], peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a diferentes velocidades de barrido y a distintas concentraciones.

Los resultados mostraron que, con la semipurificación de la PCO, se alcanzó una actividad específica de 0.209 U/mg. La enzima presentó un pH óptimo de 6 y estabilidad en el rango de pH 5–7. En cuanto a la temperatura, mantuvo más del 70% de su actividad entre 40–65 °C, con un óptimo de 55 °C y una constante de inactivación de 0.00766 min⁻¹. En la caracterización electroquímica, la modificación con PCO disminuyó la separación de potencial entre picos, favoreciendo la reversibilidad del sistema, mientras que el aumento de la velocidad de barrido reforzó este comportamiento. Adicionalmente, se observó la reducción del H₂O₂ a un potencial de -0.55 V y una relación lineal entre su concentración y la corriente, permitiendo su cuantificación en el rango de 0.1–1 mM. Se demuestra que la PCO presenta propiedades bioquímicas y electroquímicas adecuadas para su aplicación en la detección de H₂O₂ en biosensores electroquímicos.

* Trabajo de Grado

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

Abstract

Title: Fabrication of an Electrochemical Hydrogen Peroxide Biosensor Using Peroxidase from calendula (*Calendula officinalis*)*

Author(s): Valentina Rueda Acevedo**

Key Words: Peroxidase, Calendula, Biosensors

Enzymes are the most commonly used bioreceptors in the development of amperometric biosensors, due to their high selectivity toward substrates and high turnover rates, which enable the creation of sensitive and selective detection systems. The objective of this study was to evaluate the biochemical and electrochemical characteristics of calendula peroxidase (PCO) as a potential bioreceptor.

PCO was extracted and semi-purified by maceration and incubation in 100 mM PBS buffer at pH 6, followed by centrifugation and separation in a two-phase aqueous system ((NH₄)₂SO₄ 10% / PEG 14%). Subsequently, its thermal stability, thermal inactivation, and stability at different pH values were evaluated. The semi-purified extract was used to modify screen-printed electrodes with gold nanoparticles (Au-SPCE) for electrochemical characterization via cyclic voltammetry in potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] and hydrogen peroxide (H₂O₂) systems at different scan rates and concentrations.

The results showed that, with the semipurification of PCO, a specific activity of 0.209 U/mg was achieved. The enzyme exhibited an optimal pH of 6 and stability in the pH range of 5–7. Regarding temperature, it retained more than 70% of its activity between 40–65 °C, with an optimum of 55 °C and an inactivation constant of 0.00766 min⁻¹. In the electrochemical characterization, modification with PCO reduced the potential gap between peaks, promoting the reversibility of the system, while increasing the scan rate further enhanced this behavior. Additionally, the reduction of H₂O₂ was observed at a potential of -0.55 V, and a linear relationship was observed between its concentration and the current, allowing for its quantification in the range of 0.1–1 mM. It is demonstrated that PCO exhibits biochemical and electrochemical properties suitable for its application in the detection of H₂O₂ in electrochemical biosensors.

* Bachelor Thesis

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Hermisul de Jesús Cano Calle. Codirector: John Jairo Castillo León

Introducción

La necesidad de métodos de detección rápidos y precisos ha impulsado el desarrollo de biosensores innovadores. Los biosensores son instrumentos analíticos basados en el uso de componentes biológicos como las enzimas, anticuerpos y ácidos nucleicos para la detección de analitos por medio de una respuesta biológica, la cual se traduce en información cuantificable por medio de un transductor [1]. Tienen un amplio campo de aplicaciones en la detección de analitos industriales, médicos, medioambientales y cuentan con ventajas como su facilidad de uso, especificidad, miniaturización y portabilidad [2].

Las peroxidasas (POD) son enzimas del tipo oxidorreductasas, las cuales catalizan la oxidación de sustratos donadores de electrones usando peróxido de hidrogeno como agente oxidante [3]. Los biosensores enzimáticos pueden trabajar de dos formas: Con transferencia directa de electrones (DET) o transferencia mediada de electrones (MET); si la peroxidasa se inmoviliza sobre el electrodo y este cumple con el papel de sustrato donador de electrones se lleva a cabo DET. En cambio, si se añade un compuesto el cual acepte y done electrones sin dificultad este actuará como un mediador, facilitando la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo, dándose la transferencia por MET [4]. La peroxidasa más utilizada en el diseño de biosensores es la de rábano picante (*Armoracia rusticana*) (HRP) debido a que ha sido la más estudiada, pero tiene varias desventajas al ser implementada en biosensores, ya que no cuenta con alta termoestabilidad y tiene su centro activo localizado en la profundidad de su bolsillo hidrofóbico, lo que causa que la distancia para la transferencia de electrones sea muy larga, por estas razones se busca una peroxidasa vegetal que cuente con mejores características bioelectroquímicas que la HRP, para este trabajo fue propuesta la peroxidasa de caléndula (*Calendula officinalis*) (PCO), la cual en estudios anteriores demostró tener actividad enzimática prometedora [5].

1. Marco de Referencia

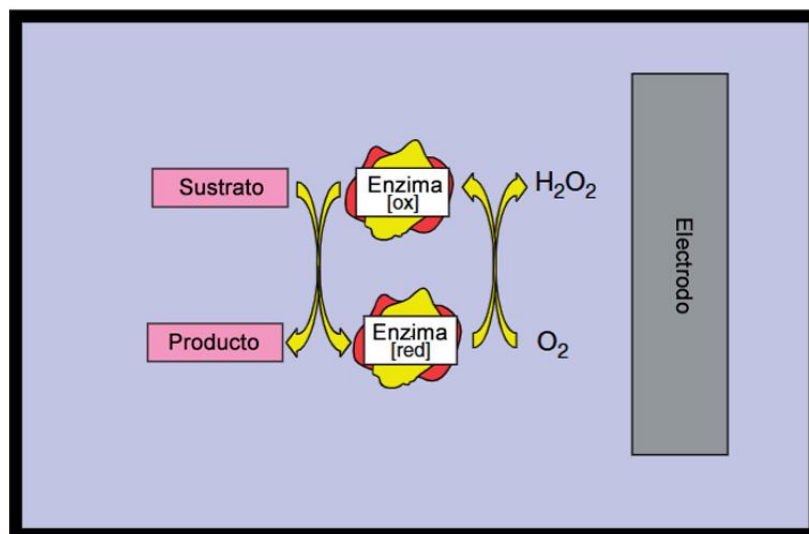
El descubrimiento del citocromo c peroxidasa y su caracterización cristalográfica en 1980 constituyeron un hito en el desarrollo de la cristalografía de enzimas. Durante más de una década, esta estructura constituyó la referencia fundamental para el estudio de las propiedades de las peroxidases, hasta que a partir de 1993 se obtuvieron nuevas estructuras como las de la peroxidasa de lignina, ascorbato peroxidasa de guisante y manganeso peroxidasa. Al comparar estas estructuras, se observó que, a pesar del bajo nivel de homología en su secuencia, el plegamiento y la organización general de la estructura secundaria se mantenían [6].

Las peroxidases tienen gran importancia en el ámbito industrial debido a su capacidad de catalizar reacciones redox de un amplio rango de sustratos fenólicos y no fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno; por esta razón tienen aplicaciones en los campos agrícola, ambiental, analítico y médico, entre otros [7]. Una de las aplicaciones más destacadas es el desarrollo de métodos para la determinación y cuantificación de peróxido de hidrógeno.

El precursor del biosensor enzimático fue diseñado por Leland Clark en 1956, cuyo propósito era medir la oxigenación de sangre mediante la reducción del oxígeno en la superficie de un electrodo de platino. En 1962, con el objetivo de ampliar el rango de analitos detectables en el cuerpo humano, Clark modificó este dispositivo al incorporar enzimas, inmovilizando glucosa oxidasa (GOx) al electrodo por medio de una membrana de diálisis. Tras esta modificación la disminución de oxígeno registrada era proporcional a la concentración de glucosa, esta relación también podía establecerse con la oxidación del peróxido de hidrógeno resultante de la reacción enzimática (Fig. 1) [8].

Figura 1

Esquema del biosensor de Clark



Nota. Adaptado de [8]

A finales de la década de 1970 se produjo un auge en el desarrollo de biosensores, impulsado por la exploración de diversas combinaciones de biorreceptores. Inicialmente se emplearon enzimas, y posteriormente se incorporaron otros elementos biológicos como anticuerpos, ácidos nucleicos y células intactas, junto con distintos tipos de transductores electroquímicos, ópticos, termométricos, magnéticos y micromecánicos, entre otros.

Durante la década de 1980, la investigación se centró en los electrodos enzimáticos amperométricos, con el objetivo de superar uno de los principales problemas del biosensor propuesto por Clark: la inmovilización eficiente de la enzima para minimizar interferencias. Se observó que la modificación del material del electrodo permitía reducir el voltaje requerido y, en consecuencia, el potencial de oxidación del sustrato. Una de las limitantes de este es que la falta de selectividad podía provocar también la disminución del potencial de oxidación de especies interferentes. La solución a este problema fueron las membranas poliméricas aplicadas en la superficie del electrodo, material que tenía bajo costo y resultaba fácil de producir en masa [8].

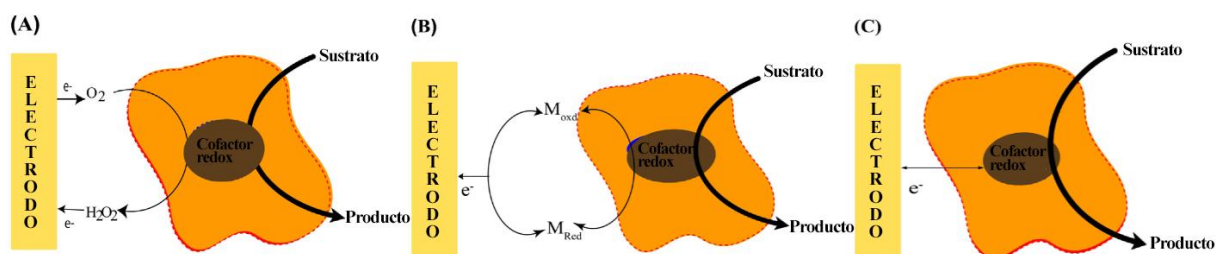
Los biosensores enzimáticos se dividen por generaciones (Fig. 2). La primera generación comprende aquellos que siguen el mismo principio del electrodo de Clark, en donde se determinaba la cantidad de analito o de producto formado en la reacción enzimática por medio de la medición de la especie que, por difusión, alcanzaba la superficie del transductor. En estos se usa por lo general oxígeno como donador de electrones, generando corriente eléctrica. Uno de sus principales problemas era la necesidad de tener un potencial redox alto, lo que afectaba la selectividad del biosensor.

En la segunda generación de biosensores enzimáticos se introdujo el uso de mediadores de electrones con el fin de sustituir al oxígeno como transportador de electrones desde el centro redox de la enzima hacia la superficie del electrodo. Esta estrategia permitió reducir la sensibilidad a interferencias causadas por otros compuestos redox en comparación con su antecesor. Sin embargo, presentaron problemas de filtración de mediador del biosensor, haciéndolos menos estables y reproducibles que los de primera generación [9].

La tercera generación de biosensores se basa en la transferencia directa de electrones entre el centro redox de la enzima y la superficie del electrodo para generar una señal. Estos biosensores son caracterizados por tener alta sensibilidad y selectividad ya que funcionan en potenciales redox cercanos a los de la enzima, y la transferencia se da sin ninguna barrera de difusión debido a la corta distancia entre ambos [10].

Figura 2

Mecanismos de respuesta de las diferentes generaciones de biosensores enzimáticos amperométricos



Nota. Adaptado de [10] A: Biosensores de 1ª generación donde principalmente, el co-sustrato/co-producto se utiliza como indicador redox. B: Biosensores de 2ª generación donde el mediador redox artificial se utiliza para transmitir los electrones. C: Biosensores de 3ª generación donde se da la transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo.

Los biosensores tienen gran importancia en los sectores médico, de control de calidad, alimentario y de monitoreo ambiental. Los biosensores electroquímicos enzimáticos presentan ventajas en cuanto a selectividad y sensibilidad en comparación con otros sistemas analíticos, y su rendimiento depende de la bioactividad de las enzimas inmovilizadas en los electrodos. Las peroxidasas vegetales más ampliamente estudiadas en el desarrollo de biosensores electroquímicos son la HRP [11,12] y la peroxidasa de soya (SBP) [13,14]. En la Tabla 1 se resumen los biosensores basados en peroxidasas de plantas reportados en la literatura.

Sakharov *et al.* [5] reportó actividad de 231.2 U/g en hojas de caléndula. La literatura disponible es limitada y no reporta investigaciones adicionales sobre la actividad de PCO.

Tabla 1
Biosensores electroquímicos para detección de H_2O_2 basados en peroxidasas

Fuente de peroxidasa	Rango lineal [μ M]	Límite de detección	Referencia
Raíz de rábano picante (<i>Armoracia rusticana</i>)	5 a 110	0.53 μ M	[15]
Cáscara de soya (<i>Glycine max</i>)	20 a 100	1.9 μ M	[16]
Hojas de limonaria (<i>Cymbopogon citratus</i>)	500 a 4000	0.05 mM	[17]
Cáscara de batata (Ipomea batatas)	250 a 5000	4.6 mM	[18]
Hojas de pasto guinea (<i>Panicum maximum</i>)	100 a 3500	150 μ M	[19]
Hojas de palma real (<i>Roystonea regia</i>)	5 a 100	87 μ M	[20]

2. Marco Teórico

2.1. Enzimas

Las enzimas son moléculas orgánicas, generalmente proteínas, que cumplen con función de catalizar reacciones químicas, haciendo que estas se produzcan en condiciones de velocidad útiles y no se obtengan reacciones colaterales no productivas, todo esto sin modificar la posición de equilibrio de la reacción. Dos de sus características más importantes son su especificidad, interaccionando con un solo o unos sustratos, catalizando únicamente un solo tipo de reacción (Tabla 2); y que, al ser catalizadores no se consumen ni se modifican tras participar en una reacción química, volviendo a su estado inicial para participar en un nuevo ciclo [21,22].

Tabla 2

Clasificación de enzimas según su actividad catalítica.

Número	Clase de enzima	Actividad catalítica
1	Oxidoreductasas	Cataliza reacciones de oxidorreducción.
2	Transferasas	Catalizan la transferencia de grupos.
3	Hidrolasas	Catalizan la escisión de enlaces mediante la adición de agua.
4	Liasas	Catalizan la escisión de los enlaces C—C, C—O y C—N por eliminación, formando dobles enlaces.
5	Isomerasas	Catalizan la racemización de isómeros ópticos o geométricos.
6	Ligasas	Catalizan la formación de enlaces entre el carbono y moléculas acopladas a la hidrólisis de fosfatos de alta energía.

Nota. Tomado de [23]

2.1.1. Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas son enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción, por lo general de la manera $A^- + B \rightarrow A + B^-$. Biológicamente se dan por la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno de un dador (reductor) a un aceptor (oxidante), o en otras ocasiones por incorporación de átomos de hidrógeno en el sustrato. Se dividen en más de 20 subclases según el grupo funcional donador o aceptor [24].

Estas enzimas cumplen un papel importante en organismos vivos, siendo utilizadas para síntesis de biomoléculas, degradación o eliminación de moléculas, metabolismo de moléculas exógenas. Debido a sus buenas propiedades bioquímicas y nivel de estudio las hacen idóneas para uso industrial en áreas como nutrición, industria alimentaria, síntesis química, medicina, entre otras [25].

2.2. Peroxidasas

Las peroxidasas son oxidorreductasas encargadas de catalizar la oxidación de diversos sustratos mediante la reducción de peróxidos, como el peróxido de hidrógeno [3]. Desde el punto de vista estructural, estas enzimas se caracterizan por la presencia de un grupo prostético hemo tipo B. En este grupo, un átomo de hierro en estado férrico (Fe^{3+}) se encuentra coordinado con cuatro átomos de nitrógeno pertenecientes a los anillos pirrólicos de la porfirina, además de una quinta coordinación con un residuo proximal de carácter imidazólico, generalmente correspondiente a una histidina. Adicionalmente, la mayoría de las peroxidasas presenta una histidina distal que no está directamente coordinada al átomo de hierro, pero que cumple un papel esencial en el mecanismo catalítico [26,29].

Entre las principales aplicaciones de las peroxidasas se encuentran la degradación de tintes, el tratamiento de efluentes y la fabricación de biosensores [27].

2.2.1. Clasificación de las peroxidasas

Estas enzimas pueden clasificarse según la presencia o ausencia de un grupo hemo; las peroxidasas dependientes de grupo hemo se agrupan en dos grandes superfamilias: animales y no animales, además de cuatro superfamilias menores no relacionadas entre sí.

Las peroxidasas no animales se subdividen en tres clases (I, II y III), las cuales se diferencian por su origen, baja identidad de secuencia, funciones específicas y localización celular. Actualmente se reportan más de 12.000 secuencias de esta familia registradas en Peroxibase [28].

- **Clase I:** Consisten únicamente de peroxidasas procarióticas intracelulares y eucarióticas no glicosiladas, sin puentes disulfuro ni capacidad de unión al átomo de calcio (Ca^{2+}) [26].
- **Clase II:** Solo se conocen en el reino fungi, se encargan de la degradación de lignina por medio de distintos mecanismos [29].
- **Clase III:** Las peroxidasas de clase III son exclusivas de las plantas y participan en diversos procesos fisiológicos, como el metabolismo de la pared celular, la cicatrización de heridas, el catabolismo de auxinas, la defensa frente a patógenos e insectos, y el crecimiento celular normal [3].

2.2.2 Ciclo catalítico de las peroxidasas

El ciclo catalítico de la peroxidasa (Fig. 3) se inicia con la unión del peróxido de hidrógeno al átomo de hierro del grupo hemo, formando un intermedio en el que el peróxido se encuentra en su forma no desprotonada, $[\text{Fe(III)}\text{--HOOH}]$. Este complejo favorece el aumento de la acidez del peróxido, lo que permite su posterior desprotonación por el residuo distal de histidina en el sitio

activo. Como resultado, se genera el intermedio ferri-hidroperóxido [Fe(III)–OOH], denominado Compuesto 0.

La formación del Compuesto I ocurre mediante la protonación del oxígeno distal del Compuesto I. Este protón es transferido por el grupo imidazol de la histidina distal, lo que cataliza la ruptura del enlace O–O. En consecuencia, se libera una molécula de agua y se genera el Compuesto I (Ec. 1) [29].

El Compuesto I es un intermediario de reacción que presenta un centro oxoferril en estado de oxidación +IV y un radical catión π localizado en la porfirina. Este intermediario acepta un electrón y un protón del sustrato, dando lugar a la formación de un radical libre y del Compuesto II (Ec. 2), el cual es estructuralmente similar al Compuesto I, pero sin la presencia del radical porfirínico. Posteriormente, el Compuesto II acepta un segundo electrón y protón provenientes del sustrato, lo que permite su reducción y el retorno de la enzima a su estado inicial (Ec. 3) [30-32].

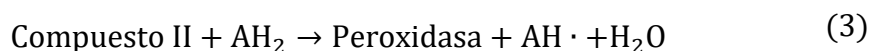
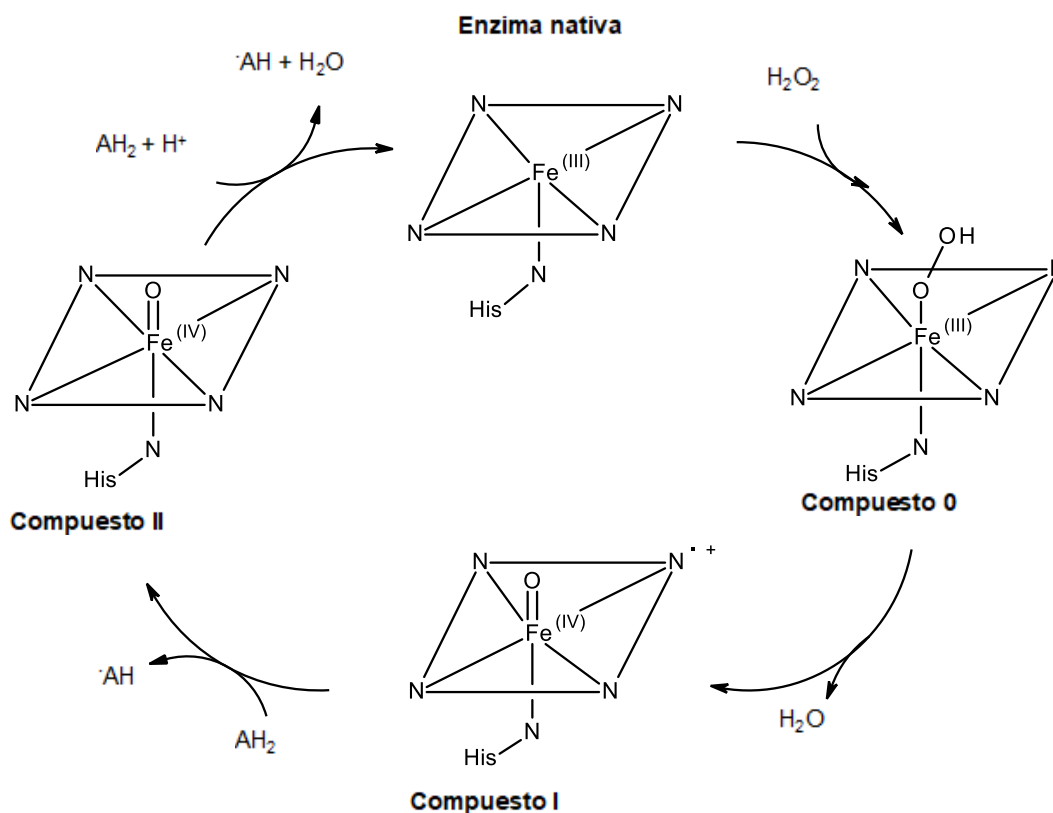


Figura 3

Esquema general del ciclo catalítico de las peroxidasas



Nota. El cuadrado de cuatro nitrógenos alrededor del átomo de hierro es una representación del grupo hemo de la peroxidasa. Gráfica propia basada en [29]

2.2.3. Efecto de pH en las peroxidasas

La actividad enzimática se encuentra significativamente influenciada por el pH, debido a que la mayoría de las reacciones catalizadas involucran grupos ionizables, ya sea en la enzima o en el sustrato. En este sentido, la variación del pH puede modificar el estado de ionización de dichos grupos, afectando la conformación de la enzima y su capacidad catalítica.

Generalmente, las enzimas presentan una relación entre pH y actividad con forma de campana, en la cual la actividad máxima se observa en un rango de pH, frecuentemente cercano a

la neutralidad. La disminución de la actividad en valores extremos de pH puede deberse tanto a la desestabilización de la enzima como a cambios en los parámetros cinéticos ocasionadas por cambios en los estados de ionización de los sitios activos.

La determinación del rango de pH óptimo es de gran importancia para la optimización de ensayos enzimáticos. Además, permite inferir los valores de pK_a y, por ende, identificar los grupos ionizables presentes en la enzima [33].

2.2.4. Efecto de temperatura en las peroxidasas

De acuerdo con la ecuación de Arrhenius (Ec. 4) la velocidad de una reacción química en equilibrio depende de la temperatura. Un incremento de temperatura (T) causa un aumento en la velocidad de la reacción (k), debido a que la energía térmica ($k_B T$) incrementa, facilitando así la superación de la energía de activación (E_a). Dado que la energía de activación tiene un valor mucho más grande que $k_B T$, pequeños cambios de temperatura generan grandes incrementos en la velocidad de reacción [34].

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{k_B T}} \quad (4)$$

Las peroxidasas, al igual que la mayoría de las enzimas, son proteínas y, por lo tanto, a altas temperaturas pueden experimentar desnaturalización térmica. A partir de cierta temperatura, la velocidad de la reacción catalizada disminuye como consecuencia de la inactivación del catalizador enzimático [33].

2.3. Generalidades de la caléndula

La caléndula (*Calendula officinalis*) (Fig. 4) es una planta herbácea anual y aromática perteneciente a la familia Asteraceae, subfamilia Asteroideae, originaria de la región

mediterránea. Desde el siglo XII ha sido utilizada con fines medicinales para el tratamiento de afecciones cardíacas, cáncer y trastornos asociados al calor [35].

Esta especie crece de manera óptima en climas templados y fríos; en Colombia, se adapta a un amplio rango de condiciones ambientales. Sus principales aplicaciones industriales incluyen la formulación de suplementos vaginales, tratamientos para afecciones cutáneas, geles antiulcerosos y productos cosméticos, como champús y cremas [36].

Figura 4

Caléndula (Caléndula Officinalis)



Nota. Fuente: inaturalist.org [Citado 12 de marzo de 2026] Recuperado de: <https://colombia.inaturalist.org/observations/312459535>

2.4. Peróxido de hidrógeno como analito

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un compuesto inorgánico volátil, clasificado como una especie reactiva de oxígeno, que presenta marcadas propiedades oxidantes. En el organismo se genera como subproducto en diversas reacciones catalizadas por enzimas oxidasas, tales como la glucosa oxidasa (GOx), colesterol oxidasa (COx), glutamato oxidasa (GluOx) y oxalato oxidasa

(OxOx), entre otras. Este compuesto es utilizado como marcador biológico de estrés oxidativo, proceso implicado en la patogénesis de múltiples enfermedades como cáncer, enfermedad de Parkinson, diabetes, aterosclerosis y más, esto debido a su papel de segundo mensajero, modulando vías biológicas importantes encargadas de procesos vitales como el crecimiento celular, apoptosis y remodelado vascular. [37-39]

En el ámbito ambiental, el peróxido de hidrógeno puede encontrarse en cuerpos de agua como resultado de reacciones fotoquímicas y procesos mediados por radicales libres. Este compuesto actúa como un potente agente oxidante, participando en la conversión del dióxido de azufre en ácido sulfúrico, el cuál es el principal contribuyente de la acidificación del agua en forma de lluvia, niebla y nubes, influyendo de manera importante en la calidad del recurso hídrico. [39,40]

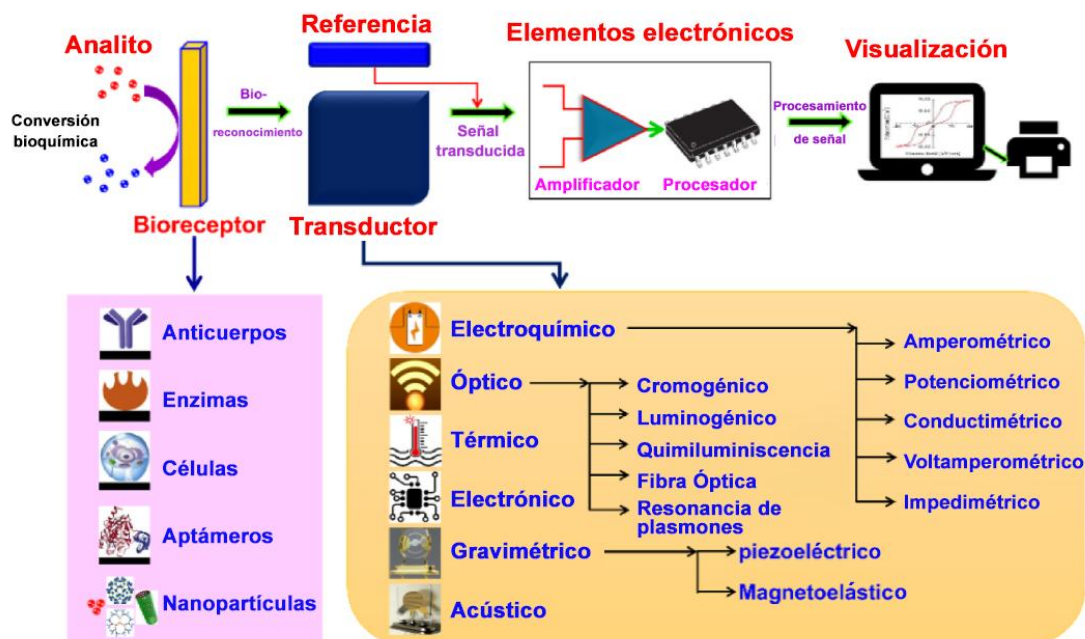
Por otra parte, en la industria alimentaria, el peróxido de hidrógeno puede generarse como residuo durante distintos procesos industriales, tales como la pasteurización, la esterilización y el empaquetado, así como por la autooxidación de componentes alimentarios, incluyendo compuestos fenólicos, ácido ascórbico y tioles. [37,41]

2.5. Biosensores

Los biosensores (Fig. 5) son dispositivos de detección química en los cuales el sistema de reconocimiento se basa en un mecanismo bioquímico; al emplear biomoléculas, presentan una alta especificidad hacia los analitos [42]. Están constituidos principalmente por dos componentes: un bioreceptor, que es la biomolécula responsable del reconocimiento específico del analito, entre los cuales se encuentran enzimas, anticuerpos, aptámeros y ácidos nucleicos, y un transductor, encargado de convertir una forma de energía en otra y generar una señal cuantificable [43].

Figura 5

Diagrama esquemático de un biosensor compuesto por un bioreceptor, un transductor y un amplificador.



Nota. Adaptado de [43]

2.5.1. Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos detectan cambios de naturaleza química derivados de la interacción entre el analito y el electrodo del sensor mediante la medición de una propiedad eléctrica. Esto permite su clasificación según la metodología empleada en biosensores potenciométricos, amperométricos y conductimétricos (Fig. 6).

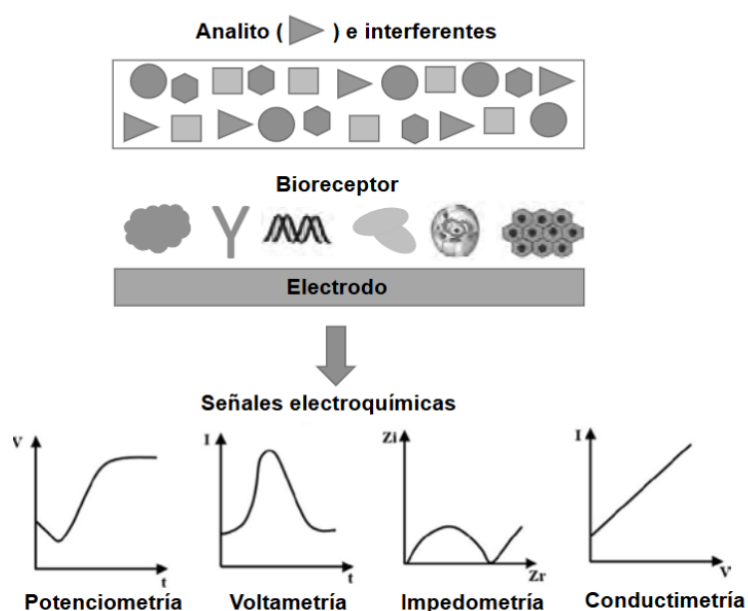
Los biosensores amperométricos miden la corriente generada por la oxidación o reducción de una especie electroactiva a un potencial determinado; dicha corriente es proporcional a la concentración del analito. Por su parte, los biosensores potenciométricos determinan la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia en ausencia de flujo de

corriente. En los biosensores conductimétricos se evalúan los cambios en la conductividad de la membrana biológica como resultado de su interacción con el analito.

Los biosensores electroquímicos necesitan tener alta selectividad y sensibilidad, reproducibilidad, facilidad de calibración y aplicación, robustez, portabilidad, pequeñas dimensiones y cortos tiempos de respuesta, hoy en día esto se logra haciendo uso de electrodos serigrafiados. [42]

Figura 6

Señales monitoreadas en los biosensores electroquímicos



Nota. Tomado de [42]

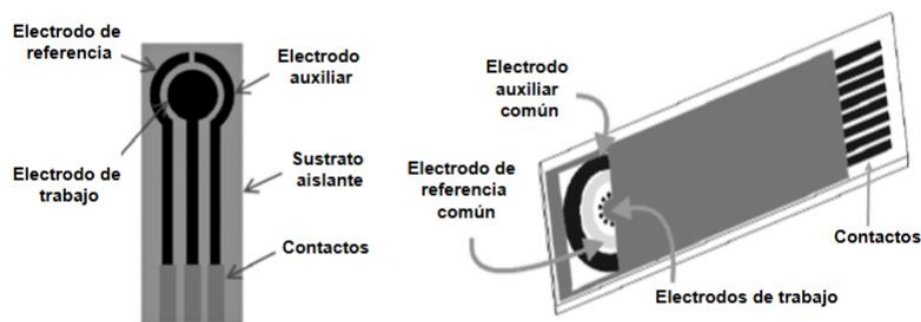
2.6. Electrodos serigrafiados de carbono

Convencionalmente los biosensores enzimáticos usan componentes electroquímicos robustos como electrodos de oxígeno e hidrógeno. Como consecuencia sus costos de fabricación, las frecuentes calibraciones y mantenimientos hacen que su desarrollo de mercado se dé de manera lenta. Para mejorar este aspecto se requieren biosensores de bajo costo y amigables con el usuario,

los electrodos serigrafiados (SPEs) (Fig. 7) cumplen con estos requisitos, contando además con buena reproducibilidad, proceso automatizado y alto rango de materiales [44].

Figura 7

Tipo de electrodos serigrafiados comerciales



Nota. Tomado de [42]

El diseño de nanomateriales ha encontrado un amplio rango de aplicaciones en el campo de sensores, especialmente en los SPEs. Los nanotubos de carbono, nanocables y nanopartículas metálicas han sido los más utilizados debido a que promueven las reacciones de transferencia de electrones, disminuyen el potencial de trabajo del electrodo, aumentan la velocidad de reacción, mejoran la sensibilidad y en biosensores contribuyen a que el biocomponente tenga mayor estabilidad [45].

2.7. Voltamperometría cíclica

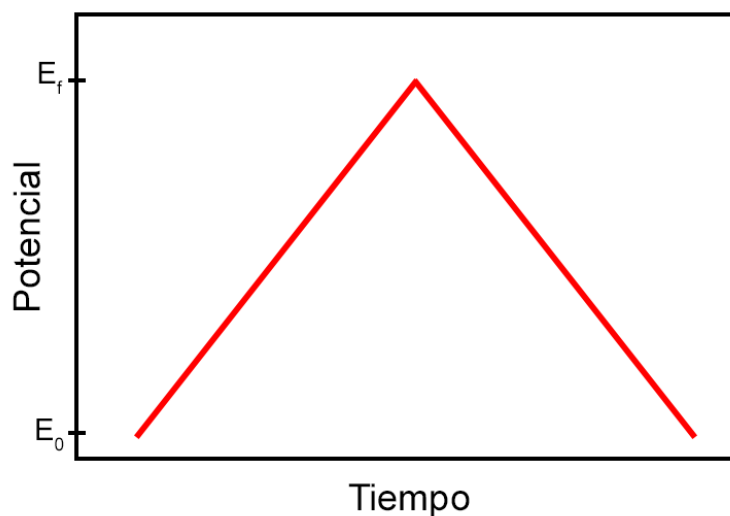
La voltamperometría cíclica (VC) es una técnica electroquímica analítica en la que se registra la corriente generada en un electrodo estacionario como respuesta a la aplicación de un potencial que sigue una forma de onda triangular (Fig. 8).

El potencial se varía linealmente desde un valor inicial E_0 a uno final E_f , al alcanzar este último valor se invierte el sentido del barrido hasta llegar al potencial E_0 , esto se repite varias veces. El intervalo de potencial se selecciona en función de las regiones donde ocurren procesos

de oxidación o reducción de los analitos, generalmente controlados por difusión. La dirección del barrido dentro de este intervalo depende de la naturaleza de la muestra y del proceso electroquímico que se desee estudiar [46].

Figura 8

Potencial aplicado en función del tiempo en un voltamperograma cíclico



La voltamperometría cíclica permite obtener tanto información cualitativa, relacionada con la naturaleza de la transferencia de electrones y la reversibilidad o irreversibilidad de un par redox, como información cuantitativa, entre la que se incluyen el potencial redox, la cinética de la reacción y la concentración del analito [48–49].

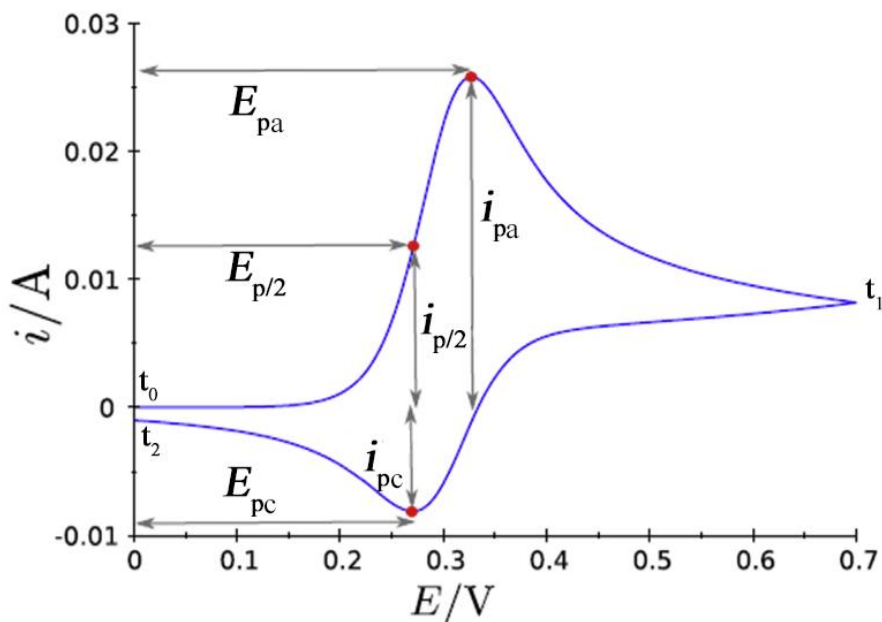
En un voltamperograma cíclico (Fig. 9) se puede observar una onda catódica cuando la corriente aumenta, llegando a un punto máximo llamado E_{pc} , llamado “Potencial de pico catódico”, después de este la corriente disminuye con el aumento del potencial. Esto se debe a que la especie electroactiva se está agotando en la superficie del electrodo.

Cuando se llega al potencial máximo (t_1), el sentido del barrido de potencial se invierte, al ir volviéndose más positivo el potencial la sustancia reducida empezará a oxidarse hasta el punto E_{pa} , llamado “Potencial de pico anódico”, al irse agotando la especie electroactiva la corriente regresa a su valor inicial [48].

Para saber si una reacción reversible o no se comparan los valores de las corrientes de pico catódico y anódico, I_{pc} y I_{pa} respectivamente. En un sistema reversible, la relación entre ambas corrientes es cercana a la unidad ($I_{pa}/I_{pc} \approx 1$) [48]. Este criterio se complementa con la separación entre los potenciales de pico (ΔE_p), que para sistemas reversibles es de un valor cercano o igual a 57 mV (a 25 °C), este valor debe permanecer prácticamente constante ante variaciones en la velocidad de barrido [51].

Figura 9

Ejemplo de voltamperograma cíclico



Nota. Adaptado de [50]

3. Metodología

3.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de: Aldrich: Polietilenglicol (12000 Da); JT Baker: Peróxido de hidrógeno 30% p/p, sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ferricianuro de potasio $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, fosfato de potasio monobásico KHPO_4 , fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 ; Merck: Guayacol $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$

3.2. Extracción y semipurificación de la PCO

Para la extracción de la PCO se siguió la metodología de Sakharov et al. [5] con modificaciones en lo que respecta al buffer, su pH y tiempo de incubación del extracto. La caléndula fue adquirida en plazas de mercado de Bucaramanga, de la cual sus hojas fueron lavadas con agua desionizada y cortadas en pequeños pedazos.

Inicialmente se hicieron cuatro extractos de pH 5, 6, 7 y 8 para determinar el pH óptimo para la extracción de la siguiente manera: se pesó 25 g de hojas cortadas para cada uno y se maceró con 100 mL de PBS 100 mM con su respectivo pH ajustado, siempre siguiendo una proporción 1:4 entre las hojas de caléndula y el buffer. El extracto se dejó agitando en un shaker por 24 horas a temperatura ambiente y una velocidad de 120 rpm. Se presentó mayor actividad enzimática con pH 6, por lo cual se seleccionó para hacer la extracción definitiva.

Para realizar el extracto definitivo se pesó 50 g de hoja de caléndula, se maceró con 200 mL PBS 100 mM a pH 6 y se dejó agitando por 12 horas a 120 rpm y temperatura ambiente. Con el fin de concentrar la muestra, se preparó un segundo extracto con 50 g de hoja de caléndula y 200 mL de PBS 100 mM a pH 6, al cual se añadió el primer extracto. La mezcla combinada se dejó bajo agitación a 120 rpm durante 12 horas a temperatura ambiente y posteriormente se filtró.

3.2.1. Semipurificación del extracto de PCO

El extracto concentrado conseguido se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante.

Para la eliminación de pigmentos se hizo reparto bifásico añadiendo polietilenglicol (PEG) de peso molecular 12.000 Da al 14% p/v. Una vez disuelto el PEG, se añadió sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 10% p/v bajo agitación magnética hasta su completa disolución. La mezcla se añadió en un embudo de separación y se dejó reposar por 4 horas hasta la separación en dos fases.

3.2.2. Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis, a partir de la medición de las velocidades iniciales de la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el guayacol, catalizada por la peroxidasa presente en el extracto. para la formación de tetraguayacol, Esta reacción conduce a la formación de tetraguayacol, un compuesto coloreado con un coeficiente de extinción molar de 26.6 mM⁻¹·cm⁻¹.

El sustrato utilizado para la medición consistió de 20 mL de PBS 100 mM pH 6, 40 µL de guayacol y 10 µL de peróxido de hidrógeno 30% (p/p). Para cada medición, se añadieron en la celda 1 mL de sustrato y 33 µL de extracto correspondiente a cada fase de purificación.

3.3. Caracterización bioquímica de la PCO

3.3.1. Cuantificación de proteínas por método BCA

Se empleó el kit de cuantificación de proteínas BCA de la marca Thermo Scientific. Para ello, se elaboró una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de concentraciones de 20 a 2000 µg/mL. Tanto para los estándares como para las muestras, se tomaron 25 µL, los cuales se mezclaron con 200 µL de solución de sulfato de cobre (II).

Finalmente, la absorbancia se determinó a 562 nm empleando el lector de microplacas Multiskan Sky (Thermo Scientific).

3.3.2. Estabilidad de peroxidasa a distinto pH

Se incubó 10 μL del extracto en un volumen de 990 μL de buffer universal (ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico) 100 mM y ajustada con hidróxido de sodio 0.1 M en un rango de pH de 2 a 10 por 2 horas. Pasada la incubación se determinó la actividad enzimática con un sustrato compuesto por 5 mL de buffer universal con ajuste de pH, 2,5 μL de H_2O_2 y 10 μL de guayacol.

3.3.3. Estudio de estabilidad a diferentes temperaturas

En un primer ensayo se determinó la temperatura de inactivación de la enzima. Para ello, se calentó un tubo de ensayo con 10 mL de una dilución 1:10 del extracto en PBS 100 mM pH 6 en un rango de 40 a 80 °C. Cada 5 °C se tomó una alícuota, la cual se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de medir su actividad enzimática. Este ensayo permitió identificar 55 °C como la temperatura a partir de la cual la actividad comienza a disminuir significativamente.

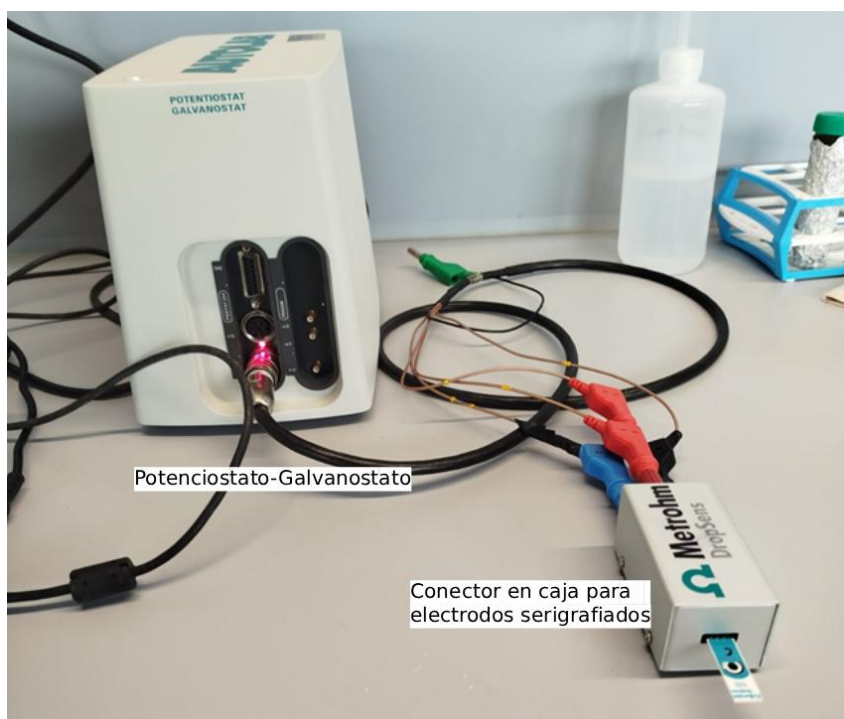
En la segunda fase se calentó 25 mL de solución 1:10 de extracto en PBS 100 mM pH 6 hasta alcanzar la temperatura de inactivación (55 °C), se mantuvo el calentamiento constante a esa temperatura y se sacaron alícuotas de 1 mL cada 10 minutos durante 2 horas, las cuales se dejaron enfriar a temperatura ambiente para realizar la medición de actividad enzimática.

3.4. Caracterización electroquímica de electrodos modificados con PCO

Para las mediciones electroquímicas se utilizó el equipo AUTOLAB POTENTIOSTAT GALVANOST PGSTAT204 (Fig. 10) y los datos se procesaron con el software NOVA 2.1.8, los electrodos utilizados son electrodos serigrafiados de carbono modificado con nanopartículas de oro (DRP-GNP110) de la marca Metrohm.

Figura 10

Montaje experimental para la caracterización electroquímica de PCO



3.4.1. Modificación de electrodos con PCO

Se modificaron los inmovilizando por adsorción física 10 μ L del extracto semi-purificado tras el reparto bifásico en cada electrodo y se dejó secar en un lugar oscuro por 24 horas a temperatura ambiente.

3.4.2. Caracterización por VC

Con el fin de establecer las condiciones de referencia del sistema electroquímico, se registraron voltamperogramas cíclicos bajo diferentes condiciones experimentales. Se midieron tres electrodos de control: Electrodo únicamente con PBS 100 mM, electrodo con solución de peróxido de hidrógeno en PBS a 0.1 mM y uno con enzima inmovilizada y PBS 100 mM.

3.4.3. Caracterización de electrodos con ferricianuro de potasio por VC

Se utilizó una solución de ferricianuro de potasio 10 mM como electrolito modelo y 0.1 M KCl como electrolito de soporte para la caracterización electroquímica de los electrodos. Los voltamperogramas se registraron a una velocidad de barrido de 50 mV/s, en un intervalo de potencial comprendido entre -0.6 V y 0.6 V. Las mediciones se realizaron tanto en el electrodo modificado como en un electrodo de control, con el fin de comparar su comportamiento electroquímico.

3.4.4. Evaluación del efecto de barrido en VC de electrodos

Se realizaron voltamperogramas cíclicos utilizando un electrodo modificado con PCO en una solución de H_2O_2 0.1 mM en PBS 100 mM pH 6. Las mediciones se llevaron a cabo variando la velocidad de barrido entre 50 y 450 mV/s.

3.4.5. Evaluación de los electrodos modificados con H_2O_2

Se evaluaron soluciones de peróxido de hidrógeno en PBS 100 mM pH 6 en un rango de concentraciones de 0.1 a 2 mM. Las mediciones se realizaron en electrodos modificados con PCO a una velocidad de barrido de 100 mV/s y un rango de potencial de -1 a 1 V.

4. Análisis y resultados

Con el fin de comparar las etapas de semipurificación del extracto enzimático, se derivó la ley de Lambert-Beer (Ec. 5) respecto al tiempo, estableciendo así una relación directa entre la variación de la absorbancia y la concentración del analito. De esta derivación se obtuvo la ecuación 6, donde dA/dt corresponde a la pendiente de la medición cinética (s^{-1}), ε es el coeficiente de absorptividad molar ($mM^{-1} \cdot cm^{-1}$), l es la longitud del paso óptico de la celda (cm), V_T es el volumen total de reacción en la celda (mL) y FD es el factor de dilución aplicado a la muestra.

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

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

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

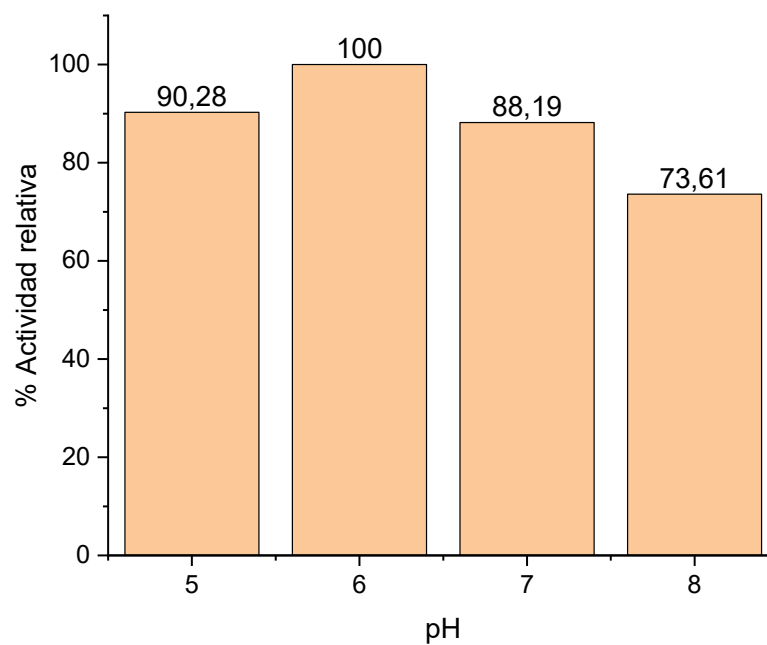
$$Actividad\ enzimática = \frac{dA/dt}{\varepsilon l} \cdot V_T \cdot FD \quad (6)$$

4.1. Ensayo preliminar de pH para optimización de extracción de la PCO

Con el propósito de optimizar las condiciones de extracción, se realizó un estudio preliminar para determinar el pH óptimo de extracción de la PCO. Para ello, se evaluó la actividad enzimática de extractos obtenidos con buffer PBS 100 mM a pH 5, 6, 7 y 8, cuyos resultados se presentan en la Figura 11. Como se puede observar, los extractos obtenidos a pH 5, 6 y 7 presentaron los valores más altos de actividad enzimática en comparación con pH 8, siendo el pH 6 el que mostró la mayor actividad. Este comportamiento sugiere que la enzima presenta mayor estabilidad en condiciones ligeramente ácidas. Con base en estos resultados, se estableció pH 6 como condición estándar para todas las extracciones posteriores.

Figura 11

Actividad relativa del extracto de PCO a distintos pH



4.2. Extracción y semipurificación de la PCO

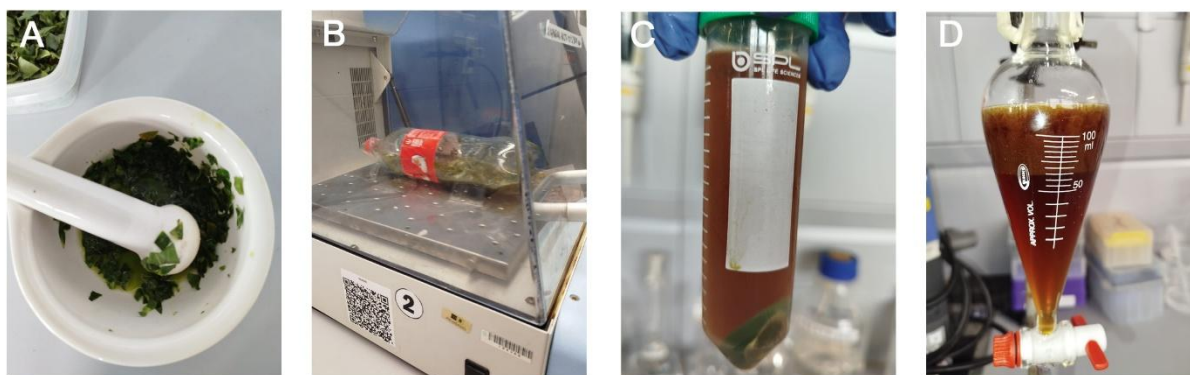
Después de la obtención del extracto con buffer PBS 100 mM pH 6, este fue sometido a un pretratamiento. Debido a su origen el extracto puede contener fitoquímicos como fenoles, polifenoles, lípidos, carbohidratos y pigmentos que pueden generar interferencias en las mediciones enzimáticas posteriores [52,53]. Fueron eliminados material particulado y restos celulares mediante centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C [54].

Mediante la precipitación del extracto de peroxidasa con PEG 14% p/v (12000 Da) y sulfato de amonio 10% p/v se generó un sistema acuoso de dos fases. La presencia de altas concentraciones de sulfato de amonio induce un efecto de salting out, en el cual los iones de la sal compiten por las moléculas de agua, disminuyendo la disponibilidad de estas para la solvatación

de otras biomoléculas y reduciendo así sus esferas de hidratación [56]. Por esta razón compuestos con menor carácter hidrofílico, tales como pigmentos, polifenoles, fenoles y sus productos de oxidación, así como proteínas con regiones hidrofóbicas expuestas, tienden a particionarse hacia la fase superior rica en PEG, mientras que las peroxidasas y proteínas hidrosolubles se mantienen en la fase baja rica en sulfato de amonio [19,55-56]. Las fases de la extracción y semipurificación del extracto se observan en la Figura 12.

Figura 12

Procedimiento experimental de extracción y semipurificación de PCO

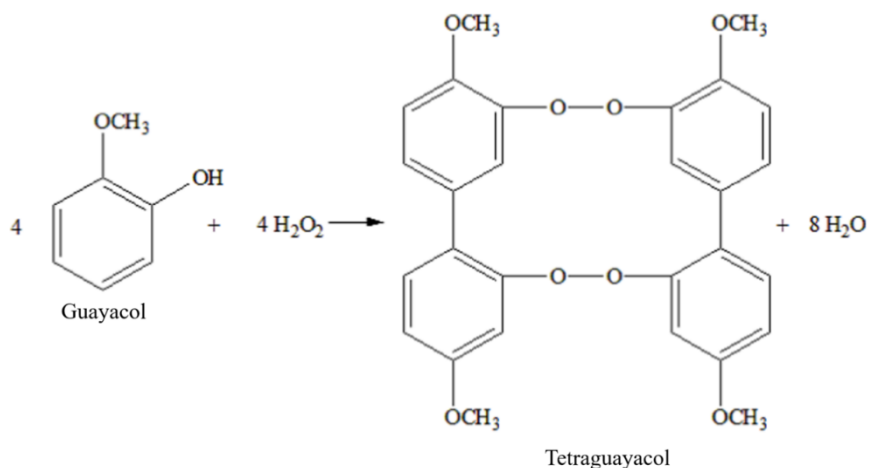


Nota. (A) Maceración de las hojas de caléndula con buffer PBS 100 mM pH 6 (B) Agitación del extracto por 12 horas en agitador orbital (C) Centrifugación del extracto (D) Sistema acuoso de dos fases.

Se evaluó la cinética de reacción de todos los extractos durante un minuto mediante espectrofotometría UV-Vis. Para cada medición, se emplearon 33 μL del extracto en combinación con 1 mL de una solución de sustrato compuesto por peróxido de hidrógeno y guayacol. Este procedimiento permitió estudiar la reacción de oxidación del guayacol a tetraguayacol (Fig. 13), catalizada por la enzima peroxidasa. El tetraguayacol es un compuesto coloreado que presenta una absorbancia máxima a 470 nm y un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $26,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Figura 13

Reacción de oxidación de guayacol con H_2O_2



Nota. Adaptado de [27]

Con estos valores y la ecuación 6 se encontró la actividad enzimática de cada uno de los pasos de semipurificación del extracto, reportados en la Tabla 3. El valor de actividad volumétrica se obtuvo con la actividad enzimática y el volumen de extracto en la celda, en este caso 33 μL (Ec. 7)

$$\text{Actividad volumétrica} = \frac{\text{Actividad enzimática [U]}}{\text{Volumen de extracto en celda [mL]}} \quad (7)$$

Para determinar la actividad específica, se cuantificó la concentración de proteínas de cada extracto mediante un kit de ensayo BCA. Se construyó una curva de calibración empleando estándares de BSA en un rango de 25 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo A). El método se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} en presencia de proteínas (reactivo con sulfato de cobre (II)) y en la posterior formación de un complejo entre el ion cuproso y el reactivo BCA, lo que genera una coloración púrpura proporcional a la concentración proteica de la muestra. La absorbancia se midió a 562 nm [57]. Finalmente, a partir del contenido total de proteínas, se calculó la actividad específica.

Tabla 3
Tabla de semipurificación de PCO

Etapas de purificación	Volumen [mL]	Actividad volumétrica [U/mL]	Actividad [U]	Actividad específica [U/mg]	Proteína total [mg/mL]	Rendimiento %	Factor de purificación
Extracción	422	0.346	0.0114	0.043	8.03	100	1
Centrifugación	366	0.378	0.0125	0.057	6.57	109	1.33
Separación bifásica	200	0.953	0.0315	0.209	4.56	276	4.86

La Tabla 3 muestra el aumento de la actividad enzimática, la actividad volumétrica y la actividad específica, junto con la disminución de la proteína total, alcanzando un valor final de actividad específica de 0.209 U/mg. Estos resultados indican que el proceso de semipurificación se realizó de manera satisfactoria. La mejora en la actividad enzimática ocurre a medida que disminuye la proteína total en el extracto, lo que evidencia la eliminación de proteínas contaminantes y fitoquímicos con posible efecto inhibitorio [33]. El rendimiento de la purificación alcanzó un valor de 276%, superando el 100% inicial definido para el extracto crudo. Este incremento no implica un aumento de concentración enzimática, sino que se atribuye a la remoción de inhibidores presentes en el extracto crudo o a la activación de la enzima durante el proceso de semipurificación.

En la etapa de centrifugación la actividad enzimática no presenta diferencias significativas, ya que esta fase se centra principalmente en la eliminación de sólidos y pigmentos, como se

observa en la Figura 8C. El pellet del extracto centrifugado retiene el pigmento de las hojas de caléndula y proteínas, lo que explica la reducción en la cantidad de proteínas totales. La separación bifásica logra la mayor purificación del extracto, este resultado se debe a la precipitación de compuestos y proteínas residuales mediante sus interacciones con el PEG, como se explicó previamente.

4.3. Caracterización bioquímica de la PCO

4.3.1. Estabilidad a diferentes pH

La PCO presenta un pH óptimo de 6. La curva de actividad enzimática en función del pH (Fig. 14) exhibe una forma de campana centrada alrededor de valores próximos a la neutralidad, comportamiento característico de la mayoría de las enzimas [33]. En condiciones de pH extremos, la actividad disminuye significativamente, lo cual puede atribuirse a la desnaturalización de la proteína y a la consecuente pérdida del grupo hemo, esencial para la función catalítica de la enzima [58].

En la Tabla 4 se presentan diversas peroxidasas de origen vegetal junto con sus propiedades bioquímicas, entre ellas el pH óptimo de actividad. Se observa que la mayoría de estas enzimas exhiben un pH óptimo dentro del rango de 4 a 7, lo que evidencia su carácter predominantemente ácido, con algunos casos cercanos a la neutralidad como la HRP [66,70]. Por otra parte, son escasas las peroxidasas vegetales que muestran actividad en condiciones alcalinas, como ocurre con la peroxidasa de *Panicum maximun* y la peroxidasa de *Curcuma longa* rizoma [19,64]. La PCO mantiene más del 70% de su actividad relativa en el rango de pH 5 a 7, lo cual es consistente con lo reportado para otras peroxidasas de origen vegetal, como la peroxidasa de *Cymbopogon citratus* [17] y la peroxidasa de *Manilkara zapota* [59], que presentan valores óptimos en condiciones ácidas a cercanas a la neutralidad.

4.3.2. Estabilidad e inactivación térmica

Para evaluar la estabilidad térmica, una solución enzimática fue incubada a diferentes temperaturas y se midió la actividad en intervalos de 5 °C entre 40 y 80 °C (Fig. 15). Los resultados muestran un intervalo en el que la actividad relativa se mantiene por encima del 70 %, comprendido entre 40 y 65 °C, dentro del cual se identifica una temperatura óptima de 55 °C.

En el intervalo de 40 a 55 °C se evidencia un incremento en la actividad enzimática, lo cual puede explicarse por el aumento de la energía cinética asociado al incremento de la temperatura, favoreciendo una mayor frecuencia de colisiones entre la enzima y el sustrato. Sin embargo, a partir de los 55 °C se observa una disminución en la actividad, atribuida principalmente a la desnaturalización de la proteína; en estas condiciones, el exceso de movimiento molecular compromete la estabilidad estructural de la enzima, impidiendo la adecuada formación del complejo enzima–sustrato y, en consecuencia, reduciendo la actividad catalítica [71].

Este comportamiento es comparable al de otras peroxidasas vegetales, como la peroxidasa de *Cymbopogon citratus*, que presenta estabilidad en el rango de 40 a 66 °C [17], y la peroxidasa de *Ziziphus jujuba*, estable entre 40 y 65 °C [61]. No obstante, la peroxidasa de caléndula exhibe un amplio rango de estabilidad térmica, comparable e incluso superior al reportado para algunas peroxidasas ampliamente estudiadas. Entre estas se encuentra la HRP, que, a pesar de ser una de las más utilizadas a nivel industrial, presenta un rango óptimo de 25 a 42 °C [66], así como la peroxidasa de *Lepidium sativum*, con un rango de estabilidad entre 20 y 40 °C [68].

Figura 14

Actividad enzimática de PCO a distintos pH

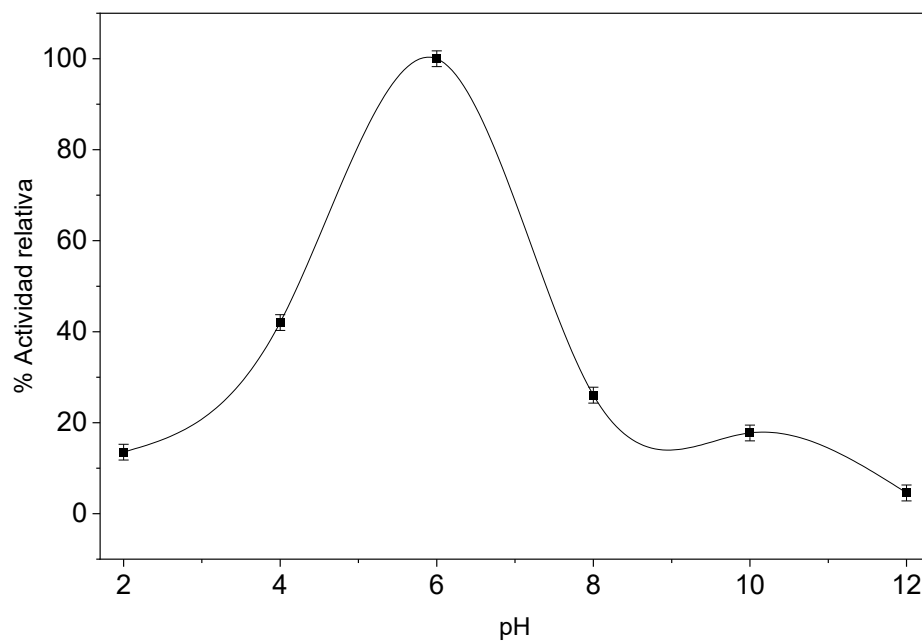


Figura 15

Estudio de estabilidad térmica de PCO

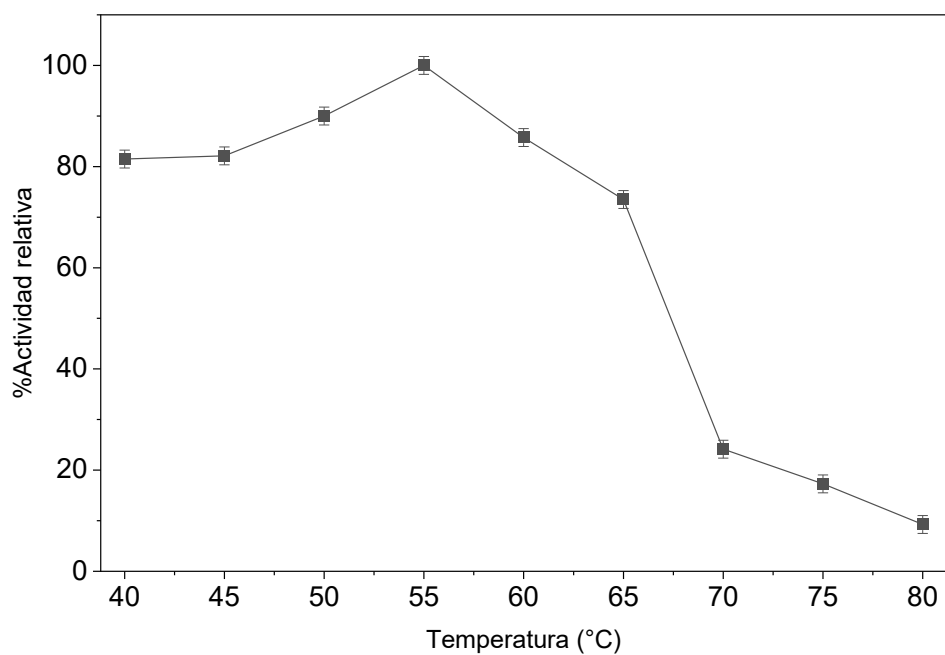


Tabla 4

Propiedades bioquímicas de diferentes peroxidasa vegetales

Fuente de peroxidasa	pH óptimo	Rango de temperatura [C°]	Temperatura óptima [°C]	Referencia
<i>Cymbopogon citratus</i>	4 a 6	40-66	66	[17]
<i>Manilkara zapota</i>	3 a 7	5-65	65	[59]
<i>Artocarpus Heterophyllus</i>	5.5	55-60	60	[60]
<i>Ziziphus jujuba</i>	7.5	40-65	50	[61]
<i>Cedrela fissilis</i> hojas	5	45-50	50	[62]
<i>Coleus Forskohlil</i>	6 a 6.5	30-50	50	[63]
<i>Curcuma longa</i> rizoma	8	10-60	60	[64]
<i>Vernonia amygdalina</i>	6	30-60	40	[65]
<i>Armoracia rusticana</i>	7	25-42	30	[66]
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	6	0-70	40	[67]
<i>Panicum maximum</i>	8	-	66	[19]
<i>Lepidium sativum sub sp. sativum</i>	6	20-40	50	[68]
<i>Zingiber officinale</i>	6	-	50	[69]
<i>Calendula officinalis</i>	6	40-65	55	Este trabajo

Sabiendo que la temperatura óptima de la PCO es de 55 °C, se procedió con el ensayo de inactivación térmica. Este consistió en incubar una solución enzimática a temperatura constante de 55 °C durante dos horas, evaluando la actividad enzimática en intervalos de 10 minutos. Los resultados se graficaron como el logaritmo de la actividad en un tiempo t sobre la actividad inicial, eso en función del tiempo (Fig. 16).

La inactivación térmica de las enzimas es considerada como una cinética de primer orden descrita por la ecuación 8, donde A_0 es la actividad inicial de la enzima, A_t es la actividad de la enzima en un tiempo ' t ' y k_d (min^{-1}) es la constante de velocidad de reacción a una temperatura determinada, en este caso corresponde a la velocidad de la inactivación térmica [72].

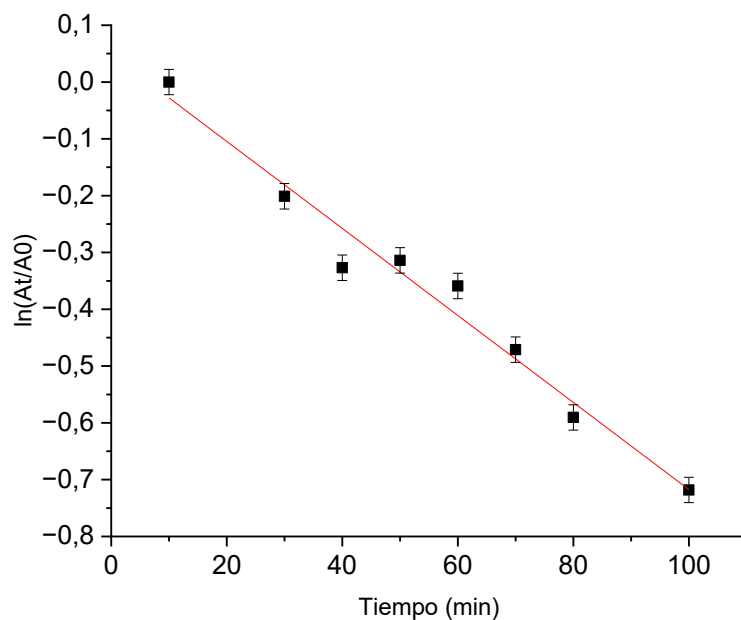
$$\ln \frac{A_t}{A_0} = -k_d \times t \quad (8)$$

En la figura 16 se observa una tendencia lineal, a partir de la cual se obtiene la ecuación $\ln(A_t/A_0) = 0.04877 - 0.00766t$, con un $R_2 = 0.971$. De acuerdo con la ecuación 8, la pendiente de esta recta corresponde a la constante k_d , cuyo valor es 0.00766 min^{-1} .

En la Tabla 5 se presentan distintas peroxidosas junto con sus temperaturas de evaluación y constantes de inactivación térmica. Se observa que la PCO presenta una menor susceptibilidad a la inactivación térmica en comparación con otras especies evaluadas a la misma temperatura, como *Mimosa pudica* y *Phaseolus vulgaris*, cuyos valores de k_d ($\sim 0.019 \text{ min}^{-1}$) indican una pérdida aproximada del 1.9 % de actividad por minuto a 55 °C [73-74]. En contraste, la PCO muestra una velocidad de inactivación cercana al 0.766 % por minuto, lo que implica que las peroxidosas de las otras especies se inactivan aproximadamente 2.48 veces más rápido bajo las mismas condiciones.

Figura 16

Ensayo de inactivación térmica de peroxidasa de caléndula a 55 °C


Tabla 5

Constante de inactivación térmica de diferentes peroxidosas vegetales a 55 °C

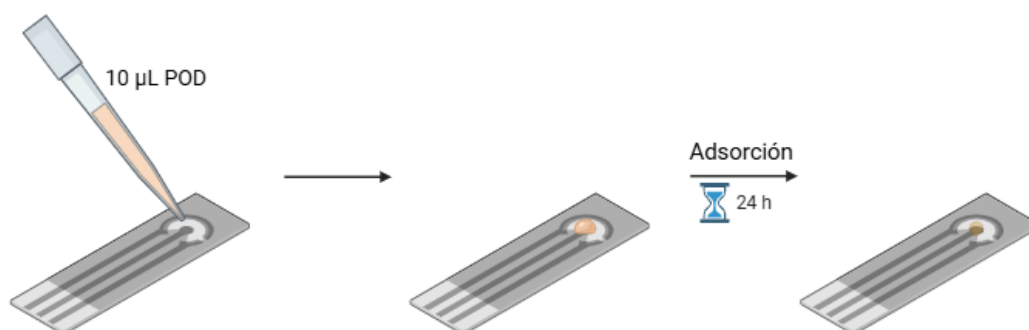
Fuente de peroxidasa	Temperatura [°C]	Constante de	Referencia
		inactivación térmica (k_d) [min ⁻¹]	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	55	0.01959	[73]
<i>Mimosa pudica</i>	55	0.018	[74]
<i>Calendula officinalis</i>	55	0.00766	Este trabajo

4.4. Caracterización electroquímica de electrodos modificados con PCO

Para evaluar la PCO como elemento bioreceptor en microbiosensores, se modificó la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de oro (Au-SPCE) mediante la deposición del extracto obtenido por separación bifásica. Posteriormente, el electrodo se dejó secar durante 24 horas en oscuridad y a temperatura ambiente (Fig. 17).

Figura 17

Procedimiento de modificación de electrodos con PCO



Nota. Gráfica creada en Biorender

Con el fin de confirmar la adsorción de la enzima sobre la superficie modificada, se realizó una medición inicial de voltamperometría cíclica (VC) en solución de PBS 100 mM pH 6 (Fig. 18). En el VC obtenido, el electrodo modificado con PCO presenta un par de picos en 222.1/−114.7 mV, lo que evidencia la presencia de especies electroactivas asociadas a la superficie modificada. Este comportamiento puede atribuirse al proceso redox del par Fe(III)/Fe(II) del grupo hemo de la peroxidasa, donde el pico catódico correspondería a la oxidación de Fe(III) a Fe(II) y el pico anódico a su posterior reducción [75]. Estos valores son consistentes con los reportados para otras peroxidasas de origen vegetal, como la peroxidasa de *Cymbopogon citratus* (500/−200 mV) [17], lo que sugiere una contribución del centro hemo a la respuesta electroquímica observada.

Un proceso electroquímicamente reversible se caracteriza por la existencia de una barrera termodinámica baja para la transferencia de electrones, después de cualquier cambio de potencial aplicado el equilibrio de Nernst se establece, en estos procesos ΔE_p es de 57 mV. En el caso de la PCO, se obtuvo un ΔE_p de 336.8 mV (Tabla 6), lo que indica un comportamiento cuasireversible [47,76]. Esto significa que este proceso está determinado tanto por la transferencia de masa, como por la cinética de transferencia de carga.

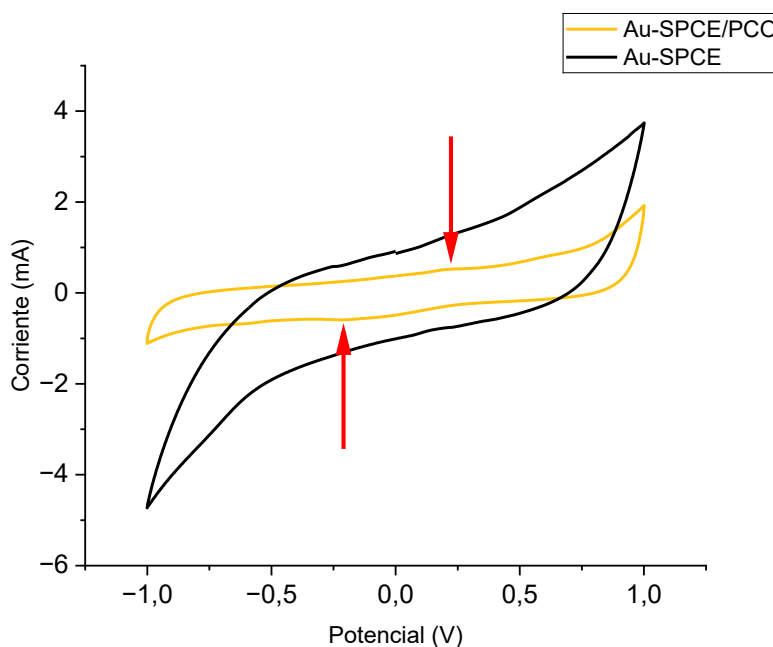
Tabla 6

Valores de corriente y potencial de los picos anódicos y catódicos de voltamperometría cíclica en PBS 100 mM pH 6

Sistema	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	I_{pc} [μ A]	I_{pa} [μ A]	ΔE_p [mV]	I_{pc}/I_{pa}
Au-SPCE/PCO	222.1	-114.7	-55.5	52.24	336.8	1.06

Figura 18

Voltamperograma cíclico medido en solución buffer PBS 100 mM pH 6 medido a 100 mV/s



4.4.1. Caracterización de electrodos con ferricianuro de potasio

El ferricianuro de potasio es un compuesto que presenta un comportamiento redox bien establecido, por lo que se emplea comúnmente como estándar para la caracterización de electrodos [77]. Se realizaron mediciones mediante VC utilizando una solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM en KCl 0.1 M como electrolito de soporte, tanto en un electrodo de control como en un electrodo modificado (Fig. 19). Este procedimiento permitió evaluar el efecto de la PCO inmovilizada sobre las propiedades de transferencia electrónica del electrodo.

Figura 19

Voltamperograma cíclico en solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM 0.1 M KCl medido a 50 mV/s

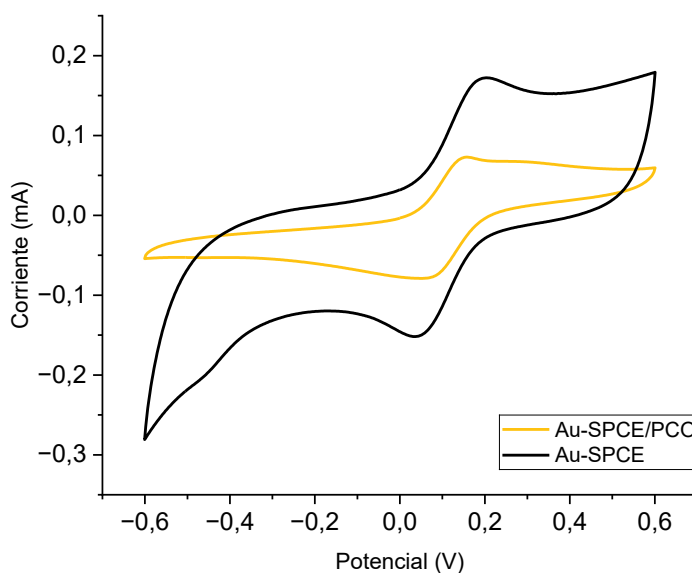


Tabla 7

Valores de corriente y potencial de picos catódicos y anódicos de voltamperograma cíclico en solución $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM 0.1 M KCl

Sistema	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	I_{pc} [μ A]	I_{pa} [μ A]	ΔE_p [mV]	I_{pc}/I_{pa}
Au-SPCE	197.75	41.5	-151.5	171.96	156.25	0.88
Au-SPCE/PCO	151.3	83	75.5	72.58	68.3	1.04

La Tabla 7 muestra una disminución de ΔE_p en el electrodo modificado con PCO en comparación con el electrodo de control. Este resultado sugiere una mejora en la cinética de transferencia electrónica, evidenciando un comportamiento más cercano al de un sistema reversible. Asimismo, la relación de corrientes de pico catódica y anódica (I_{pc}/I_{pa}) cercana a la unidad respalda esta interpretación, indicando un proceso redox más simétrico y eficiente en la superficie del electrodo [77]. Este comportamiento también ha sido reportado en otras peroxidases caracterizadas en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$, como la peroxidasa de *Panicum maximum* y *Mimosa pudica* [19,74], donde se observa igualmente una disminución de ΔE_p y valores de I_{pc}/I_{pa} próximos a 1.

A su vez, en la Figura 19 se evidencia que el VC del electrodo de control presenta picos de corriente de mayor magnitud en comparación con el electrodo modificado. Este comportamiento puede atribuirse, entre otros factores, a diferencias en el área electroactiva. De acuerdo con la ecuación de Randles–Ševčík (Ec. 9), la corriente pico es directamente proporcional al área electroactiva del electrodo. En este sentido, la modificación con PCO podría generar una capa sobre la superficie que disminuya el área disponible para la reacción electroquímica, lo que se traduce en una reducción de la corriente observada [47].

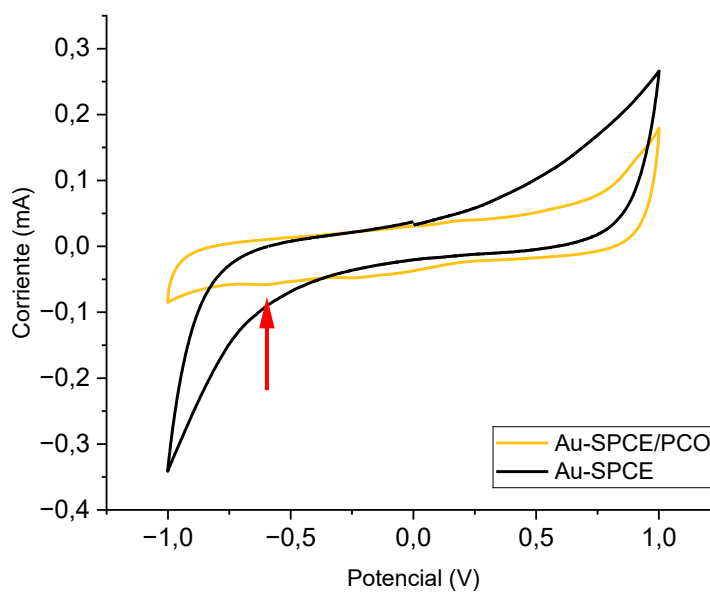
$$I_p = 0.446nFAC^0 \left(\frac{nFvD_o}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (9)$$

4.4.2. Evaluación de los electrodos con H_2O_2

Se realizó una medición inicial para evaluar el efecto de la PCO en el VC de H_2O_2 (Fig. 20). Se observó una señal alrededor de -0.55 V, atribuida a la reducción de H_2O_2 mediada por la actividad catalítica de la PCO [78], de acuerdo con los mecanismos descritos en las ecuaciones 1-3. Valores de potencial de reducción en el intervalo de -0.6 a -0.5 V han sido reportados para otras peroxidases [17,19], lo que respalda la asignación de esta señal a la transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo.

Figura 20

Voltamperograma cíclico de solución H_2O_2 0.1 mM en PBS 100 mM pH medida a 100 mV/s en Au-SPCE/PCO y Au-SPCE

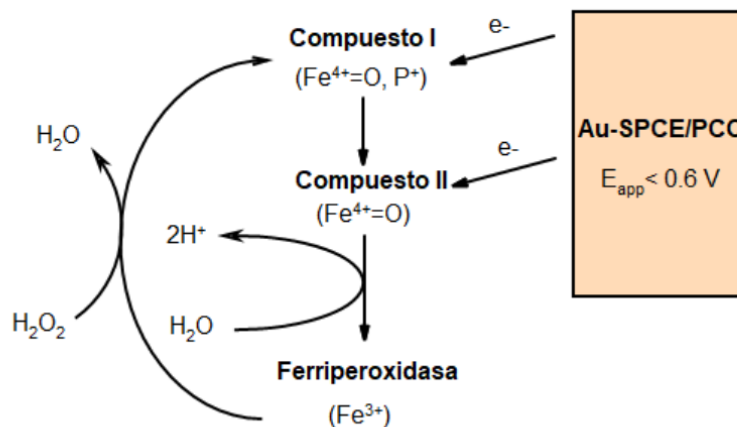


Este proceso puede visualizarse en el electrodo, como se ilustra en la Figura 21. A potenciales aplicados inferiores a 0.6 V vs SCE, se observa una relación proporcional entre la señal de reducción y la concentración de analito. Este comportamiento se debe a la reducción

electroquímica del H_2O_2 , la cual ocurre a potenciales cercanos a los potenciales formales de los pares redox Compuesto I/II y Compuesto II/ $\text{PCO}(\text{Fe}^{3+})$ [79].

Figura 21

Mecanismo de la reducción bioelectrocatalítica del H_2O_2 en electrodo modificado con PCO.



Nota. Adaptado de [79]

Dado que la concentración de H_2O_2 es proporcional a la intensidad del pico de corriente catódica, se llevaron a cabo mediciones en soluciones con concentraciones comprendidas entre 0.1 y 1 mM, empleando electrodos modificados con PCO.

Los VCs obtenidos se muestran en la Figura 22. A partir de la corriente correspondiente al pico catódico de cada voltamperograma, se construyó la curva de calibración presentada en la Figura 23. Se evidencia una buena relación lineal definida por la ecuación $I_{p\text{H}_2\text{O}_2} = -0.05651 - 0.446[\text{H}_2\text{O}_2]$ con un $R^2 = 0.9793$. No obstante, es importante señalar que la VC no constituye el método óptimo para la cuantificación analítica de este analito, sino que está pensada para el estudio del comportamiento redox y la caracterización de los procesos de transferencia de electrones en la interfaz electrodo-solución.

La cronoamperometría es una mejor alternativa para la detección cuantitativa de H_2O_2 , particularmente en matrices biológicas complejas, en las cuales coexisten especies electroactivas como el ácido ascórbico, ácido úrico y dopamina, cuyos procesos de oxidación/reducción pueden suceder en potenciales similares al H_2O_2 , esto compromete la selectividad del biosensor al usar métodos como VC donde se da un barrido de potencial [83]. La cronoamperometría trabaja en un potencial fijo y constante, esto elimina la corriente capacitiva y reduce significativamente la señal de fondo, mejorando así la relación/ruido y el límite de detección del sistema [84]. La implementación de la cronoamperometría como etapa de cuantificación definitiva quedó fuera del alcance de este trabajo debido a limitaciones de tiempo e inconvenientes técnicos con el software del potenciostato.

Figura 22

Voltamperogramas cíclicos medidos de H_2O_2 (0.1-2 mM) en solución PBS 100 mM pH medido a 100 mV/s en electrodos modificados con PCO

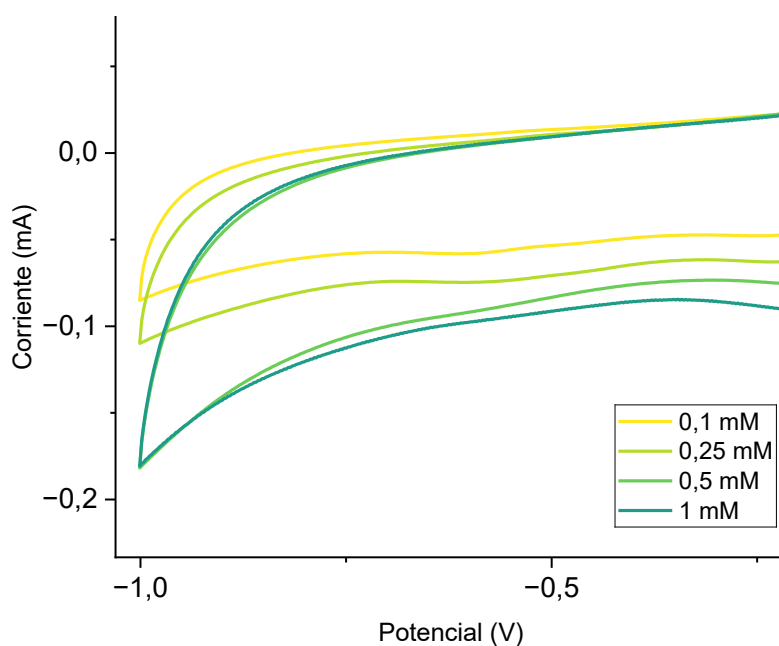
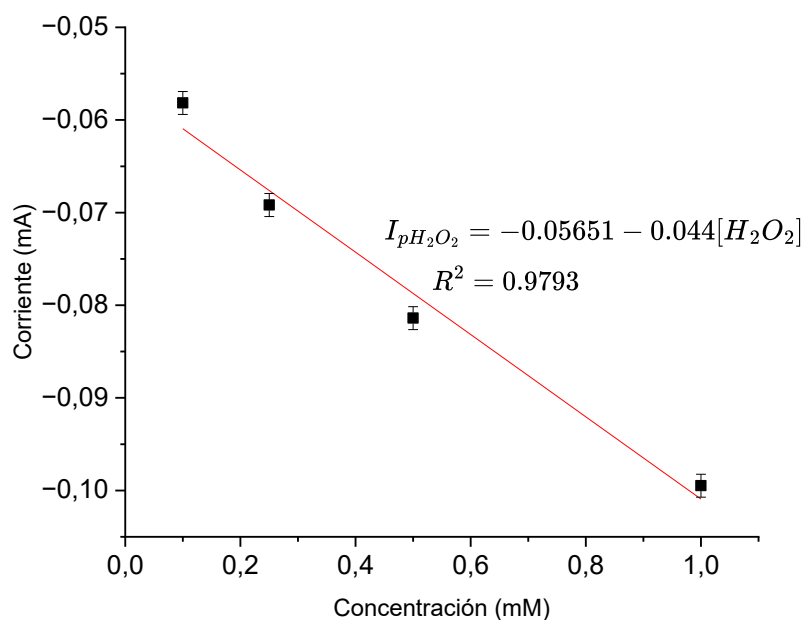


Figura 23

Curva de calibración para H_2O_2 (0.1-1 mM)



4.4.3. Efecto de la velocidad de barrido

Se registraron VCs del electrodo modificado con PCO en una solución de peróxido de hidrógeno 0.1 mM en PBS 100 mM pH 6, variando la velocidad de barrido. Como se observa en la Figura 24, al incrementar este parámetro, los picos catódicos se desplazan hacia potenciales más negativos, mientras que los picos anódicos lo hacen hacia potenciales más positivos. Además, se evidencia un aumento de ΔE_p con el incremento de la velocidad de barrido (Tabla 8).

Este comportamiento indica que, a bajas velocidades de barrido, el sistema presenta una respuesta más cercana a un sistema reversible, debido a que existe suficiente tiempo para que ocurra la transferencia electrónica. Al aumentar la velocidad de barrido, se manifiestan limitaciones en la cinética de transferencia electrónica, lo que se traduce en un incremento de ΔE_p .

y en un alejamiento del comportamiento reversible. En conjunto, estos resultados son característicos de un sistema electroquímico cuasireversible [51,81].

Se graficó I_p en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$), con el objetivo de evaluar la naturaleza del proceso redox, de acuerdo con la ecuación de ecuación de Randles–Ševčík (Ec. 9). De las regresiones lineales se obtuvieron dos ecuaciones $I_{pa} = 1.69 + 330.28v^{1/2}$ con $R^2=0.984$ y, $I_{pc} = 90.69 - 286.16v^{1/2}$ con $R^2= 0.884$, se observa un alto valor de R^2 , lo cual indica que el proceso está controlado por difusión, esto debido a la formación de una capa de difusión en la superficie del electrodo. A menores velocidades de barrido el sistema dispone de mayor tiempo para el transporte de masa, lo que da lugar a una capa de difusión más extensa y, en consecuencia, un menor flujo de especies hacia el electrodo [82,83].

Figura 24

Voltamperogramas cíclicos de electrodo modificado con PCO en H_2O_2 0.1 mM en PBS 100 mM pH 6 a diferentes velocidades de barrido (50–450 $mV \cdot s^{-1}$)

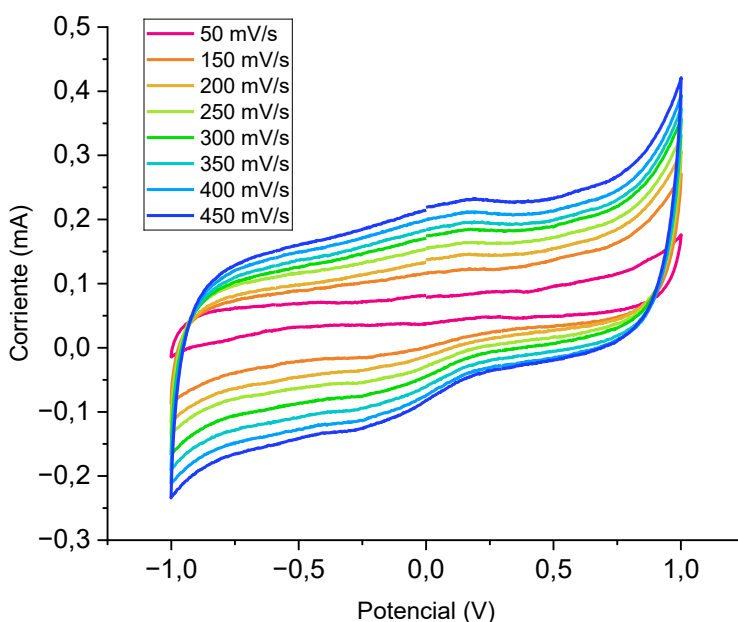
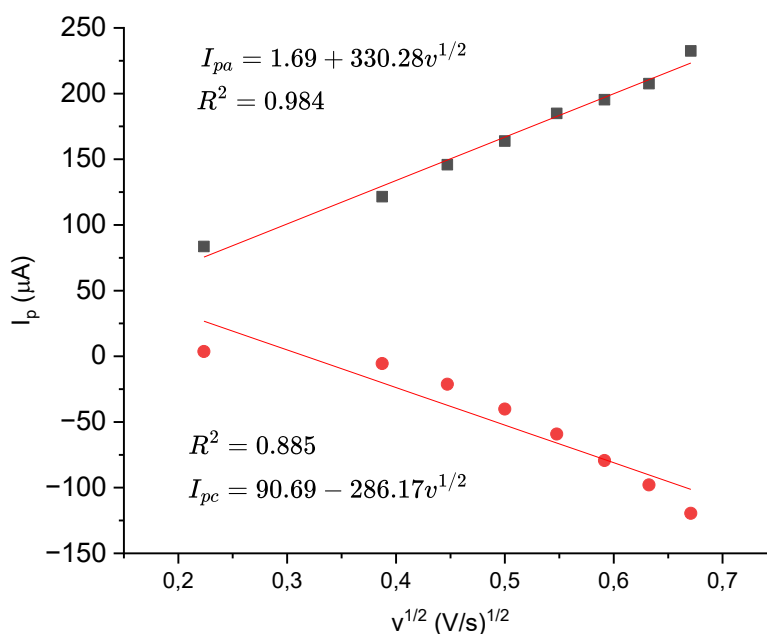


Figura 25

Gráfica de Randles–Sevcik (I_p vs. $v^{1/2}$) en solución de 0.1 mM H_2O_2 en PBS 100 mM pH 6


Tabla 8

Valores de corriente y potencial de los picos anódicos y catódicos de voltamperogramas cíclicos con variación de velocidad de barrido

Velocidad de barrido [mV/s]	E_{pa} [mV]	E_{pc} [mV]	I_{pa} [μ A]	I_{pc} [μ A]	ΔE_p [mV]	I_{pc}/I_{pa}
50	175.7	-24,4	83.6	3,66	200,1	0.043
150	151.36	-73,2	121.46	-5,49	224,56	0.045
200	148.9	-70,8	145.8	-21,3	219,7	0.15
250	161.1	-80,5	163.8	-40,2	241,6	0.25
300	180.6	-92,7	184.9	-59,2	273,3	0.32
350	187.9	-119,6	195.3	-79,3	307,5	0.41
400	187.9	-136,7	207.5	-97,9	324,6	0.47
450	195.3	-205	232.5	-119,6	400,3	0.51

5. Conclusiones

Se llevó a cabo de manera satisfactoria la extracción y semipurificación de la PCO, alcanzando un factor de rendimiento del 276 % tras las etapas de centrifugación y separación bifásica en un sistema PEG/(NH₄)₂SO₄, obteniendo una actividad específica de 0.209 U/mg. El estudio de sus propiedades bioquímicas evidenció que la PCO presenta estabilidad en un rango de pH entre 5 y 7, con un pH óptimo de 6. Adicionalmente, mostró una adecuada estabilidad térmica entre 40 y 65 °C, una temperatura óptima de actividad de 55 °C y una constante de inactivación térmica de 0.00766 min⁻¹.

La modificación de los electrodos serigrafiados con nanopartículas de oro mediante la inmovilización de la PCO para su caracterización electroquímica se llevó a cabo exitosamente. La caracterización electroquímica empleando ferricianuro de potasio evidenció una mejora en la reversibilidad del sistema, lo que sugiere una mejora en la transferencia electrónica tras la modificación del electrodo.

La evaluación de la respuesta del electrodo modificado en soluciones de peróxido de hidrógeno mostró una señal de reducción a un potencial de -0.55 V. Se obtuvo además una curva de calibración en el rango de 0.1 a 1 mM con un R² de 0.9793, indicando una adecuada respuesta analítica. Con estos resultados se puede decir que la PCO presenta potencial prometedor para la modificación de biosensores enzimáticos destinados a la detección de peróxido de hidrógeno, especialmente en condiciones cercanas a pH neutro y en un rango amplio de temperatura.

6. Recomendaciones

- Optimizar e incorporar nuevas etapas en el proceso de semipurificación con el fin de incrementar el factor de purificación y la actividad específica del extracto de PCO.
- Determinar los parámetros cinéticos principales ($V_{\max}$, K_m , K_{cat}) del extracto de PCO con guayacol como sustrato.
- Implementar la cronoamperometría como técnica de cuantificación para obtener una curva de calibración con mayor sensibilidad.
- Evaluar la selectividad del biosensor mediante ensayos cronoamperométricos en presencia de posibles agentes interferentes presentes en muestras biológicas, como el ácido ascórbico, el ácido úrico y la dopamina.
- Determinar las figuras de mérito analíticas del biosensor, incluyendo el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), tanto para la VC como para la cronoamperometría.

Referencias Bibliográficas

- [1] Sankar, K.; Kuzmanović, U.; Schaus, S. E.; Galagan, J. E.; Grinstaff, M. W. Strategy, Design, and fabrication of Electrochemical Biosensors: a tutorial. *ACS Sensors* 2024, 9 (5), 2254–2274. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c00043>.
- [2] Schachinger, F.; Chang, H.; Scheiblbrandner, S.; Ludwig, R. Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes. *Molecules* 2021, 26 (15), 4525. <https://doi.org/10.3390/molecules26154525>.
- [3] Mathé, C.; Barre, A.; Jourda, C.; Christophe Dunand. Evolution and Expression of Class III Peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010, 500 (1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.007>.
- [4] Martins, M. V. A. Direct and Mediated Electron Transfer in Enzyme Electrodes. *Advances in Bioelectrochemistry Volume 1* 2022, 25–34. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94988-4_2.
- [5] Sakharov, I.; Bautista Ardila, G.; Sakharova, I. V. PEROXIDASA de PLANTAS TROPICALES. *Revista Colombiana de Química* 1999, 28 (1), 97–106.
- [6] Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, 53(2–3), 253–263. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01677-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01677-5)
- [7] Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6(01).
- [8] Newman, J. D., & Turner, A. P. (2007). Historical perspective of biosensor and biochip development. *Handbook of Biosensors and Biochips*, Wiley-Interscience.

- [9] Kilic, N. M.; Singh, S.; Keles, G.; Cinti, S.; Kurbanoglu, S.; Odaci, D. Novel Approaches to Enzyme-Based Electrochemical Nanobiosensors. *Biosensors* 2023, 13 (6), 622.
<https://doi.org/10.3390/bios13060622>.
- [10] Das, P.; Das, M.; Chinnadayala, S. R.; Singha, I. M.; Goswami, P. Recent Advances on Developing 3rd Generation Enzyme Electrode for Biosensor Applications. *Biosensors and Bioelectronics* 2016, 79, 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.055>.
- [11] Zhang, Y., He, P., & Hu, N. (2004). Horseradish peroxidase immobilized in TiO₂ nanoparticle films on pyrolytic graphite electrodes: direct electrochemistry and bioelectrocatalysis. *Electrochimica Acta*, 49(12), 1981–1988.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2003.12.028>
- [12] Ruzgas, T., Emnéus, J., Gorton, L., & Marko-Varga, G. (1995). The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 311(3), 245–253. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00047-4](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00047-4)
- [13] Vreeke, M. S., Yong, K. T., & Heller, A. (1995). A thermostable hydrogen peroxide sensor based on "wiring" of soybean peroxidase. *Analytical chemistry*, 67(23), 4247-4249.
- [14] Shi, L., Liu, X., Niu, W., Li, H., Han, S., Chen, J., & Xu, G. (2008). Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of soybean peroxidase immobilized on single-walled carbon nanohorn modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1159–1163.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.001>
- [15] Dutta, M., Basumatary, G., & Puzari, P. (2026). Highly sensitive electrochemical biosensor for detection of hydrogen peroxide in milk using horseradish peroxidase immobilized on a functionalized MWCNT/Coconut shell composite electrode. *Electrocatalysis*.
<https://doi.org/10.1007/s12678-026-01015-2>

- [16] Bhapkar, S., Choudhari, U., Jadhav, U., & Jagtap, S. (2023). Evaluation of soybean peroxidase - Copper phosphate mediated organic-inorganic hybrid for hydrogen peroxide biosensor application. *Sensors International*, 4, 100242.
<https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100242>
- [17] Rodriguez, E., Correa, S., Cano, H., & Castillo, J. J. (2025). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) peroxidase-modified screen-printed graphene electrodes for electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 34(2), 490–501.
<https://doi.org/10.1007/s13562-024-00950-9>
- [18] Vega, M. Á., & Castillo, J. J. (2024). Sweet potato peel peroxidase-modified graphene oxide electrodes for detection of hydrogen peroxide via electrochemical sensing. *Revista ION*, 37(3).
<https://doi.org/10.18273/revion.v37n3-2024004>
- [19] 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>
- [20] Villamizar, E. N., Ríos, C. A., & Castillo, J. J. (2016). A hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of the highly stable royal palm tree peroxidase (*Roystonea regia*) with chitosan and glutaraldehyde on screen-printed graphene electrodes. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 60(3), 135-140.
- [21] Mathews, C. K., Anthony-Cahill, S. J., Appling, D. R., Holde van, K.(2013). *Bioquímica*. Pearson Educación.
- [22] Harvey, R. A. (2011). *Bioquímica*.
- [23] Powar C, Chatwal G. *Biochemistry*. Mumbai: Global Media; 2007.

- [24] Battaner Arias, E. (2013). Compendio de enzimología. Ediciones Universidad de Salamanca. <https://www.digitaliapublishing.com/a/48625>
- [25] Ahmed Mansour, M. (Ed.). (2021). Oxidoreductase. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87536>
- [26] O'Brien, P. J. (2000). Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*, 129(1–2), 113–139. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00201-5)
- [27] de Oliveira, F. K.; Santos, L. O.; Buffon, J. G. Mechanism of Action, Sources, and Application of Peroxidases. *Food Research International* 2021, 143, 110266. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>
- [28] Peroxibase: The Peroxidase Database [Internet]. [consultado abril 2026]. Disponible en: <http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>
- [29] Torres, E., & Ayala, M. (Eds.). (2010). *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12627-7>
- [30] Pomar, F. Caracterización de la actividad peroxidasa implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción: *Capsicum annuum* L. var *annuum*-*Verticillium dahliae* Kleb. 2000
- [31] Neumann, B.; Wollenberger, U. Electrochemical Biosensors Employing Natural and Artificial Heme Peroxidases on Semiconductors. *Sensors* 2020, 20 (13), 3692. <https://doi.org/10.3390/s20133692>.
- [32] Hewson WD;Hager LP. Oxidation of Horseradish Peroxidase Compound II to Compound I. *The Journal of biological chemistry* 1979, 254 (9).
- [33] Punekar, N. S. (2018). *Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms*. Springer.
- [35] Kemper, K. J. (1999). *Calendula (Calendula officinalis)*. Longwood Herbal Task Force, 1.

- [36] Sánchez, M. S., et al. (2007). El cultivo de la Caléndula (*Calendula officinalis* L.). Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8696>
- [37] Pundir, C. S., Deswal, R., & Narwal, V. (2017). Quantitative analysis of hydrogen peroxide with special emphasis on biosensors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(3), 313–329. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1878-8>
- [38] Meier, J., Hofferber, E. M., Stapleton, J. A., & Iverson, N. M. (2019). Hydrogen peroxide sensors for biomedical applications. *Chemosensors*, 7(4), 64. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7040064>
- [39] Giaretta, J. E., Duan, H., Oveissi, F., Farajikhah, S., Dehghani, F., & Naficy, S. (2022). Flexible sensors for hydrogen peroxide Detection: A critical review. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(18), 20491–20505. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c24727>
- [40] Gonçalves, C., Santos, M. a. D., Fornaro, A., & Pedrotti, J. J. (2010). Hydrogen peroxide in the rainwater of Sao Paulo megacity: measurements and controlling factors. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(2), 331–339. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532010000200020>
- [41] Sadowska-Bartos, I., & Bartosz, G. (2025). Hydrogen peroxide: a ubiquitous component of beverages and food. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(7), 3397. <https://doi.org/10.3390/ijms26073397>
- [42] Larmat González, F. (2022). Sensores electroquímicos: Teoría y aplicaciones. Universidad del Valle.
- [43] Malik, S., Singh, J., Goyat, R., Saharan, Y., Chaudhry, V., Umar, A., Ibrahim, A. A., Akbar, S., Ameen, S., & Baskoutas, S. (2023). Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review. *Heliyon*, 9(9), e19929. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19929>

- [44] Cooper, Jonathan M. Cass, Anthony E.G.. (2003). Biosensors - A Practical Approach (2nd Edition). Oxford University Press. Retrieved from <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBAPAE001/biosensors-practical/biosensors-practical>
- [45] Jubete, E., Loaiza, O. A., Ochoteco, E., Pomposo, J. A., Grande, H., & Rodríguez, J. (2009). Nanotechnology: a tool for improved performance on electrochemical Screen-Printed (Bio)Sensors. *Journal of Sensors*, 2009(1). <https://doi.org/10.1155/2009/842575>
- [46] Skoog, D. A.; F James Holler; Crouch, S. R. *Principios de Análisis Instrumental*; Cengage Learning: México, 2018.
- [47] Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 95(2), 197-206.
- [48] Flores, E. B. Voltametría Cíclica: La Espectroscopía Electroquímica. Parte I. *Revista de Química* 1995, 9 (2), 165–172.
- [49] Liu, J., Xu, Y., Liu, S., Yu, S., Yu, Z., & Low, S. S. (2022). Application and progress of chemometrics in voltammetric biosensing. *Biosensors*, 12(7), 494. <https://doi.org/10.3390/bios12070494>
- [50] Bogdan, M., Brugger, D., Rosenstiel, W., & Speiser, B. (2014). Estimation of diffusion coefficients from voltammetric signals by support vector and gaussian process regression. *Journal of Cheminformatics*, 6(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-30>
- [52] Butnariu, M., & Coradini, C. Z. (2012). Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chemistry central journal*, 6(1), 35.
- [53] Jiang, S., & Penner, M. H. (2015). Selective oxidation of enzyme extracts for improved quantification of peroxidase activity. *Analytical biochemistry*, 476, 20-25.

- [54] Du M, Hou Z, Liu L, Xuan Y, Chen X, Fan L, Li Z and Xu B (2022) Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10:1028691. doi: 10.3389/fbioe.2022.1028691
- [55] Jiang, B., Yuan, Y., Zhang, X., Feng, Z., & Liu, C. (2017). Separation and Enrichment of Lectin from Zihua Snap-Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seeds by PEG 600–Ammonium Sulfate Aqueous Two-Phase System. *Molecules*, 22(10), 1596.
<https://doi.org/10.3390/molecules22101596>
- [56] 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>
- [57] Thermo Fisher Scientific. (2024). Pierce BCA Protein Assay Kit user guide (Pub. No. MAN0011430).https://assets.fishersci.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- [58] Saikia, S., Gogoi, R. D., Yadav, M., & Yadav, H. S. (2022). Isolation, purification and characterization of peroxidase from *Raphanus sativus* and its applications in biotransformation of cresols. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 46, 102540.
- [59] Vishwasrao, C., Chakraborty, S., & Ananthanarayan, L. (2017). Partial purification, characterisation and thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase isolated from Kalipatti sapota (*Manilkara zapota*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3568-3575.

- [60] Tao, Y., Wang, S., Luo, H., & Yan, W. (2018). Peroxidase from jackfruit: Purification, characterization and thermal inactivation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 898–905. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.007>
- [61] Zeyadi, M., & Almulaiky, Y. Q. (2020). A novel peroxidase from Ziziphus jujuba fruit: purification, thermodynamics and biochemical characterization properties. *Scientific Reports*, 10(1), 8007. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64599-9>
- [62] Fritzke, W., Salla, E. G., Bagatini, M. D., Da Silva Rosa Bonadiman, B., Skoronski, E., Moroni, L. S., & Kempka, A. P. (2020). Peroxidase of Cedrela fissilis leaves: Biochemical characterization and toxicity of enzymatically decolored solution of textile dye Brilliant Sky-Blue G. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101553. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101553>
- [63] Almulaiky, Y. Q., & Almulaiky, Y. Q. (2020). Peroxidase from Coleus Forskohlii: Purification and Biochemical Characterization. *International Journal of Nutrition*, 5(1), 9–20. <https://doi.org/10.14302/issn.2379-7835.ijn-19-3139>
- [64] Adedugbe, O. F., & Ilesanmi, O. S. (2024). Biochemical Properties of Purified Peroxidase from Rhizome of Turmeric (Curcuma longa L.). *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4635991/v1>
- [65] Ilesanmi, O. S., & Adedugbe, O. F. (2023). Novel peroxidase from bitter leaf (Vernonia amygdalina): purification, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 49, 102662.
- [66] Lavery, C. B., MacInnis, M. C., MacDonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., Irwin, D. J. G., & D’Cunha, G. B. (2010). Purification of Peroxidase from Horseradish

(*Armoracia rusticana*) Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8471–8476.

<https://doi.org/10.1021/jf100786h>

[67] Shariat, S. Z., & Aghelan, Z. (2015). Partial purification and biochemical characterization of peroxidase from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Advanced Biomedical Research*, 4(1), 159. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.161586>

[68] Altay, A., Koktepe, T., Durmaz, L., Topal, F., Gülçin, İ., & Köksal, E. (2018). Purification and selected biochemical properties of peroxidase from cress (*Lepidium sativum* sub sp. *sativum*). *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2610–2621.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1540989>

[69] El-Khonezy, M. I., Abd-Elaziz, A. M., Dondeti, M. F., Fahmy, A. S., & Mohamed, S. A. (2020). Purification and characterization of cationic peroxidase from ginger (*Zingiber officinale*). *Bulletin of the National Research Centre/Bulletin of the National Research Center*, 44(1).

<https://doi.org/10.1186/s42269-019-0264-x>

[70] Kalsoom, U., Bhatti, H. N., & Asgher, M. (2015). Characterization of Plant Peroxidases and Their Potential for Degradation of Dyes: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6), 1529–1550. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1674-3>

[71] Eğilmez, H. İ., & Haspolat, E. (2024). Temperature-Dependent Parameters in Enzyme Kinetics: Impacts on Enzyme Denaturation. *Fundamental Journal of Mathematics and Applications*, 7(4), 226–235. <https://doi.org/10.33401/fujma.1517334>

[72] Rudra, S. G., Shivhare, U. S., Basu, S., & Sarkar, B. C. (2007). Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase in Coriander Leaves. *Food and Bioprocess Technology*, 1(2), 187–195.

<https://doi.org/10.1007/s11947-007-0013-2>

- [73] Yemenicioğlu, A., Özkan, M., Velioğlu, S., & Cemeroğlu, B. (1998). Thermal inactivation kinetics of peroxidase and lipoxygenase from fresh pinto beans (*Phaseolus vulgaris*). *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung. B, Referate Und Lebensmittelrecht*, 206(4), 294–296. <https://doi.org/10.1007/s002170050260>
- [74] Castillo, J., Blanco, J., & Cano, H. (2025). Sleepy but Active: Screen-printed Gold Nanoparticle Electrodes Modified with Sleepy Plant (*Mimosa pudica*) Peroxidase for Hydrogen Peroxide Detection. *Universitas Scientiarum*, 247-267.
- [75] Huang, R., & Hu, N. (2003). Direct voltammetry and electrochemical catalysis with horseradish peroxidase in polyacrylamide hydrogel films. *Biophysical Chemistry*, 104(1), 199–208. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00367-8](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00367-8)
- [76] Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C. A., & Sola, M. (2010). Redox properties of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.002>
- [77] Cassidy, J. F., De Carvalho, R. C., & Betts, A. J. (2023). Use of Inner/Outer Sphere Terminology in Electrochemistry—A Hexacyanoferrate II/III case study. *Electrochem*, 4(3), 313–349. <https://doi.org/10.3390/electrochem4030022>
- [78] Patra, S., & Munichandraiah, N. (2009). Electrochemical reduction of hydrogen peroxide on stainless steel. *Journal of Chemical Sciences*, 121(5), 675–683. <https://doi.org/10.1007/s12039-009-0081-0>
- [79] Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L., & Marko-Varga, G. (1996). Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta*, 330(2–3), 123–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(96\)00169-9](https://doi.org/10.1016/0003-2670(96)00169-9)

- [80] Sun, D., Cai, C., Li, X., Xing, W., & Lu, T. (2004). Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on active carbon. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 566(2), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2003.11.055>
- [81] 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>
- [82] Habekost, A. (2019). Simulation and Fitting of Cyclic Voltammetry and Chronoamperometry Curves of Electrochemical Reactions with Different Mechanisms — A Didactic Perspective. *World Journal of Chemical Education*, 7(2), 53-64.
- [83] Ren, Q., Yang, F., Ren, W., Wang, C., Jiang, W., Zhao, Z., Chen, J., Lu, X., & Yu, Y. (2020). Amperometric biosensor based on coimmobilization of multiwalled carbon nanotubes and horseradish Peroxidase-Gold nanocluster bioconjugates for detecting H₂O₂. *Journal of Nanomaterials*, 2020, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2020/9627697>
- [84] Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>

Apéndices

Apéndice A. Curva de calibración para cuantificación de proteínas.

Figura 26

Curva de calibración BCA para la determinación de concentración de proteínas

