



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**NANOZIMAS DE V_2O_5 PARA BIOSENSOR CON
APLICACIÓN VETERINARIA UTILIZANDO FLUIDO
SIMULADO DE PLASMA CANINO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

VICTORIA GUTIÉRREZ YÁÑEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.



La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Licenciatura Ingeniería en Nanotecnología

NANOZIMAS DE V_2O_5 PARA BIOSENSOR CON
APLICACIÓN VETERINARIA UTILIZANDO FLUIDO
SIMULADO DE PLASMA CANINO

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Ingeniera en Nanotecnología

Presenta:

Victoria Gutiérrez Yáñez

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

SINODALES

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa
Presidente

Firma

Dr. Alejandra Álvarez López
Secretario

Firma

Dr. Andrés Dector Espinoza
Vocal

Firma

Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2025
México



DEDICATORIA

A mi madre, con todo mi amor y gratitud. Gracias por ser mi apoyo incondicional, por escucharme en los momentos difíciles, por inspirarme con tu ejemplo y por motivarme a nunca rendirme. Todo lo que soy y lo que he logrado hasta el día de hoy ha sido gracias a tu fuerza, tu paciencia y tu amor infinito.

A mi padre, que aunque ya no esté conmigo, vive en cada uno de mis pasos y decisiones. Siempre ha sido un ejemplo de lucha, de superación y de amor por la vida. Su recuerdo me inspira a seguir adelante, a esforzarme y a alcanzar mis metas.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios, por darme la vida, la fortaleza y la sabiduría para superar cada dificultad y por acompañarme en cada paso de este camino. Sin su guía y bendiciones, nada de esto habría sido posible.

A mi madre, a quien amo con toda mi alma y corazón. Nada de esto hubiera sido posible sin tu interminable apoyo, contención y motivación. Cada día a tu lado me recuerda a la gran mujer que aspiro ser: ejemplo de constancia, resiliencia, determinación, superación, amor y luz. Estaré agradecida contigo por el resto de mi vida por ayudarme a ser la persona que soy hoy, y siempre estaré en deuda por todo lo que has sacrificado para que yo pueda perseguir mis sueños y metas.

A mi padre, que aunque la vida me lo arrebató demasiado pronto, permanece en mí como una fuente constante de inspiración. Gracias a él heredé la inteligencia que todos reconocen, y gracias a su esfuerzo, trabajo y perseverancia tuve las oportunidades que hoy me permiten estar aquí. Lo amo y lo extraño cada día de mi vida.

A mis hermanos, Mariana y Renato, quienes, aun cuando no siempre comprendan plenamente la naturaleza de mi formación profesional ni el alcance de este proyecto, han estado presentes de manera constante brindándome su apoyo incondicional. Su interés, acompañamiento y la forma en que celebran cada uno de mis logros como si fueran propios han sido un pilar fundamental a lo largo de este proceso. Los amo profundamente y agradezco infinitamente el privilegio de tenerlos como mis hermanos y como los mejores compañeros de vida que pude haber tenido.

Al Dr. Juan de Dios, por su guía y apoyo en el desarrollo de este proyecto, por las oportunidades que me brindó durante mi estancia en el laboratorio, y porque su acompañamiento trascendió lo académico: gracias por ser también guía en la vida, por escucharme y aconsejarme en momentos personales.



A la Universidad Autónoma de Querétaro, por financiar parte del proyecto mediante el Fondo para el Impulso de la Cultura Emprendedora. Al Laboratorio de Biosensores, por brindarme los recursos y el espacio necesarios para llevar a cabo esta investigación.

A Daniela Tejeda y a Valeria Pérez, amigas invaluableles en mi vida, cuyo apoyo incondicional ha sido fundamental a lo largo de este camino. Gracias por acompañarme siempre, por brindarme ánimo en los momentos más exigentes y por celebrar cada uno de mis logros con la misma emoción como si fueran propios. Su presencia, confianza y cariño me han enseñado el verdadero valor de la amistad, convirtiéndose en pilares esenciales tanto en este proyecto como en mi vida personal.

A Pedro, Alexa, Miguel, Ilse, Dafne, Hugo y Delia, por su amistad y apoyo. Finalmente, a todos los integrantes del Laboratorio de Biosensores, gracias por hacerme sentir parte de un lugar seguro dentro de la universidad, espacio y personas que siempre llevaré en mi corazón.



INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	1
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN	11
A. Planteamiento del Problema.....	13
B. Justificación.....	14
II. HIPÓTESIS.....	16
III. OBJETIVOS	17
A. General	17
B. Específicos	17
IV. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	18
A. Nanozimas.....	18
Clasificación de nanozimas.....	18
Nanozimas tipo oxidasa	18
Nanozimas tipo peroxidasa	19
Nanozimas tipo catalasa.....	19
Nanozimas tipo superóxido dismutasa.....	20



Actividad catalítica en nanozimas	20
Tamaño	20
Morfología y planos cristalográficos	21
Modificación superficial	21
Composición	22
pH y temperatura.....	22
Iones	22
B. Nanoestructuras V_2O_5	22
Morfología y planos cristalográficos	23
C. Biosensor.....	24
Clasificación	26
De acuerdo con el biorreceptor	26
Biosensores basados en enzimas.....	26
Biosensores basados en anticuerpos	27
Biosensores basados en aptámeros	27
Biosensores basados en células.....	27
De acuerdo con el transductor.....	27
Biosensores electroquímicos.....	27
Biosensores ópticos.....	27
Biosensores gravimétricos	28
Biosensores térmicos	28
Nanobiosensores	28
D. Biosensores colorimétricos	29
E. Creatinina	30



F. Biosensores colorimétricos de creatinina.....	32
G. Método enzimático para detección de creatinina	35
H. Peroxidasa de Rábano Picante	36
I. Suero Sanguíneo	37
J. Anatomía y Fisiología renal.....	39
K. Etiología ERC	39
V. METODOLOGÍA	42
A. Materiales.....	42
B. Síntesis de V_2O_5 NWs.....	42
C. Caracterización.....	43
Microscopía electrónica de transmisión (MET o TEM por sus siglas en ingles) ..	43
Microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en ingles).....	43
Espectroscopía Raman	43
D. Ensayo de actividad enzimática	43
E. Inmovilización de V_2O_5 NWs	45
F. Evaluación colorimétrica	45
G. Estudio cinético de acoplamiento proteico	46
H. Pruebas de actividad enzimática	47
En función de pH	47
En función de temperatura	48
I. Evaluación de Interferentes.....	48
J. Detección colorimétrica de creatinina.....	49
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
A. Caracterización.....	50



Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	50
Micrografía electrónica de barrido (SEM).....	50
Espectroscopía Raman	51
B. Ensayo de actividad enzimática	52
C. Evaluación colorimétrica de H_2O_2	54
D. Estudio cinético de acoplamiento proteico	59
E. Pruebas de actividad enzimática	60
En función del pH	60
En función a la temperatura	61
F. Evaluación de interferentes	62
G. Detección colorimétrica de creatinina.....	63
VII. CONCLUSIONES	70
VIII. REFERENCIAS.....	72



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro comparativo de morfologías de V_2O_5 como nanozimas (Wang et al., 2020).	24
Tabla 2. Principales biosensores colorimétricos reportados para la detección de creatinina: principios de detección, tipo de muestra, límite de detección, ventajas, desventajas y referencias.	35
Tabla 3. Causas etiológicas de ERC en perros (Melo & Barreto, 2024).	41
Tabla 4. Cantidades de reactivo utilizadas para pruebas de actividad enzimática de tipo peroxidasa	45
Tabla 5. Concentraciones utilizadas de H_2O_2 en la evaluación colorimétrica de V_2O_5NWs .	46
Tabla 6. Cantidades de reactivo utilizadas en el estudio cinético de acoplamiento proteico de V_2O_5NWs .	47
Tabla 7. Cantidades de reactivo utilizadas para la evaluación de pH	48
Tabla 8. Enzimas añadidas a cada papel correspondientes al sustrato evaluado.	48
Tabla 9. Concentraciones utilizadas para la evaluación de interferentes.	49
Tabla 10. Concentraciones de los sustratos evaluados.	49
Tabla 11. Resumen comparativo de biosensores para la detección de creatinina y desempeño del sistema propuesto con V_2O_5NWs .	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalina ortorrómbica del V_2O_5 , mostrando los iones de oxígeno (O^{2-}) en púrpura y de vanadio (V^{5+}) en gris. Recuperado de Materials Project (mp-1970) (Materials Project, 2023).....	23
Figura 2. Esquema general del funcionamiento de un biosensor, mostrando las etapas de reconocimiento molecular (analito–biorreceptor), transducción y generación de señal.....	25
Figura 3. Estructura método enzimático para la determinación de creatinina en suero sanguíneo y determinación colorimétrica con o-Dianisidina.....	36
Figura 4. Ciclo de la reacción de oxido-reducción de la peroxidasa del rábano picante (Figura recuperada de García, 2023).....	37
Figura 5. Evaluación colorimétrica de V_2O_5 NWs. Donde a mayor concentración de H_2O_2 , mayor intensidad de color sobre el papel tratado con o-dianisidina/TBAB/Nafion/ V_2O_5 NWs	46
Figura 6. Micrografías TEM de nanoestructuras de óxido de vanadio (V_2O_5) observadas a diferentes escalas (50 y 200 nm), donde se aprecia la distribución, morfología y aglomeración de las nanoestructuras.....	50
Figura 7. Micrografías SEM de nanoestructuras de V_2O_5 , donde se aprecia la morfología cristalina y la distribución superficial. (a)Aumento $\times 85$; (b)Aumento $\times 130$	51
Figura 8. Espectro Raman de V_2O_5 NWs señalando las frecuencias de los modos vibracionales.	52
Figura 9. Tiempo de reacción de V_2O_5 NWs. a) H_2O_2 0.5 mM. b) H_2O_2 100Mm.....	53
Figura 10. Relación entre la absorbancia y la concentración de H_2O_2 para la determinación de la actividad tipo peroxidasa de los V_2O_5 NWs.	54
Figura 11. a) Detección colorimétrica de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con nanozimas de V_2O_5 sin inmovilizar, mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de H_2O_2 . Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de	

H ₂ O ₂ . d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de H ₂ O ₂	57
Figura 12. a) Detección colorimétrica de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) con nanozimas de V ₂ O ₅ inmovilizadas en matriz de TBAB/Nafión mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de H ₂ O ₂ . Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de H ₂ O ₂ . d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de H ₂ O ₂	58
Figura 13. Estudio cinético de acoplamiento proteico en V ₂ O ₅ NWs, expresado como porcentaje de unión en función del tiempo de incubación.	59
Figura 14. Efecto del pH en la actividad catalítica de los V ₂ O ₅ NWs en creatinina, creatina y sarcosina.	61
Figura 15. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica de los V ₂ O ₅ NWs en creatinina, creatina y sarcosina.	62
Figura 16. Evaluación de la selectividad de V ₂ O ₅ NWs, mostrando una respuesta exclusiva hacia H ₂ O ₂ , sin variaciones significativas ante la presencia de otras biomoléculas (albúmina, ácido ascórbico, ácido úrico, glucosa y urea).	63
Figura 17. a) Detección colorimétrica de sarcosina con V ₂ O ₅ NWs, mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de sarcosina. Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de sarcosina. d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de sarcosina.	64
Figura 18. a) Detección colorimétrica de creatina con V ₂ O ₅ NWs, mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de creatina. Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor	



colorimétrico frente a niveles específicos de creatina. d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de creatina..... 66

Figura 19. a) Detección colorimétrica de creatinina con V_2O_5 NWs, mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de creatinina. Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de creatinina. d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de creatinina..... 67

RESUMEN

La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las principales causas de mortalidad en caninos, caracterizándose por generar un daño progresivo e irreversible en los riñones, lo que compromete su capacidad para eliminar desechos y exceso de líquidos en la sangre. El diagnóstico de la ERC generalmente se realiza cuando el paciente ya presenta síntomas propios de estadios avanzados de la enfermedad. En este punto, se evalúan biomarcadores como la creatinina para confirmar el diagnóstico; sin embargo, al momento de su medición, la función renal ya ha disminuido hasta en un 50% lo cual señala la necesidad de métodos rápidos, portátiles y específicos para un diagnóstico temprano. Tradicionalmente, las enzimas se han utilizado en biosensores para detectar biomarcadores de diferentes afecciones, pero estas presentan algunas limitaciones importantes, como altos costos, complejidad de preparación y desnaturalización ante cambios de pH o temperatura. En los últimos años, estas desventajas han motivado el desarrollo de nanomateriales catalíticos que emulen la actividad enzimática, dichos materiales se conocen como *nanozimas*, las cuales destacan por su bajo costo, alta estabilidad y actividad catalítica específica. En este contexto, el presente proyecto tiene como objetivo el sintetizar y evaluar nanozimas de óxido de vanadio V (V_2O_5) para la detección de creatinina en fluido simulado de plasma canino. De esta forma, se sintetizaron nanohilos (NWs) de V_2O_5 que presentaron actividad catalítica equivalente a la peroxidasa, lo cual fue evidenciado mediante ensayos de actividad enzimática variando la concentración de peróxido de hidrógeno y tiempos de reacción; a su vez, se analizaron posibles interferentes y se modularon condiciones de pH y temperatura. La detección colorimétrica se llevó a cabo mediante la reacción de las nanozimas con peróxido de hidrógeno generado durante la catálisis en presencia de o-dianisidina, obteniéndose un cambio de color proporcional a la concentración de creatinina. Los resultados permiten concluir que las nanozimas de V_2O_5 son capaces de sustituir a las peroxidasas tradicionales en biosensores de creatinina, lo cual ofrece una alternativa para el diagnóstico temprano de ERC en aplicaciones veterinarias.

Palabras clave: Nanozima, ERC, óxido de vanadio, biosensor colorimétrico, creatinina.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is one of the leading causes of mortality in dogs, characterized by progressive and irreversible kidney damage that compromises their ability to eliminate waste and excess fluids from the blood. The diagnosis of CKD is generally made when the patient already presents symptoms associated with advanced stages of the disease. At this point, biomarkers such as creatinine are evaluated to confirm the diagnosis; however, at the time of measurement, kidney function may have already declined by up to 50%, highlighting the need for rapid, portable, and specific methods for early detection. Traditionally, enzymes have been used in biosensors to detect biomarkers of various conditions, but they present important limitations, including high cost, complex preparation, and denaturation under changes in pH or temperature. In recent years, these disadvantages have motivated the development of catalytic nanomaterials that mimic enzymatic activity, known as *nanozymes*, which are distinguished by their low cost, high stability, and specific catalytic activity. In this context, the present study aimed to synthesize and evaluate vanadium oxide (V_2O_5) nanozymes for the detection of creatinine in simulated canine plasma. V_2O_5 nanowires (NWs) were synthesized, demonstrating catalytic activity equivalent to peroxidase, as evidenced by enzymatic activity assays varying hydrogen peroxide concentrations and reaction times; potential interferents were also analyzed, and pH and temperature conditions were modulated. Colorimetric detection was performed through the reaction of the nanozymes with hydrogen peroxide generated during catalysis in the presence of o-dianisidine, resulting in a color change proportional to creatinine concentration. The results indicate that V_2O_5 nanozymes can effectively replace traditional peroxidases in creatinine biosensors, providing a viable alternative for early CKD diagnosis in veterinary applications.

Key words: Nanozyme, CKD, vanadium oxide, colorimetric biosensor, creatinine.

I. INTRODUCCIÓN

La detección rápida de biomarcadores es un eje central en el diagnóstico; ya que, esta permite dar tratamientos personalizados y seguimiento de la progresión de diversas enfermedades. De esta forma, los biosensores, que se pueden definir como dispositivos analíticos que miden señales biológicas, y a su vez, están compuestos por un elemento de reconocimiento, el cual tiende a ser biológico o biomimético; y un transductor, el cual es el encargado de transformar una interacción bioquímica en una señal medible y cuantificable, la cual puede ser óptica, electroquímica o térmica (Yang *et al.*, 2024).

Actualmente el principal elemento de reconocimiento que se utilizaba eran las enzimas naturales, las cuales son macromoléculas biológicas que funcionan como biocatalizadores que facilitan una gran cantidad de reacciones biológicas que ocurren en el organismo; el uso de estas macromoléculas representa diversas ventajas, como una alta selectividad, alta especificidad, simplicidad y escalabilidad, con lo cual se logra un monitoreo rápido, preciso y continuo de analitos. Para el desarrollo de biosensores basados en enzimas, es necesario realizar una inmovilización enzimática en la superficie del electrodo, para poder asegurar que el sitio activo sea accesible para el analito y que la detección pueda ser eficiente y precisa; ya que, si se tiene una mala inmovilización se ve comprometida la estabilidad del biosensor a través del tiempo y la reproducibilidad de la detección (Alvarado *et al.*, 2021).

Aunque las enzimas presenten varias ventajas en el desarrollo de biosensores, también presentan algunas desventajas importantes, como la desnaturalización, altos costos, compleja preparación, dificultad para reciclar, la rápida pérdida de actividad enzimática debido a interacciones con la superficie del electrodo, entre otras (Alvarado *et al.*, 2021); dichas desventajas son grandes limitantes para su aplicación práctica. Con el objetivo de sobreponerse a estos obstáculos, se ha optado por el desarrollo de enzimas artificiales consideradas alternativas más estables y baratas, entre las cuales se encuentran nanomateriales con actividad catalítica tipo enzimática (Liang, 2019).

El término “nanozima” fue acuñado por primera vez por Pasquato, Scrimin y sus colaboradores en 2004 para describir la reactividad de transfosforilación de las nanopartículas (NPs) de oro funcionalizadas con triazaciclonoanano. Anteriormente, los materiales inorgánicos eran considerados biológicamente inertes; sin embargo, con el avance de las investigaciones, se ha encontrado que los nanomateriales presentan actividad que se asemeja al comportamiento de las enzimas naturales. Además, éstos exponen ventajas tales como bajo costo, compatibilidad con materiales biológicos, facilidad para su producción en masa, alta estabilidad y actividad catalíticas ajustable; ya que, dependiendo del tamaño del nanomaterial se tendrá una capacidad catalítica específica. Las nanozimas también cuentan con propiedades únicas en lo que respecta a su respuesta física hacia estímulos externos, actividades de imitación de enzimas dependientes del tamaño (forma, estructura, composición) y gran área superficial (Liang 2019; Lin, 2018). Gracias a estas ventajas son ampliamente utilizadas en el desarrollo de biosensores para el diagnóstico médico y monitoreo ambiental.

Dado a su potencial para poder catalizar reacciones bioquímicas específicas y su aplicación en biosensores, las nanozimas se han comenzado a utilizar como herramientas en la detección temprana de diversas enfermedades como el cáncer o la enfermedad renal crónica (ERC). Entre los sistemas con mayor potencial de aplicación se encuentran las nanozimas basadas en vanadio, ya que al presentar valencias múltiples se favorece las rutas redox relevantes en la catálisis tipo peroxidasa; actividad que se ha visto en nanoestructuras tipo nanocables y nanoesferas de óxido de vanadio V, arreglos que imitan rutas enzimáticas acopladas y actividades en cascada; este comportamiento permite utilizarlas en plataformas colorimétricas sensibles y tolerantes a condiciones externas como pH y temperatura (Ding et al., 2020; Li et al., 2024).

Ahora bien, en medicina veterinaria, la ERC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en caninos, afectando principalmente a pacientes geriátricos. Se caracteriza por un daño crónico e irreversible en los riñones, provocando que estos no cumplan adecuadamente sus funciones vitales, presentando así una disminución de la tasa de filtración glomerular (TGF), proceso en el cual los riñones eliminan el exceso de desechos

y líquidos en la sangre. Conforme se van dañando y eliminando las nefronas va surgiendo una sintomatología propia de la enfermedad, comenzando por la poliuria la cual es resultado del aumento de la diuresis debido a la disminución de la capacidad de concentración de la orina en el riñón; al avanzar el estadio de la enfermedad se presentan síntomas como la anorexia, vómito, diarrea, debilidad y edemas, propios del síndrome urémico. Diversos factores contribuyen al desarrollo de la ERC, entre los cuales destacan la presencia de diabetes, enfermedades cardíacas, obesidad, edad, raza, enfermedades glomerulares, enfermedades autoinmunes, anomalías congénitas, infecciones, hipertensión, entre otros (Pérez et al., 2023; Melo & Barreto, 2024).

En este contexto, se buscó desarrollar un biosensor colorimétrico para creatinina utilizando nanozimas de V_2O_5 como alternativa a los métodos de detección tradicionales; ya que el principio de medición está basado en la actividad tipo peroxidasa del material sobre sustratos cromogénicos como la o-dianisidina en presencia de H_2O_2 , generado por vías enzimáticas acopladas a la reacción del sustrato, produciendo un cambio de color proporcional a la concentración del analito.

A. Planteamiento del Problema

El diagnóstico de la ERC comienza con la identificación de los factores de riesgo, los cuales se clasifican en factores de susceptibilidad, como la edad y raza del paciente; y factores de iniciación, es decir, cuando hay presencia de dos o más enfermedades o trastornos en el paciente o la exposición a sustancias nefrotóxicas. Una vez que son identificados dichos factores es necesario evaluar biomarcadores de función renal para poder conocer la gravedad de la afección y que, a su vez, se puedan identificar los factores de progresión (hipertensión, proteinuria, etc.) y de etapa final (anemia, caquexia) (Pérez et al., 2023; Melo & Barreto, 2024). La creatinina, filtrada por los glomérulos y excretada a través de la orina en su totalidad, es considerada un biomarcador indirecto de la TFG, ya que, su concentración sérica es utilizada para poder evaluar el estadio de los riñones y simultáneamente conocer su capacidad de filtración y excreción de desechos en el

organismo. Sin embargo, este biomarcador presenta una limitación importante: cuando el médico veterinario decide evaluar este biomarcador en el diagnóstico de la enfermedad, debido a la presencia de los demás síntomas, la funcionalidad de los riñones ya ha disminuido en un 50%, razón por la cual se buscan métodos que determinen la concentración de creatinina de forma rápida, portátil y asequible para poder fungir como referente en el diagnóstico de la ERC (Melo & Barreto, 2024; Delgado et al., 2024).

Por otro lado, los biosensores basados en enzimas naturales como peroxidasas presentan limitaciones de estabilidad, dependencia de condiciones de almacenamiento y vida útil reducida, lo que compromete su reproducibilidad y aumenta los costos de producción de los mismos (Gao et al., 2024). En este contexto y frente a estas limitaciones, las nanozimas se presentan como una buena alternativa; ya que, permiten el diseño de materiales que dependiendo de su tamaño o composición presenten un amplio rango de actividad catalítica y estabilidad, estas propiedades las posicionan como herramientas viables en el diseño de dispositivos médicos para la detección de este analito (Alvarado et al., 2021).

B. Justificación

La salud y el bienestar de los animales de compañía han adquirido gran relevancia en la actualidad, al grado en el que en distintos sectores sociales se ha observado una sustitución simbólica de un hijo por una mascota (Valderrama et al., 2022). Siendo así que en diciembre de 2021 el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) publicó la primera Encuesta Nacional de Bienestar Autorreportado (ENBIARE) en la cual se estableció que en México se cuenta con un total de 80 millones de mascotas, de las cuales 43.8 millones son perros, presentes en el 69.8% de los hogares del país. Con esto se puede observar que la constante búsqueda del bienestar de las mascotas, en específico de perros, es una prioridad para más de la mitad de las familias mexicanas (Monroy, 2023).

Ahora bien, entre las principales enfermedades que afectan a los caninos se encuentran la hipoglucemia, la insuficiencia renal crónica, hipocalcemia e hipercalcemia entre otras;

razón por la cual se busca una detección temprana y eficiente de las mismas, con el fin de mejorar la salud de los pacientes y de igual forma preservar su calidad de vida mediante diagnósticos rápidos y eficientes. El principal desafío radica en el desarrollo de tecnologías de detección que sean rápidas, selectivas, accesibles, portables y eficientes, sin necesidad de llevar muestras para análisis de laboratorio. De esta forma, los biosensores se presentan como una alternativa prometedora, debido a que son dispositivos que permiten detectar y cuantificar analitos de interés biológico, traduciendo dicha señal en una respuesta que se puede interpretar con mayor facilidad, como un cambio de color o una diferencia de potencial. Entre sus principales ventajas se pueden observar su alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, facilidad de manejo, bajo costo y corto tiempo de análisis, lo cual los hace versátiles en el control de procesos eficientes ya que disminuyen los tratamientos clínicos, son fáciles de operar y transportar, en ocasiones pueden ser de multianálisis y permiten obtener resultados en tiempo real (Europe PMC, 2016). Específicamente, los biosensores colorimétricos ofrecen una detección portátil simple para la medición cuantitativa, siendo esta su mayor ventaja, ya que son sistemas que ofrecen una detección que no requiere de instrumental analítico, entregando resultados en pocos minutos los cuales pueden ser interpretados por personal no especializado; adicionalmente, esta clase de sensores representa un bajo costo operacional (Díaz & Cerda, 2015).

Asimismo, la aplicación de nanozimas de óxido de vanadio representa una propuesta para el desarrollo de biosensores más sensibles y específicos en el diagnóstico de la ERC, debido a que, el vanadio presenta múltiples estados de oxidación y diversas geometrías moleculares asociadas a la valencia del mismo, así dando lugar a distintas morfologías con potencial catalítico; se busca hacer uso de estas propiedades para la creación de un biosensor basado en nanozimas de óxido de vanadio para la detección selectiva de creatinina, y que esto a su vez sirva como un indicador confiable y accesible para el diagnóstico temprano de ERC (Ruíz, 2017).



II. HIPÓTESIS

Las nanozimas de óxido de vanadio V (V_2O_5) presentan una alta sensibilidad y estabilidad en la detección de peróxido de hidrogeno en comparación con la enzima peroxidasa de rábano picante; con lo cual es posible su aplicación en la detección de creatinina, al acoplarlas con otras enzimas, como la creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa, en el desarrollo de biosensores con potenciales aplicaciones en el ámbito veterinario.

III. OBJETIVOS

A. General

Sintetizar y evaluar nanozimas de óxido de vanadio V (V_2O_5) para aplicación en biosensores para la detección de creatinina en fluido simulado de plasma canino.

B. Específicos

- Sintetizar y caracterizar nanozimas de óxido de vanadio (V_2O_5) por técnicas fisicoquímicas (microscopía de transmisión de electrones, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía Raman).
- Evaluar las nanozimas de óxido de vanadio para la detección de peróxido de hidrógeno.
- Evaluar los posibles interferentes presentes en la detección de creatinina con nanozimas V_2O_5 .
- Inmovilizar enzimas creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa sobre papel Whatman y la evaluación de la detección de peróxido de hidrogeno utilizando soluciones amortiguadoras y fluido simulado de plasma canino.

IV. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

A. Nanozimas

El término “nanozima” puede definirse como cualquier material de escala nanométrica que logre catalizar diversas reacciones químicas que involucren sustratos enzimáticos bajo condiciones fisiológicas y que estos a su vez sigan la cinética enzimática (Zhang, Chen, & Zhao, 2022); el término fue introducido a la literatura por primera vez en 2004 por Pasquato y Scrimin para describir el carácter catalítico que presentaron nanopartículas de oro funcionalizadas con triazaciclonano (Zhang et al., 2025). Luego, en 2007, Yan y colaboradores observaron la actividad similar a la peroxidasa que presentaban nanopartículas de Fe_3O_3 ; así dando pie a su aplicación en diversos sectores que van desde el desarrollo de biosensores hasta su uso en terapia para diferentes afecciones, como el cáncer (Zhang et al., 2025).

Clasificación de nanozimas

La clasificación de este tipo de material puede depender de diversos factores, por ejemplo:

- Por su mecanismo: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas y translocasas (Zhang et al., 2025; Huang, Ren & Qu, 2019)
- Por su material: nanozimas basadas en metal (platino, oro, paladio, etc.), nanozimas basadas en óxidos o sulfuros de metales (pentóxido de vanadio, óxido de rutenio, etc.) y nanozimas basadas en carbono (nanotubos de carbono, óxido de grafeno, etc.) (Wang et al., 2020).

Nanozimas tipo oxidasa

Las enzimas tipo oxidasas están involucradas en reacciones de tipo oxidación/reducción; en 2004 Comott y colaboradores reportaron que las nanopartículas de oro catalizaban la reacción en donde la glucosa se transformaba en gluconato; reportando que estas se comportaban como la glucosa oxidasa. Este descubrimiento dio pie al estudio de nanomateriales que tuvieran la capacidad de actuar como oxidasas, destacando los nanomateriales basados en metales nobles como el cobre, oro, platino, plata e iridio. Cui et

al. Sintetizaron IrNPs de 2.5 nm que catalizaban la oxidación de 3,3,5,5-tetrametilbencidina (TMB) para poder generar el producto azul propio del colorante, lo cual abría la posibilidad de utilizar estas NPs para la detección de oxígeno disuelto. En 2014, Tremel y colaboradores demostraron que MoO_3NPs presentaban una actividad similar al sulfito oxidasa, ya que los parámetros cinéticos de las NPs estuvieron dentro del mismo orden de magnitud que los de la enzima natural (Zhang et al., 2025; Huang et al., 2019).

Nanozimas tipo peroxidasa

Las peroxidasas catalizan la reacción de oxidación de los sustratos mediante el consumo de H_2O_2 o peróxidos orgánicos, la mayoría de estas enzimas son hemoproteínas férricas que generan el H_2O_2 y especies intermedias de alta valencia, que pueden extraer electrones de los sustratos estudiados (Zhang et al., 2025). Por estas razones se ha optado por utilizar nanomateriales a base de hierro para emular la actividad de peroxidasas; ejemplo de esto es el desarrollo de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ que fungían como catalizadores de sustratos como TMB, diazoaminobenceno (DAB) y o-fenilendiamina (OPD) (Zhang et al., 2025). Sin embargo, también se ha optado por el uso de materiales basados en carbono, como en el estudio desarrollado por Qu y colaboradores en donde describen que los grupos $-\text{C}=\text{O}$ y $-\text{O}=\text{CO}-$ presentes en puntos cuánticos de grafeno, le otorgaban una actividad catalítica parecida a la de la peroxidasa al material (Huang et al., 2019). Otros materiales que han presentado este tipo de actividad catalítica son los nanomateriales basados en metales de transición, como el vanadio, zinc, molibdeno, entre otros; André y colaboradores demostraron que $\text{V}_2\text{O}_5\text{NWs}$ catalizaban la oxidación de los sustratos ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y TMB, propios de las peroxidasas (Zhang et al., 2025).

Nanozimas tipo catalasa

La catalasa cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 , este tipo de enzima cuenta con cuatro grupos hemo con hierro los cuales permiten una interacción fuerte con el sustrato. Para lograr imitar esta actividad Dan y colegas diseñaron nanoagrupaciones de oro cargadas con indocaina, presentando una alta afinidad por el H_2O_2 y una actividad similar y más alta que la catalasa (Zhang et al., 2025). Otro ejemplo son las CeO_2NPs diseñadas por Pirmohamed, ya que estas podían emular a la catalasa; sin embargo, estas eran

dependientes del estado redox y que niveles más altos de Ce^{4+} contribuirían a esta actividad (Huang et al., 2019).

Nanozimas tipo superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa cataliza la reacción de dismutación del superóxido en O_2 y H_2O_2 , sirviendo así como una defensa antioxidante en el organismo. Estas tienden a ser metaloproteinasas y se pueden clasificar de acuerdo con el plegamiento proteico que presenten. Ejemplo de estas son las $\text{Cu}(\text{OH})_2\text{NPs}$ funcionalizadas con glicina sintetizadas por Korschelt, las cuales al evaluarlas con cloruro de yodonitrotetrazolio se logró evidenciar su capacidad de descomposición del O_2^- . También se reportó por Mu y colegas que las nanoflores jerárquicas de NiO presentaban una alta eficiencia en la recolección de O_2^- y en la generación de O_2 , lo cual evidencio una buena actividad enzimática tipo superóxido dismutasa (Zhang et al., 2025).

Actividad catalítica en nanozimas

Las nanozimas presentan una actividad catalítica similar a la de las enzimas naturales, es decir, estas son capaces de incrementar la velocidad de reacción sin modificar la energía libre de Gibbs estándar del proceso (Leonardo, 2018). Sin embargo, al igual que las enzimas naturales, dicha actividad puede verse afectada por factores externos y propiedades fisicoquímicas del mismo nanomaterial (Huang et al., 2019).

Tamaño

Muchas propiedades de los nanomateriales son dependientes de su dimensión, lo cual es considerado como un efecto de tamaño (Huang et al., 2019). En general, los nanomateriales con menor tamaño presentan una mayor relación superficie/volumen, lo cual le otorga una mayor cantidad de sitios activos a la nanozima, así facilitando las interacciones con sus correspondientes sustratos (Wang et al., 2020). Por ejemplo, Yang, et al. evaluaron nanopartículas de Fe_3O_4 de 30, 150 y 300 nm, reportando que las de 30 nm presentaban la mayor actividad de tipo peroxidasa, mientras que las de 300 nm presentaban la menor actividad catalítica. De igual forma, Fan et al. evaluaron diferentes tamaños (13, 20, 30 y 50 nm) de AuNPs, en donde observaron que la actividad catalítica del material disminuía

conforme aumentaba el tamaño de este (Huang et al., 2019). Comportamientos similares se han reportado en nanozimas basadas en metal y en óxidos de metales; sin embargo, en algunos casos nanomateriales de mayor tamaño también han presentado una mejor actividad catalítica, esto se debe a la presencia de un mayor número de iones metálicos y valencias más adecuadas para el comportamiento enzimático necesario en la catálisis (Wang et al., 2020).

Morfología y planos cristalográficos

Las diferentes morfologías y planos cristalográficos de los nanomateriales presentan variaciones en las cantidades de enlaces incompletos y en la disposición atómica, lo cual influye en la selectividad y reactividad de las nanozimas (Wang et al., 2020). Se ha reportado que varios nanomateriales basados en metales, óxidos metálicos y aleaciones presentan actividades catalíticas inherentes asociadas a su morfología y a la exposición de planos cristalinos específicos; ejemplo de esto son las nanozimas de Fe_3O_4 con forma octaédrica truncada y esférica estudiadas por Pathak y colaboradores, quienes observaron que las nanopartículas octaédricas truncadas presentaban una mayor capacidad catalítica en comparación con las esféricas, esto se lo atribuyeron a la diferencia en las facetas de energía superficial de las mismas (Huang et al., 2019).

Modificación superficial

La mayoría de las reacciones tienen lugar en la superficie de la nanozima, razón por la cual recubrimientos adicionales de la superficie o modificaciones de esta generaran un ajuste en la actividad catalítica, dependiendo de los cambios en la carga superficial, la exposición de los sitios activos y el microambiente. La modificación superficial actúa de dos formas, como agente estabilizador en la síntesis del nanomaterial y proporcionando un sitio de reacción para un mayor acoplamiento de grupos funcionales, así siendo posible controlar la interacción del nanomaterial con el sustrato, lo cual regula la actividad catalítica de la nanozima (Wang et al., 2020). Por ejemplo, AuNPs modificadas con citrato presentan un comportamiento parecido a la glucosa oxidasa, mientras que las AuNPs modificadas con cisteína emulan el comportamiento de las peroxidasas (Huang et al., 2019).

Composición

La modificación de la composición estructural de las nanozimas permite ajustar la actividad catalítica, esto se logra haciendo uso de métodos de dopaje o aleación. De esta forma, la síntesis de nanocompuestos bi- o multimetálicos mejora el desempeño catalítico de la nanozima (Huang et al., 2019); una de las estrategias comúnmente utilizadas es dopar a materiales con menor actividad catalítica, como el oro o plata, con nanomateriales que presentan una mayor actividad, como el iridio, para que de esta forma se pueda mejorar las actividades enzimáticas sin necesidad de recubrimientos adicionales (Wang et al., 2020).

pH y temperatura

El pH y temperatura en el que se encuentre la nanozima puede afectar directamente la actividad catalítica de la nanozima; por ejemplo, en ambientes ácidos las AuNPs pueden presentar un comportamiento de tipo peroxidasa, mientras que en ambientes básicos o neutros estas presentan una actividad de tipo catalasa o superóxido dismutasa (Huang et al., 2019).

Iones

Se ha demostrado que los iones pueden fungir como moduladores en la regularización de las propiedades catalíticas de las nanozimas; ya que, pueden activar o inhibir la actividad de estas; por ejemplo, los iones Hg^{2+} , Pb^{2+} y Bi^{3+} pueden estimular la capacidad catalítica de las AuNPs recubiertas con citrato, esto se debe a que el citrato puede reducir a estos iones metálicos a su metal⁰ correspondiente. Y debido a la alta afinidad entre la superficie de las NPs y el metal⁰, el metal reducido puede adsorberse en la superficie de estas provocando un cambio de las propiedades superficiales, como el comportamiento tipo peroxidasa de las AuNPs (Huang et al., 2019).

B. Nanoestructuras V_2O_5

El vanadio es un metal ampliamente distribuido en la naturaleza, es un elemento químico de número atómico 23 y sus principales estados de oxidación son +2, +3, +4 y +5. El óxido de vanadio V (V_2O_5) es un óxido de transición ácido que presenta un color anaranjado con

una ligera solubilidad en agua. Este se puede disolver en hidróxido de sodio para generar soluciones incoloras. Presenta una capacidad para alternar en estados de oxidación (V^{5+}/V^{4+}) y alojar vacantes de oxígeno (V_{-O}), lo cual le permite habilitar rutas catalíticas tipo peroxidasa con alta eficiencia (Ko et al., 2022). En este óxido los iones vanadio se presentan como octaedros distorsionados, y la estructura general del óxido está constituida por bipirámides triangulares VO_5 distorsionadas, ya que se forman pirámides con cada átomo de vanadio y sus 5 vecinos más cercanos (Curia, 2010).

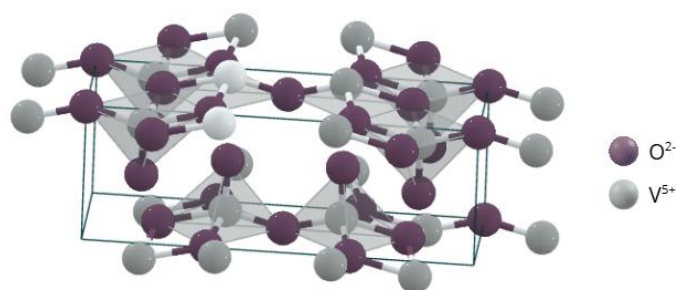


Figura 1. Estructura cristalina ortorrómbica del V_2O_5 , mostrando los iones de oxígeno (O^{2-}) en púrpura y de vanadio (V^{5+}) en gris. Recuperado de Materials Project (mp-1970) (Materials Project, 2023)

Morfología y planos cristalográficos

La actividad catalítica de las nanoestructuras basadas en óxido de vanadio (V_2O_5) está determinada por su morfología y por los planos cristalográficos expuestos durante su síntesis. Diversos estudios han demostrado que los planos (010) y (001) presentan la mayor reactividad, producto de la coordinación insaturada de los átomos de vanadio en la superficie, lo que genera sitios catalíticos altamente activos para la interacción con H_2O_2 y otros sustratos cromogénicos (Ghosh et al., 2020). En este contexto, la morfología controla qué planos quedan disponibles y su eficiencia catalítica. Los nanopalillos (VSP) exhiben la mayor actividad peroxidasa y glutatión peroxidasa, con una alta afinidad por el H_2O_2 incluso en concentraciones bajas. Los nanohilos (VNW) presentan una actividad intermedia, favorecida por su estructura unidimensional, la cual facilita el transporte de electrones, mientras que los nanosheets (VSN) y nanoflores (VFN) muestran una menor

eficiencia catalítica al necesitar concentraciones más altas de H_2O_2 para logara alcanzar la saturación (Wang et al., 2020).

Morfología de V_2O_5	Planos expuestos	Actividad catalítica	Ventajas	Limitaciones
<i>Nanohilos (VNW)</i>	(001)	Actividad intermedia en reducción de H_2O_2 y oxidación de sustratos.	Buena estabilidad, fácil síntesis, estructura 1D que facilita el transporte de electrones.	Menor actividad comparado con nanopalillos.
<i>Nanopalillos (VSP)</i>	(010) y (001)	Mayor actividad catalítica tipo peroxidasa y glutatión peroxidasa.	Alta eficiencia catalítica; mayor reactividad en planos (010); útil en condiciones de baja concentración de H_2O_2 .	Síntesis más compleja, posible agregación.
<i>Nanosheets (VSN)</i>	(010) y (001)	Actividad más baja; requieren mayor concentración de H_2O_2 para saturación.	Gran área superficial.	Baja actividad catalítica; poco sensibles en detecciones de bajas concentraciones.
<i>Nanoflores (VFN)</i>	(010) y (001) combinadas	Actividad menor que VSP y VNW.	Morfología 3D.	Baja actividad catalítica en comparación con otras morfologías.

Tabla 1. Cuadro comparativo de morfologías de V_2O_5 como nanozimas (Wang et al., 2020).

C. Biosensor

Los biosensores son dispositivos analíticos que miden señales biológicas y las convierten en señales eléctricas, ópticas o térmicas (Chadha et al., 2022). De acuerdo con la IUPAC, el término biosensor se reserva para definir un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, o biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo (IUPAC, 2019). El bioquímico estadounidense LL Clark fue el inventor del primer biosensor en 1956 para

poder detectar el porcentaje de oxígeno en la sangre; sin embargo, fue hasta el año 1977 donde se utilizó por primera vez el término biosensor por Cammann en donde lo define como un dispositivo analítico compuesto por un biorreceptor, el cual es un elemento biológico que reacciona específicamente con la molécula de interés para poder producir una señal medible, puede ser una célula, enzima, anticuerpo, ADN, entre otros; un transductor, es decir, el componente encargado de traducir la señal observada en una salida útil; y un amplificador, que como su nombre lo indica, es el encargado de amplificar y procesar la señal final (Chadha et al., 2022; Malik et al., 2023).

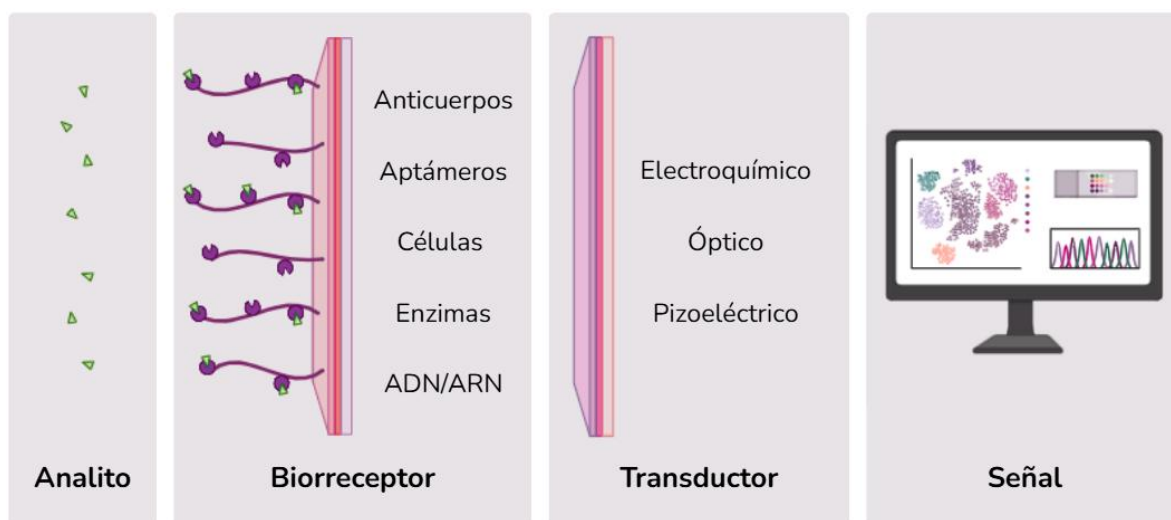


Figura 2. Esquema general del funcionamiento de un biosensor; mostrando las etapas de reconocimiento molecular (analito–biorreceptor), transducción y generación de señal.

Las principales características con las que cuentan los biosensores son su selectividad para que el dispositivo pueda detectar el analito deseado en muestras que contengan interferentes; su reproducibilidad, es decir, la capacidad que tienen para poder reproducir los mismos resultados en experimentos duplicados, lo cual a su vez les brindan una alta exactitud y precisión, así generando que el dispositivo sea fiable para su uso; otra característica de gran peso en la elaboración de biosensores es la estabilidad del mismo, es decir, que este mantenga su eficiencia sin importar el paso del tiempo o que estos no dependan de condiciones externas como la temperatura o medios de transporte (Malik et al., 2023).

Los biosensores se pueden clasificar de acuerdo con su sistema de detección, transductor, tecnología y biorreceptores. Como se mencionó, estos dispositivos destacan debido a que son herramientas analíticas con alta especificidad, alta sensibilidad y capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, además de tener la capacidad de trabajar en tiempo real y ser de bajo costo. Debido a su alto potencial de aplicación la demanda de estos ha incrementado exponencialmente, razón por la cual la nanotecnología ha logrado fungir como una herramienta de gran valor en el desarrollo de biosensores; ya que, al introducir nanomateriales se obtiene una vía prometedora para la mejora de estos dispositivos; debido al aprovechamiento de propiedades y características de los elementos en nanoescala, como su gran área superficial, entre otros (Malik et al., 2023).

Estos dispositivos cuentan con una gran gama de aplicaciones, como la gestión de residuos, la monitorización de la salud, la experimentación en el sector agrícola, ciencia forense, pruebas de control de calidad, diagnóstico de enfermedades, detección de patógenos y virales, entre otros. (Abid, 2021; Malik et al., 2023).

Clasificación

De acuerdo con el biorreceptor

Los biosensores se clasifican en catalíticos o no catalíticos; en el primero la interacción analito-biorreceptor da como resultado un nuevo producto de reacción bioquímica (biosensores basados en enzimas y células completas); mientras que en el biosensor no catalítico el analito se une al receptor de forma irreversible y durante la interacción entre ambos no se genera ningún nuevo producto de reacción (biosensores basados en anticuerpos y ácidos nucleicos) (Naresh & Lee, 2021).

Biosensores basados en enzimas

Este tipo de biosensores se basan en la reacción catalítica de las enzimas y la capacidad de unión para lograr la detección del analito. Existen diversos mecanismos para la detección de este: cuando el analito es metabolizado por la enzima, cuando la enzima es inhibida o activada por la unión con el analito, y cuando se presenta una alteración de las características de la enzima (Naresh & Lee, 2021).

Biosensores basados en anticuerpos

Los anticuerpos son elementos de biorreconocimiento con fuertes interacciones antígeno-anticuerpo. Los biosensores que cuentan con un anticuerpo integrado como ligando o que funcionan con la interacción anticuerpo-antígeno son denominados inmunosensores; los cuales se pueden subclasificar como marcados y no marcados. En donde el primero de ellos necesita de una etiqueta detectable para poder evaluar su sensibilidad; mientras que en el inmunosensor no marcado se determina específicamente el complejo antígeno-anticuerpo estimando los cambios físicos generados por el desarrollo del mismo complejo (Naresh & Lee, 2021).

Biosensores basados en aptámeros

Los aptámeros son ácidos nucleicos sintéticos que se unen selectivamente a moléculas diana y se pueden plegar en estructuras 2D o 3D, en donde los objetivos presentan un alto rendimiento de unión debido a una densidad superficial mayor y a un menor bloqueo espacial (Naresh & Lee, 2021).

Biosensores basados en células

Este tipo de biosensores hacen uso de microbios como bacterias, algas, hongos y virus; son autorreplicantes y pueden generar elementos de reconocimiento como anticuerpos sin la necesidad de realizar métodos de extracción o purificación (Naresh & Lee, 2021).

De acuerdo con el transductor

Biosensores electroquímicos

En este biosensor se presenta una reacción electroquímica en la superficie del transductor, generando señales electroquímicas detectables en términos de voltaje, corriente, impedancia y capacitancia (Naresh & Lee, 2021). Estos a su vez se clasifican en conductimétricos, potenciométricos, amperométricos e impedimétricos (Inshyna et al., 2020).

Biosensores ópticos

El principio de funcionamiento de este tipo de biosensor es la generación de señales proporcionales a la concentración del analito; en donde el proceso de transducción

propicia un cambio en la absorción, transmisión, polarización y reflexión de la luz, como respuesta a cambios físicos o químicos creados por los biorreceptores (Inshyna et al., 2020). Estos a su vez, se clasifican como biosensores basados en etiquetas o sin etiquetas; los primeros hacen referencia a cuando la señal óptica se genera haciendo uso de métodos colorimétricos de fluorescencia o luminiscencia; mientras que en los biosensores ópticos sin etiqueta la señal es producida por la interacción del analito con el transductor (Naresh & Lee, 2021).

Biosensores gravimétricos

Estos responden a cambios en la masa en el material de unión en la superficie, y hacen uso de cristales de cuarzo piezoeléctricos, para poder cuantificar la medición; algunos ejemplos de estos son los biosensores piezoeléctricos, la microbalanza de cristal de cuarzo y los magnetoelásticos (Naresh & Lee, 2021).

Biosensores térmicos

En este tipo de biosensor se mide la energía térmica absorbida o liberada durante la reacción; es decir, miden el cambio de calor, el cual es monitoreado para poder determinar el grado de reacción o la dinámica estructural de las biomoléculas (Naresh & Lee, 2021).

Nanobiosensores

El principio de funcionamiento de los nanobiosensores es simular al de los biosensores de tamaño macro y micro, teniendo como principal diferencia el uso de componentes a nanoescala, dentro de los cuales destacan las siguientes estructuras (Naresh & Lee, 2021).:

- Nanopartículas: Utilizadas en el desarrollo de biosensores para diagnóstico, imagenología y administración de fármacos.
- Puntos cuánticos: Alternativa al uso de fluoróforos en los biosensores ópticos.
- Nanocables: Crean detectores sensibles y selectivos de eventos de unión biológica, presentando características ópticas y eléctricas reproducibles.
- Nanobarras: Aplicadas como modificadores electroquímicos en procesos específicos.

- Nanotubos de carbono: Utilizados en biosensores para diagnóstico, ingeniería de tejidos, etiquetado celular y administración de fármacos.
- Dendrímeros: Morfología que otorga gran área superficial a macromoléculas tridimensionales.

D. Biosensores colorimétricos

Como se mencionó anteriormente, los biosensores pueden clasificarse dependiendo de su método de transducción de la señal medida, teniendo biosensores electroquímicos, ópticos y gravimétricos, entre otros. En particular, los biosensores ópticos analizan la señal generada en el proceso de reconocimiento, y una vez que esta pasa por el transductor, la señal se transforma en datos legibles para poder realizar una detección cuantitativa del analito. Los principales ejemplos de este tipo de dispositivos son los biosensores de fluorescencia, colorimétricos, quimioluminiscentes y los biosensores de resonancia de plasmón superficial (Yang et al., 2024; Zhu et al., 2021).

Entre estos, los biosensores colorimétricos ofrecen una serie de ventajas favorables en comparación con los demás biosensores ópticos, como la detección rápida y en tiempo real, portabilidad, rentabilidad y facilidad de uso; lo cual amplía sus posibles aplicaciones prácticas. En este tipo de biosensores, las enzimas juegan un papel sumamente importante; ya que, estas son el componente encargado de identificar el analito y transferir los electrones presentes en el sustrato, para así catalizar la reacción responsable de generar los cambios en la señal óptica. De acuerdo con lo expuesto previamente, las nanozimas han surgido como una solución a las limitantes que presentan las enzimas naturales; ya que, estas emulan su comportamiento, un ejemplo específico de esto son las nanozimas basadas en hierro, vanadio o carbono que imitan la actividad de la peroxidasa; o las nanopartículas de oro, cobre, platino o trióxido de molibdeno que emulan a la oxidasa; además de presentar este tipo de actividad, también logran oxidar los sustratos incoloros a uno coloreado, para que así se pueda realizar una detección visual. Gracias a estas características, los sensores colorimétricos se han utilizado para la detección rápida de

diversos analitos como proteínas, ADN, cationes metálicos, virus y diversas moléculas de tamaños pequeños (Yang et al., 2024; Zhu et al., 2021; Quintero et al., 2024).

La colorimetría es un método de detección bioquímica, la cual se basa en la reacción cromogénica de los compuestos coloreados. Esta técnica se divide en colorimetría visual, que depende de la percepción directa de cambios de color, aunque presenta limitaciones en precisión; y colorimetría fotoeléctrica, la cual hace uso de equipos como el colorímetro fotoeléctrico y el espectrofotómetro, los cuales presentan una mayor sensibilidad a la resolución del cambio de color de la concentración del analito (Madera et al., 2023; Rivas, 2024). El principio por el cual se basa esta técnica de detección señala que los cromóforos son componentes esenciales para uso de la misma. Los cromóforos son moléculas que se encuentran presentes en un material, estos son los encargados de absorber longitudes de onda específicas de la luz visible, lo cual le da una coloración específica al material; estos también son los responsables de los cambios de geometría o densidad electrónica una vez que el material se encontró en un proceso de excitación (Madera et al., 2023; Rivas, 2024; Bucio & Rosales, 2024).

Ahora bien, la colorimetría es una técnica que se apoya directamente en la espectrofotometría, la cual es la técnica de medición de la interacción de la luz con la materia. En particular, la espectrofotometría se encarga del análisis cuantitativo de los espectros de absorción o emisión relativa presentes a diferentes longitudes de onda, para así poder determinar las cantidades absolutas o relativas de los compuestos presentes en la muestra (Madera et al., 2023; Bucio & Rosales, 2024).

E. Creatinina

La creatinina es producto de la deshidratación interna espontánea, irreversible y no enzimática de la creatina y la desfosforilación del fosfato de creatina. Es altamente soluble en agua. La creatina y la creatinina se originan principalmente de la biosíntesis de los aminoácidos glicina, arginina y metionina, y en parte del suministro alimentario (Braun, 2003). La conversión a creatinina se produce a un ritmo casi constante y afecta

aproximadamente al 2% del total de creatina corporal al día. Una vez que llega al torrente sanguíneo, la creatinina se filtra libremente por los glomérulos y no se reabsorbe ni se secreta de manera significativa por los túbulos renales (International Renal Interest Society, s.f.). La concentración de esta molécula en plasma o suero sanguíneo se utiliza para interpretar la eliminación renal del cuerpo; cuando la función renal disminuye se produce hipercreatininemia, es decir, se presenta un aumento en la concentración de creatinina en la sangre (International Renal Interest Society, s.f.). Los niveles de creatinina se pueden ver afectados por el consumo de ciertos medicamentos o la presencia de enfermedades. Niveles anormales de creatinina pueden indicar deshidratación, infección renal, insuficiencia renal, lesión tóxica a los riñones, bloqueo urinario, shock o enfermedades cardíacas graves (Glencoe Animal Hospital and Kenne, 2019).

En este contexto, la creatinina es utilizada como un parámetro bioquímico confiable para el diagnóstico de la ERC; ya que, el valor de esta, medido en sangre o plasma sanguíneo, constituye la base para poder establecer el estadio de la enfermedad, y permiten la clasificación del grado de disfunción renal, para poder orientar el tratamiento y mejorar tanto la calidad de vida del paciente como los pronósticos de este (International Renal Interest Society, 2023).

En el *estadio 1*, los valores de creatinina se mantienen dentro de un rango normal (<1.4 mg/dL), la detección temprana en esta fase depende de otros síntomas como la proteinuria o la densidad urinaria inadecuada. En el *estadio 2*, los pacientes presentan una azotemia leve, con valores de creatinina ligeramente elevados (1.4-2.8 mg/dL). En el *estadio 3*, la azotemia es moderada y los signos clínicos propios de la enfermedad comienzan a ser evidentes, teniendo una concentración de creatinina de 2.5-5 mg/dL. Finalmente, en el *estadio 4* se presenta una azotemia grave con un mayor riesgo de signos clínicos sistémicos y crisis urémicas, con concentraciones de creatinina mayores a 5 mg/dL; comprometiendo así el pronóstico de la evolución de la enfermedad (International Renal Interest Society, 2023).

F. Biosensores colorimétricos de creatinina

El término biomarcador, también denominado marcador biológico, se refiere a signos médicos que pueden medirse de manera precisa y reproducible, a diferencia de los síntomas, que corresponden a percepciones subjetivas del paciente sobre su estado de salud o enfermedad (Strimbu, 2010). En términos más específicos, un biomarcador se ha definido como una alteración bioquímica, molecular o celular cuantificable en diferentes medios biológicos, como tejidos, células o fluidos corporales (Agnifilli, 2015). En este contexto, la creatinina es uno de los biomarcadores más utilizados en la práctica clínica para la evaluación de la función renal, principalmente en el diagnóstico y monitoreo de la ERC (International Renal Interest Society, 2023). Los biosensores colorimétricos presentan diversas ventajas debido a su simplicidad, facilidad de operación y rapidez de análisis. Su principio básico parte de la monitorización de un cambio de color correlacionado con la concentración del biomarcador de interés (Khan et al., 2023).

Tarim & Tekin (2024) desarrollaron un sistema miniaturizado con elementos calefactores integrados, el cual funciona bajo el método Jaffe en donde se genera un color amarillo anaranjado cuando la creatinina reacciona con ácido pícrico en una solución alcalina. El sistema en donde se realizaron los análisis fue fabricado con filamento negro de ácido poliláctico y elementos Peltier para mantener una temperatura constante; dichos análisis se realizaron en suero presentando un límite de detección de 0.4 mg/dL y un límite de cuantificación de 1.3 mg/dL.

Das et al. (2024) desarrollaron un biosensor basado en la pasivación superficial de nanopartículas de oro conjugadas con un aptámero específico para la creatinina, en el cual la unión selectiva de la creatinina al aptámero generaba una disminución de la actividad catalítica de las nanopartículas en la reducción del 4-nitrofenol (amarillo) a 4-aminofenol (incoloro) para generar la señal colorimétrica. El límite de detección del biosensor fue de 0.87 mM.

Karakuzu et al. (2022) desarrollaron una plataforma electromecánica tipo *lab-on-a-chip* para la detección de creatinina mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

(ELISA) colorimétrico. La plataforma estaba compuesta por un chip de microdepósitos, una barra agitadora recubierta con anticuerpos para la creatinina y un teléfono inteligente para la detección del color generado mediante los protocolos ELISA. El límite de detección que presentó la plataforma fue de 1 y 2 mg/dL en buffer de fosfato salino y suero fetal bovino respectivamente; cada medición tardaba aproximadamente 50 minutos.

Feng et al. (2020) desarrollaron un biosensor basado en nanopartículas de oro y sondas peptídicas con afinidades específicas por la creatinina, monitoreando visualmente la concentración del analito al presentarse cambios de color púrpura-rojo; con un límite de detección de 0.346 ppm.

Guan et al. (2024) construyeron un sensor de fluorescencia y colorimétrico de doble señal mediante la encapsulación in situ de puntos cuánticos de CdTe y la modificación postsintética de piridina-2-carboxaldehído (2-PC) para la detección de creatinina en sangre, presentando un límite de detección de 2.48 nM y 1.78 μ M respectivamente.

Chhillar et al. (2023) fabricaron nanocompuestos de Zn^{2+} /nanopartículas de oro para la detección colorimétrica de creatinina con un límite de detección de 2 μ g/mL.

Sivasankaran et al. (2018) desarrollaron un biosensor basado en nanopartículas de cobre estabilizadas con L-cisteína monitoreando la reducción de intensidad del plasmon superficial localizado mediante espectrofotometría UV-Visible, teniendo como límite de detección $4,54 \times 10^{-10}$ M.

Principio de detección	Tipo de muestra	Límite de detección	Ventajas	Desventajas	Referencia
<i>Método Jaffe miniaturizado con PLA negro y elementos Peltier.</i>	Suero sanguíneo	0.4 mg/dL	Portable, control térmico estable.	Interferencias químicas (glucosa, ácido ascórbico), dependencia de cámara	Tarim & Tekin (2024)

				smartphone, rango limitado	
<i>AuNPs</i> + <i>aptámero.</i>	Orina	0.87 mM	Detección a simple vista, rápida, buena selectividad	Aptámeros poco estables, sensible a pH y iones.	Das et al. (2024)
<i>Plataforma lab-on-a-chip con ELISA colorimétrico; chip de microdepósitos + barra con anticuerpos.</i>	PBS y suero fetal bovino	1 mg/dL (PBS) 2 mg/dL (suero fetal bovino)	Alta especificida d (anticuerpos), integración con smartphone.	50 min por medición, costoso de fabricar, requiere anticuerpos estables.	Karakuzu et al. (2022)
<i>AuNPs</i> + <i>péptidos.</i>	Orina	0.346 ppm	Alta selectividad (péptidos específicos) , observable a simple vista.	Síntesis de péptidos costosa, agregación sensible a condiciones externas.	Feng et al. (2020)
<i>Sensor dual (fluorescencia/ colorimetría) con puntos cuánticos CdTe</i>	Sangre	2.48 nM (fluoresc.) 1.78 μ M (colorim.)	Alta sensibilidad , doble señal aumenta	Posible toxicidad de CdTe, complejidad de síntesis, poco	Guan et al. (2021)

+ 2-PC.			confiabilida d.	portable.	
$Zn^{2+}/AuNPs$.	Orina	2 $\mu\text{g/mL}$	Método sencillo, económico, visible a ojo.	Menor sensibilidad que otros sistemas, limitado a rangos altos.	Chhillar et al. (2020)
$CuNPs$ + L- cisteína.	Suero sanguíneo y orina	4.54 $\times$ 10^{-10} M	Sensibilidad ultrabaja, método robusto.	Posible inestabilidad de $CuNPs$, riesgo de oxidación, requiere espectrofotometr o UV-Vis.	Sivasankar an et al. (2020)

Tabla 2. Principales biosensores colorimétricos reportados para la detección de creatinina: principios de detección, tipo de muestra, límite de detección, ventajas, desventajas y referencias.

G. Método enzimático para detección de creatinina

Hoy en día uno de los principales métodos utilizados en laboratorios clínicos para la detección de creatinina es el método enzimático, esto se debe a que presenta una mayor especificidad, exactitud y precisión que otros métodos como los colorimétricos o de referencia. Este método se basa en la hidrólisis de la creatinina por medio de la creatininasa, posteriormente la creatina producida se hidroliza a sarcosina y urea por medio de la creatininasa; la sarcosina resultante de dicha reacción es oxidada por la enzima sarcosina oxidasa produciendo glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno (Perazzi & Angerosa, 2011). El peróxido de hidrógeno, en presencia de la peroxidasa, oxida a la o-dianisidina, generando un cromóforo a 440 nm; lo cual da como resultado una cuantificación de la concentración de creatinina en la muestra estudiada (Sanhueza, 2024).

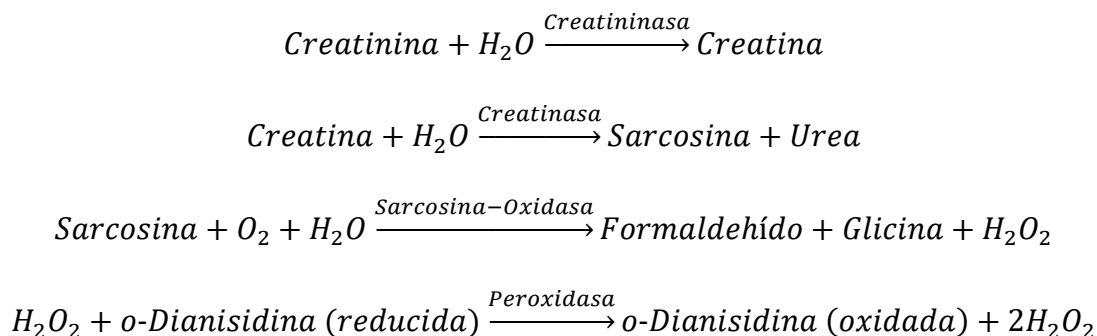


Figura 3. Estructura método enzimático para la determinación de creatinina en suero sanguíneo y determinación colorimétrica con o-Dianisidina

H. Peroxidasa de Rábano Picante

Las peroxidadas son enzimas oxidorreductasas que hacen uso de peróxidos, de hidrogeno u orgánicos, como agentes oxidantes; estas ayudan a evitar el daño oxidativo celular, el cual es generado por el peróxido de hidrogeno y sus subproductos de descomposición (Morales, 2020; García, 2023). La peroxidasa del rábano picante (HPR) es una de las peroxidadas más estudiadas, y como su nombre lo indica, esta se obtiene de la raíz del rábano; cuenta con varias isoenzimas, de las cuales la más utilizada es la tipo C, la cual presenta un centro metálico del grupo hemo, su átomo de hierro está ubicado en el medio de un anillo de porfirina y otro centro metálico que cuenta con dos átomos de calcio (García, 2023).

El ciclo catalítico de las peroxidadas es descrito por el mecanismo de Dunford, el cual describe que cuando la enzima en reposo (E) reacciona con el peróxido de hidrogeno forma un compuesto altamente oxidante A (E_A); posterior a esto E_A se reduce debido a un sustrato reductor S, en dos etapas secuenciales: durante la primera de ellas un electrón de S reduce a E_A en E_B , lo cual esto a su vez va generar un radical de S, y otro electrón de S regresa a E_B a su forma nativa E, lo cual completa el ciclo catalítico. Es importante señalar que si se encuentran concentraciones altas de peróxido E_B puede reaccionar con este exceso de peróxido y originar una forma inactiva de E_C , la cual gracias a la conversión del peróxido en agua y oxigeno este vuelve a su forma en reposo E (Morales, 2020; García, 2023).

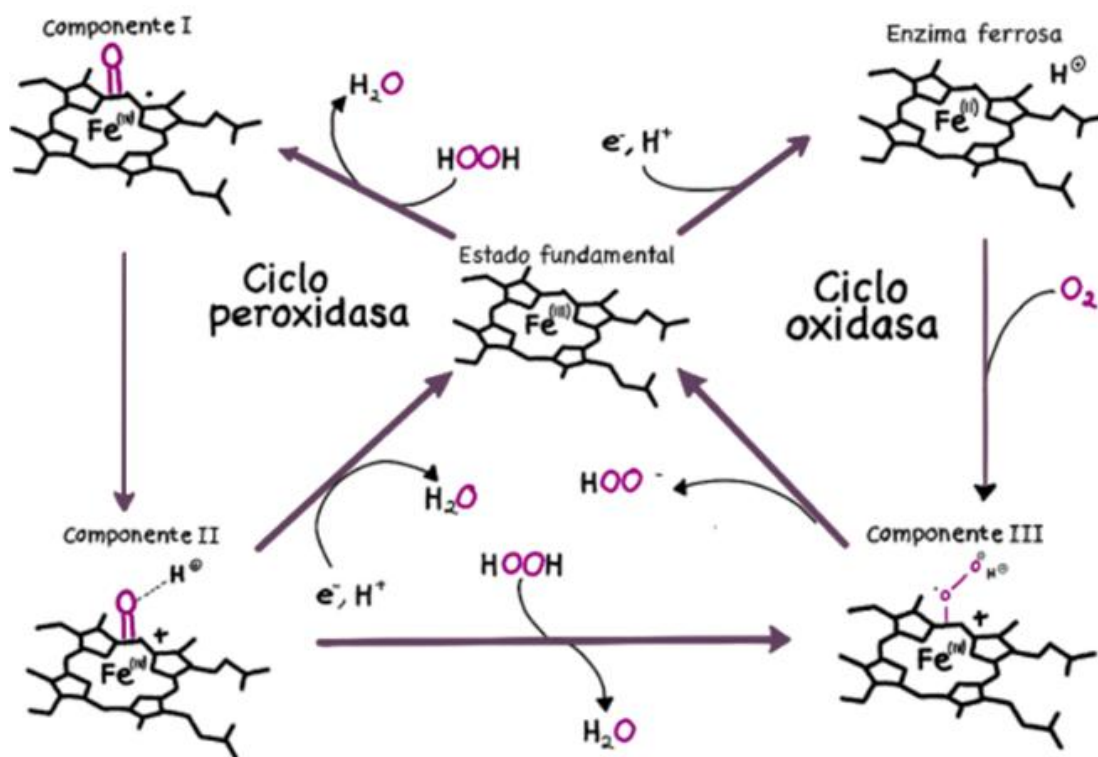


Figura 4. Ciclo de la reacción de oxidoreducción de la peroxidasa del rábano picante (Figura recuperada de García, 2023).

I. Suero Sanguíneo

La sangre es un fluido que fluye por el sistema circulatorio y cuyo objetivo es repartir oxígeno y nutrientes a las células, así como transportar los desechos. Sus principales componentes son los glóbulos (rojos y blancos), plaquetas y el plasma, el componente líquido de la sangre (Latham, 2021). El suero es el líquido que se obtiene de la sangre cuando ésta deja coagularse luego de su extracción. Se utiliza en una serie de ensayos clínicos y bioquímicos. El suero sanguíneo es principalmente agua que se disuelve con proteínas, hormonas, minerales y dióxido de carbono. Es una fuente muy importante de electrolitos. La principal diferencia entre la sangre y el plasma es la presencia de coagulantes. El plasma aún conserva coagulantes, mientras que el suero es la parte de la sangre que queda después de quitar estos componentes (Latham, 2021).

El perfil bioquímico sanguíneo canino consta de enzimas como la alanina aminotransferasa (ALT/GPT), aspartato aminotransferasa (AST/GOT), fosfatasa alcalina (ALP); proteínas séricas como la albumina y las globulinas, y otros elementos como el ácido úrico, colesterol, glucosa, creatinina, urea; e iones de calcio, fósforo, potasio, sodio y cloro, entre otros (Santillana, 2021).

Analito	Unidades	Perro
<i>Glucosa</i>	mmol/L	3.38-3.68
<i>Urea</i>	mmol/L	2.09-7.91
<i>Creatinina</i>	mmol/L	<126
<i>Colesterol</i>	mmol/L	2.85-7.76
<i>Bilirrubina</i>	mmol/L	<5.16
<i>ALT</i>	U/L	<70
<i>AST</i>	U/L	<55
<i>Fosfatasa alcalina</i>	U/L	<189
<i>GGT (gamma-glutamyl transferasa)</i>	U/L	<6
<i>Creatina cinasa (CK)</i>	U/L	<213
<i>Proteínas totales</i>	g/L	56.6-74.8
<i>Albumina</i>	g/L	29.1-39.7
<i>Globulinas</i>	g/L	23.5-39.1
<i>Calcio</i>	mmol/L	2.27-2.91
<i>Fósforo</i>	mmol/L	0.75-1.70
<i>Potasio</i>	mmol/L	3.82-5.34
<i>Sodio</i>	mmol/L	141-153
<i>Cloro</i>	mmol/L	108-117
<i>Bicarbonato</i>	mmol/L	17-25
<i>Ac: Grasos no volátiles</i>	mmol/L	12-24

Tabla 3. Valores de bioquímica sanguínea de referencia en caninos (Santillana, 2021).

J. Anatomía y Fisiología renal

En los caninos los riñones están ubicados en la cavidad abdominal, situados a cada lado de la columna vertebral; estos presentan una forma de frijol y un color rojo oscuro, el cual es producto de un alto flujo sanguíneo; cada riñón cuenta con un tejido conectivo que sirve como un soporte estructural y que a su vez le brinda protección al órgano. La parte más externa del riñón recibe el nombre de corteza renal, lugar en donde se ubican las nefronas; finalmente en la región interna, se encuentra la medula, la cual está compuesta por pirámides renales en donde se recolecta la orina para su posterior excreción (Delgado et al., 2024). Los riñones son los encargados de mantener la homeostasis orgánica, esto se logra mediante diversas funciones, entre ellas destacan: filtración y eliminación de productos metabólicos como la urea y la creatinina; mantener el equilibrio electrolítico, función endocrina con la producción de hormonas como la eritropoyetina; de igual forma regulan la tensión arterial, ya que, en estos sucede la activación de diversos metabolitos, como la enzima renina (Delgado et al., 2024; Melo & Barreto, 2024).

K. Etiología ERC

Proceso fisiopatológico que tiene como resultado la pérdida progresiva de nefronas, culminando en una enfermedad renal terminal, como la ERC, las manifestaciones clínicas de estas afecciones aparecen una vez que la pérdida de la función renal es irreversible; entre los principales factores de riesgo son la hipertensión arterial, enfermedades renovasculares y falta de riego sanguíneo local, así como edad avanzada en pacientes. La progresión de la ERC se puede observar con los cambios estructurales del tejido renal, ya que, las nefronas son reemplazadas por tejido fibroso; las causas de la aparición de este tejido y por ende la pérdida de la función renal pueden ser arterioesclerosis, es decir el endurecimiento de las arterias renales; por daño y cicatrización de los glomérulos y el daño en túbulos. Sin embargo, existen diversas etiologías que pueden causar o progresar la ERC, como se puede observar en la tabla 3, en donde se puede observar que estos causantes se pueden clasificar

principalmente en dos grupos: glomerulonefritis y lesiones tubulares (Delgado et al., 2024; Melo &Barreto, 2024).

Dentro de la primera clasificación se pueden encontrar causas de carácter infeccioso como la hepatitis infecciosa canina y la enfermedad de Lyme; estas también se pueden presentar por el uso de diversos fármacos como los corticosteroides. Lo cual, en conjunto, inducen respuestas inmunitarias descontroladas que ocasionan daño glomerular; y estas a su vez, reflejan que la predisposición genética en ciertas razas, como el *cocker spaniel* o *beagle*, puede comprometer la función renal (Melo &Barreto, 2024). Ahora bien, por otro lado las lesiones tubulares, los factores tóxicos e infecciosos, pueden alterar los mecanismos homeostáticos del riñón, provocando alteraciones metabólicas lo cual contribuyen en la progresión de la enfermedad (Melo &Barreto, 2024).

Clasificación	Causa	
<i>Glomerulonefritis</i>	Infeccioso	Adenovirus canino 1 (hepatitis infecciosa canina), enfermedad del gusano del corazón, enfermedad de Lyme, endocarditis bacteriana, infección por adenovirus canino-2, entre otros.
	Neoplásica	Leucemia linfocítica, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma broncogénico, entre otros.
	Hereditario	Razas más susceptibles (doberman pinscher, boyero de Berna, Beagle, terrier de pelo suave, samoyedo, caniche estándar, golden retriever, cocker spaniel).
	Inflamatorio	Lupus eritematoso sistémico, anemia hemolítica inmunomediada, prostatitis, pancreatitis crónica.
	Endocrina	Hiperadrenocorticismos, diabetes mellitus.
	Fármacos	Corticosteroides, sulfadiazina.
<i>Lesión tubular</i>	Infecciosa	Bacteriano: <i>Leptospira interrogans</i> serovars canicola,



		icterohaemorrhagiae, entre otras.
		Protozoario: Encephalitozoon cuniculi, sarcoidosis.
		Virales: Virus de la hepatitis infecciosa canina, virus de la hepatitis infecciosa canina.
	Parasitaria	Theileria parva, fase de recuperación
	Fármacos	Antiinflamatorios no esteroideos, litio, ciclosporina
	Toxinas	Intoxicación por plomo
	Trastornos metabólicos	Hipercalcemia, nefrocalcinosis
Otras causas	Isquemia, neoplasias, amiloidosis, infecciones en el tracto urinario, enfermedad renal poliquística, entre otras.	

Tabla 4. Causas etiológicas de ERC en perros (Melo &Barreto, 2024).

V. METODOLOGÍA

A. Materiales

Para el desarrollo de los diferentes experimentos se hizo uso de los siguientes reactivos y materiales: oxosulfato de vanadio (IV) soluble en agua (VOSO_4), bromato de potasio (KBrO_3), ácido nítrico (HNO_3), agua destilada, pirogalol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), buffer de fosfato de potasio, papel Whatman, o-dianisidina ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), tetrabutilamonio bromuro (TBAB), Nafion, hidróxido de sodio (NaOH), carbonato de sodio (Na_2CO_3), sulfato de cobre (CuSO_4), tartrato de sodio, albúmina, reactivo de Folin, creatinina, creatina, sarcosina, creatininas, creatinasa, sarcosina oxidasa, ácido úrico, ácido ascórbico, glucosa y urea

B. Síntesis de $\text{V}_2\text{O}_5\text{NWs}$

Se sintetizaron nanozimas de V_2O_5 usando un método hidrotermal; entendiéndose como el método por el cual se inducen reacciones químicas en presencia de agua como disolvente dentro de un sistema cerrado, dicha inducción se genera mediante el calentamiento del sistema hasta temperaturas mayores a 100°C , manteniéndose así por un tiempo determinado, generando condiciones de alta presión y temperatura que promueven la reacción, formando los productos directamente en la solución presentándose como precipitados (Martínez et al., 2022).

En el método utilizado en el presente trabajo se usó oxosulfato de vanadio (IV) soluble en agua (VOSO_4) como precursor, oxidándose con bromato de potasio (KBrO_3) mediante una agitación de 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se disminuyó el pH de la solución utilizando ácido nítrico (HNO_3) hasta llegar a un valor de 6; la reacción se realizó a una temperatura constante de 180°C por un tiempo de 24 h; luego de esto se dejó enfriar a temperatura ambiente, para que posteriormente se realizara el lavado de la solución con

agua destilada; finalmente, el precipitado formado presentó un color amarillo oscuro, el cual se dejó secar a 80 °C durante 12 h en un horno.

C. Caracterización

Microscopía electrónica de transmisión (MET o TEM por sus siglas en inglés)

La caracterización por TEM, realizada con un JEOL modelo JEM-1010, permitió observar la estructura cristalina del óxido, y a su vez, analizar su morfología a escala nanométrica; esto es posible gracias a los fenómenos físico-atómicos que se generan cuando un haz de electrones colisiona con una muestra ultrafina.

Microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés)

La caracterización por SEM, realizada con un Hitachi modelo SU3500, permitió obtener información sobre su morfología y su dinámica de reacciones. Esto se logra mediante un haz de electrones incidente en la muestra, lo cual genera un conjunto de respuestas que se detectan y se crean imágenes detalladas de la muestra (Penagos, J.I.C., 2013).

Espectroscopía Raman

La caracterización por espectroscopía Raman, realizada con un HORIBA XploRA, permitió obtener información sobre la estructura, la composición y los estados vibratorios de la nanozima. Esto se debe a las interacciones de los fotones con las vibraciones moleculares de la muestra (Gutiérrez, C.M., 2003).

D. Ensayo de actividad enzimática

Se empleó un ensayo de tipo peroxidasa utilizando pirogalol como sustrato para la determinación de unidades de actividad enzimática de las nanozimas de V_2O_5 , las cuales se utilizaron sustituyendo la HPR. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La reacción con la cual se inicia la reacción para el ensayo de actividad enzimática de tipo peroxidasa se

describe en la ecuación 1; en donde una unidad enzimática se definió como la producción de 1 mg de purpurogalina cada 20 s un pH 6.



La formación de purpurogalina se logró evidenciar mediante el color anaranjado de la solución, cuya intensidad fue cuantificada midiendo su absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S. Las lecturas se realizaron después de una incubación de la muestra de 3.5 min. Finalmente, los valores de absorbancia obtenidos fueron convertidos a unidades de actividad enzimática por miligramo de nanozima haciendo uso de la ecuación 2.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg}} = \frac{(\Delta A_{420} - A_{420(\text{blanco})})(2.91)}{(12)(0.01)(5)} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde

- A = Absorbancia
- 2.91 = mL totales del ensayo
- 12 = Coeficiente de extinción de 1 mg/mL de purpurogalina en 420 nm
- 0.01 = mL de solución de nanozima V₂O₅
- 5 = concentración en mg/mL de nanozima V₂O₅

La distribución de reactivos que se utilizaron está descrita en la tabla 4.

	Blanco (mL)	1(mL)	2(mL)	3(mL)
<i>Agua destilada</i>	2.1	2.1	2.1	2.1
<i>Buffer de fosfato de potasio pH 6</i>	0.48	0.32	0.32	0.32
<i>H₂O₂</i>	-	0.16	0.16	0.16
<i>Pirogalol</i>	0.32	0.32	0.32	0.32



Nanozima V_2O_5	0.01	0.01	0.01	0.01
-------------------	------	------	------	------

Tabla 5. Cantidades de reactivo utilizadas para pruebas de actividad enzimática de tipo peroxidasa

E. Inmovilización de V_2O_5 NWs

Los dispositivos analíticos basados en papel surgieron como herramientas para el desarrollo de los dispositivos *point of care*, los cuales son sistemas que permiten obtener resultados rápidos y confiables en el lugar donde se encuentra el paciente; ya que son asequibles, sensibles, fáciles de usar, rápidos y sin necesidad de utilizar equipo especializado, entre las principales ventajas que se presentan al desarrollar dispositivos basados en papel se encuentran bajos costos de fabricación, simplicidad, fácil almacenamiento, portabilidad y desechabilidad (Nguyen & Kim, 2020); razón por la cual se decidió realizar la inmovilización de las nanozimas en un soporte de papel Whatman, utilizando los grupos hidroxilo presentes en la celulosa del papel para permitir la adsorción de especies cargadas (Das et al., 2021). De igual forma, se añadió una matriz de Nafion modificado con TBAB, para obtener una matriz iónica que interactúe electrostáticamente con los V_2O_5 NWs (Lutz et al., 2021). Se cortaron círculos de papel Whatman con un diámetro de 0.5 cm. Se preparó una solución de tetrabutilamonio (TBAB) en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL, a la cual se le añadió 70 μ L de Nafion. Posteriormente, los papeles se sumergieron en la solución de TBAB con Nafion y se incubaron a 35°C por 15 minutos para fijar correctamente la matriz en el soporte. Finalmente, se incubaron en una solución de V_2O_5 NWs a una concentración de 5mg/mL, preparada en buffer de fosfato de potasio a pH 6.

F. Evaluación colorimétrica

Se trataron los V_2O_5 NWs inmovilizados en el papel con una solución de o-dianisidina 10 mM, dejando los papeles secarse en un horno a 35°C durante 15 min. Se añadieron 2 μ L de la solución de V_2O_5 NWs (5 mg/mL) a los papeles previamente tratados y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre cada papel se añadieron 50 μ L de una

solución de H_2O_2 a diferentes concentraciones, que oscilaron entre 0.1 mM y 100 mM. Las muestras se incubaron a $35^\circ C$ durante 10 min, para después realizar su análisis de cambio de color a partir del espectro RGB, por medio de un colorímetro comercial. La prueba se realizó por triplicado.

	Concentraciones (mM)												
H_2O_2	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	5	7.5	10	25	50	75	100

Tabla 6. Concentraciones utilizadas de H_2O_2 en la evaluación colorimétrica de V_2O_5NWs .

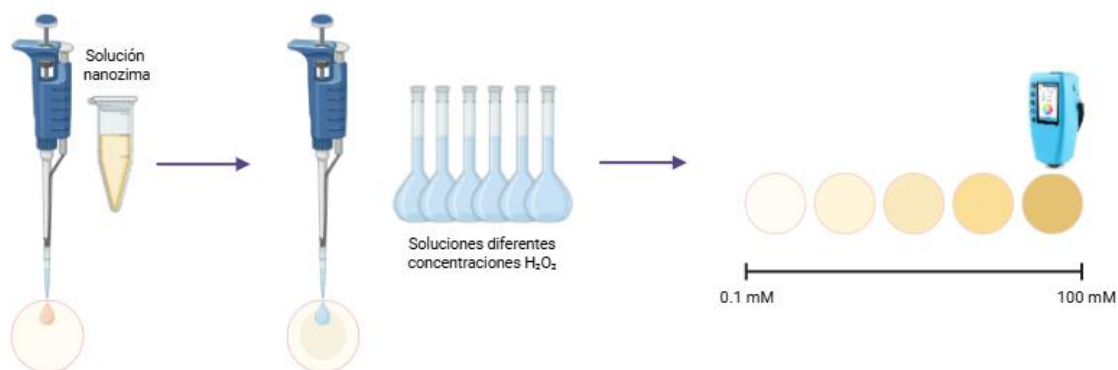


Figura 5. Evaluación colorimétrica de V_2O_5NWs . Donde a mayor concentración de H_2O_2 , mayor intensidad de color sobre el papel tratado con o-dianisidina/TBAB/Nafion/ V_2O_5NWs

G. Estudio cinético de acoplamiento proteico

Se preparó inicialmente una solución de hidróxido de sodio ($NaOH$) a una concentración de 0.1 M, con agua destilada. Posteriormente, se elaboró una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) a 0.1, utilizando como disolvente la solución de $NaOH$ previamente preparada. Adicionalmente se preparó una solución de sulfato de cobre ($CuSO_4$) al 2% p/v y una solución de tartrato de sodio al 1% p/v. A continuación se formuló una mezcla de reacción compuesta por 50 mL de la solución de Na_2CO_3 , 1 mL de $CuSO_4$ y 1 mL de la solución de tartrato.

Para el ensayo, se añadieron 1 mL de la solución previamente preparada en tubos de ensayo, seguido de la incorporación de 100 μL de albumina con una concentración de 1 mg/ mL de buffer de fosfato de potasio pH 7, solución donde se sumergió un papel con $\text{V}_2\text{O}_5\text{NWs}$ inmovilizados; se dejó reaccionar las muestras durante 15 min, para después agregar 100 μL de una solución de Folin y se incubaron durante 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, realizando mediciones cada 10 min, durante 1 h. La prueba se realizó por triplicado.

	Blanco (μL)	1 (μL)	2 (μL)	3 (μL)
<i>Na₂CO₃/CuSO₄/Tartrato</i>	1000	1000	1000	1000
<i>Folin</i>	100	100	100	100
<i>Albumina</i>	-	100	100	100
<i>Agua destilada</i>	100	-	-	-

Tabla 7. Cantidades de reactivo utilizadas en el estudio cinético de acoplamiento proteico de $\text{V}_2\text{O}_5\text{NWs}$.

H. Pruebas de actividad enzimática

En función de pH

Para evaluar el efecto del pH, se utilizaron cubetas de 1 mL, las cuales contenían 800 μL de buffer de fosfato de potasio a diferentes pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0), a las cuales se añadieron 100 μL de la solución del sustrato creatinina, creatina y sarcosina con una concentración de 3.56 mg/dL, 1.8 mg/dL y 2.71×10^{-4} mg/dL, respectivamente; y 100 μL de una solución de *o*-dianisidina 10 mM. Se agregó un papel previamente tratado con el colorante, $\text{V}_2\text{O}_5\text{NWs}$ y las enzimas correspondientes a cada sustrato que se estaba evaluando, posteriormente se agitó y se incubaron 5 min, para poder medir la absorbancia a una longitud de onda de 460 nm. La prueba se realizó por triplicado.

	Blanco	Creatinina	Creatina	Sarcosina
<i>Agua destilada</i>	800 μL	-	-	-



<i>Buffer de fosfato</i>	-	800 μ L	800 μ L	800 μ L
<i>Sol de sustrato</i>	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
<i>o-dianisidina</i>	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L

Tabla 8. Cantidades de reactivo utilizadas para la evaluación de pH

	Enzimas añadidas al papel
<i>Creatinina</i>	Creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa, V ₂ O ₅ NWs
<i>Creatina</i>	Creatinasa, sarcosina oxidasa, V ₂ O ₅ NWs
<i>Sarcosina</i>	Sarcosina oxidasa, V ₂ O ₅ NWs

Tabla 9. Enzimas añadidas a cada papel correspondientes al sustrato evaluado.

En función de temperatura

Para la evaluación de temperatura, se empleó el mismo procedimiento que para la evaluación de pH, manteniendo el pH del buffer a 7.0 y evaluando la actividad a 15, 25, 35 y 45 °C, incubando las reacciones durante 5 min antes de realizar la medición de absorbancia. La prueba se realizó por triplicado.

I. Evaluación de Interferentes

Se emplearon los papeles tratados, a los cuales se les añadió 2 μ L de la solución V₂O₅NWs (5 mg/ml); y a su vez, 50 μ L de soluciones de posibles interferentes como ácido úrico (A.U.), ácido ascórbico (A.A.), albumina (ALB), glucosa (GLU) y urea; evaluadas a un rango de concentraciones descrito en la tabla 9, en presencia de H₂O₂ a una concentración de 5 mM. Posteriormente se dejaron secar a 35°C, para después realizar su análisis por medio de un colorímetro. La prueba se realizó por duplicado.



	A.U.	A.A.	ALB	GLU	UREA
Concentración (mg/dL)	1.32	1.06	2000	130	100

Tabla 10. Concentraciones utilizadas para la evaluación de interferentes.

J. Detección colorimétrica de creatinina

Se hizo uso de los papeles tratados, en donde se añadieron 2 μL de las enzimas correspondientes a cada sustrato (tabla 10). Posteriormente, se añadieron 50 μL de las soluciones de los sustratos a distintas concentraciones y se incubaron a 35°C, una vez secos los papeles, se prosiguió a realizar la medición colorimétrica del H_2O_2 generado. La prueba se realizó por triplicado.

	Concentración (mg/dL)									
Creatinina	0.5	1	1.72	2.33	2.94	3.56	4.17	4.78	5.39	6
Creatina	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3
Sarcosina	0.0053	0.0096	0.014	0.018	0.022	0.027	0.032	0.036	0.040	0.044

Tabla 11. Concentraciones de los sustratos evaluados.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Caracterización

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las micrografías TEM presentan una distribución heterogénea de nanoestructuras de V_2O_5 ; ya que se pueden observar nanopartículas dispersas de pequeño tamaño ($<50\text{nm}$), junto con aglomerados con mayor densidad. Esta variabilidad en la morfología de las estructuras se puede atribuir a la elevada energía superficial intrínseca de los óxidos metálicos en nanoescala (Nunes et al., 2018). La presencia de partículas finas y aglomerados implica una relación entre la funcionalidad activa y la estabilidad estructural del material; ya que, los aglomerados podrían disminuir la superficie activa disponible e interrumpir la difusión iónica; mientras que las nanopartículas dispersas contribuyen a la actividad funcional.

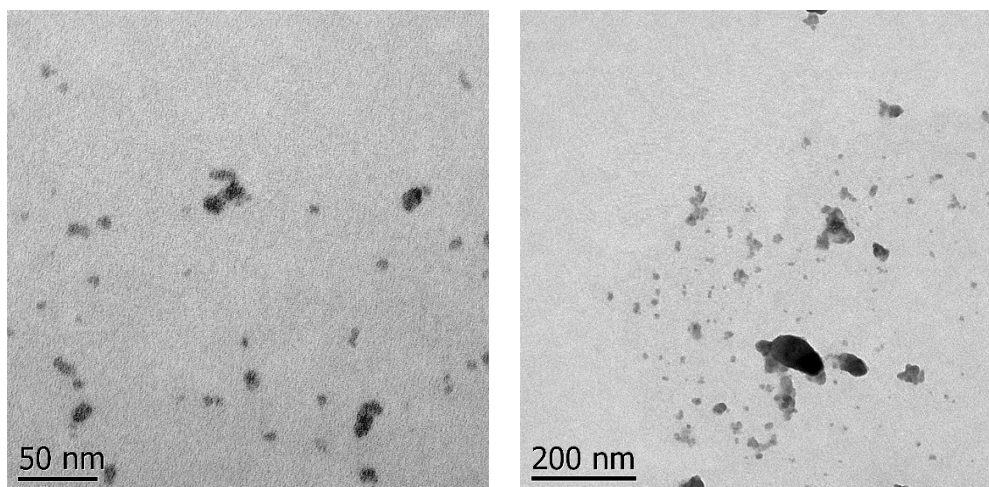


Figura 6. Micrografías TEM de nanoestructuras de óxido de vanadio (V_2O_5) observadas a diferentes escalas (50 y 200 nm), donde se aprecia la distribución, morfología y aglomeración de las nanoestructuras.

Micrografía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías SEM muestran que el material sintetizado presenta una morfología acicular, propia de *nanowires* de V_2O_5 , propia del método de síntesis hidrotérmal (Hu et al., 2023). En las micrografías se puede observar un arreglo de estructuras alargadas distribuidas de manera homogénea sobre la superficie.

La morfología acicular es característica del crecimiento anisotrópico de V_2O_5 , en donde las cadenas de VO_5 se orientan a lo largo del eje cristalográfico b en la fase ortorrómbica. Al presentar este tipo de estructura se tiene una alta relación área superficial/volumen y un incremento de sitios activos disponibles (Hu et al., 2023).

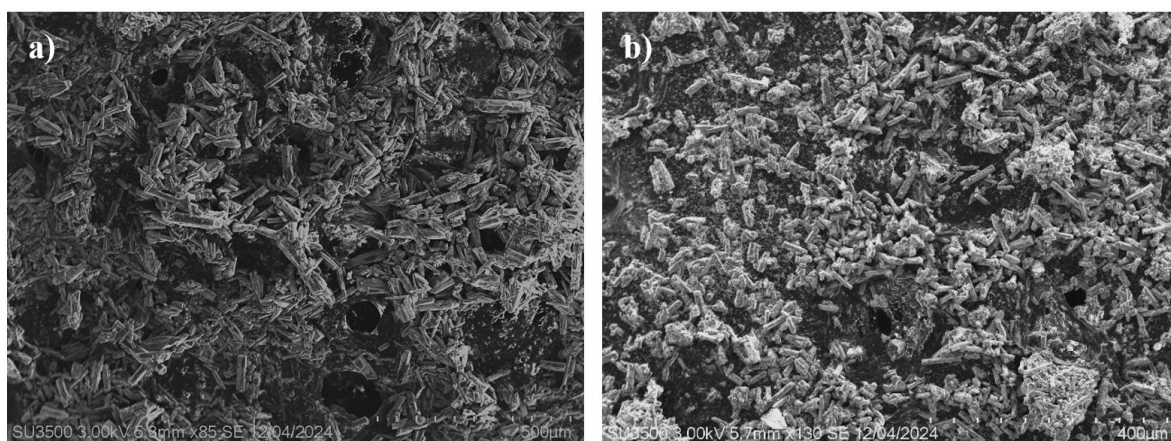


Figura 7. Micrografías SEM de nanoestructuras de V_2O_5 , donde se aprecia la morfología cristalina y la distribución superficial. (a) Aumento $\times 85$; (b) Aumento $\times 130$

Espectroscopía Raman

El espectro Raman de los V_2O_5 NWs muestra bandas o vibraciones moleculares en ~ 300 , ~ 419 , ~ 504 y ~ 616 cm^{-1} , correspondientes al clúster de flexiones del armazón/V=O ($283\text{--}305$ cm^{-1}), a la flexión V=O ($\sim 403\text{--}406$ cm^{-1}) y a estiramientos/combinaciones V–O–V, respectivamente (Ling et al., 2022; Dhananjaya et al., 2018; Rackauskas et al., 2009). La banda presente en 231 cm^{-1} se atribuye a un modo de red desplazado respecto a $194\text{--}199$ cm^{-1} , esto debido a la presencia de efectos de confinamiento fonónico; los cuales modifican la dinámica vibracional de los fonones ópticos, y defectos en la estructura, lo cual genera que las bandas puedan desplazarse de $15\text{--}25$ cm^{-1} y se alteren las propiedades ópticas del nanomaterial (Mwakikunga et al., 2012). La señal característica al enlace V–O–V a 525 cm^{-1} también aparece desplazada en 504 cm^{-1} , esto debido a la presencia de vacancias de oxígeno y al tamaño reducido del nanomaterial. La banda de 1327 cm^{-1} no corresponde a un modo vibracional fundamental de V_2O_5 , sin embargo, se le puede atribuir a una banda de

segundo orden o a una banda de combinación, los cuales son muy comunes en nanoestructuras (Wang et al., 2010).

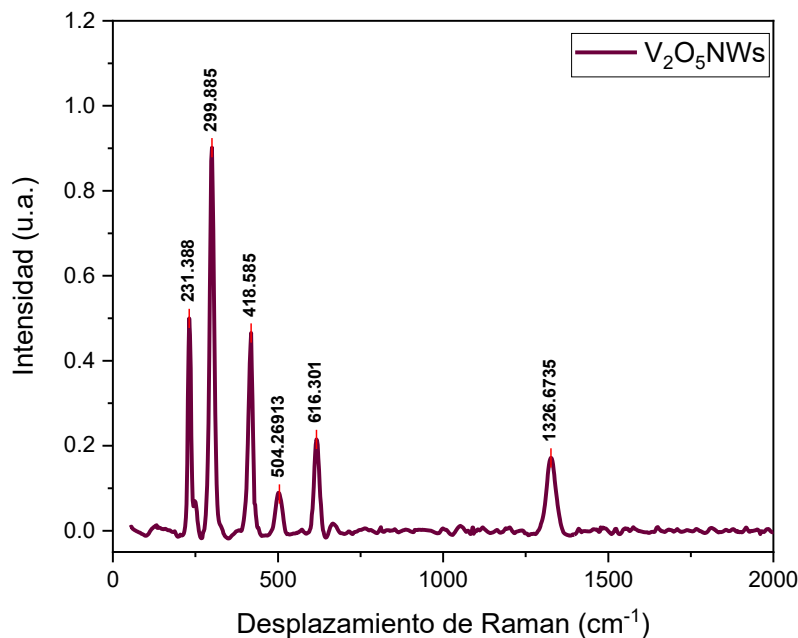


Figura 8. Espectro Raman de V_2O_5 NWs señalando las frecuencias de los modos vibracionales.

B. Ensayo de actividad enzimática

Primeramente, y con el objetivo de evaluar el tiempo de reacción de los V_2O_5 NWs, se realizó un estudio cinético utilizando la metodología del ensayo de actividad enzimática de Sigma Aldrich evaluando concentraciones de H_2O_2 de 0.5 y 100 mM; se decidieron tomar esas concentraciones debido a que la mínima se encuentra dentro de las concentraciones correspondientes al estadio 4 de la ECR. Se tomaron mediciones de la actividad catalítica en intervalos de 30 segundos durante un periodo total de 8 minutos; teniendo como tiempo óptimo de reacción para ambas concentraciones 3.5 minutos; ya que se puede observar una curva de crecimiento inicial rápido durante los primeros minutos, seguido de una etapa de incremento más gradual hasta llegar al tiempo final.

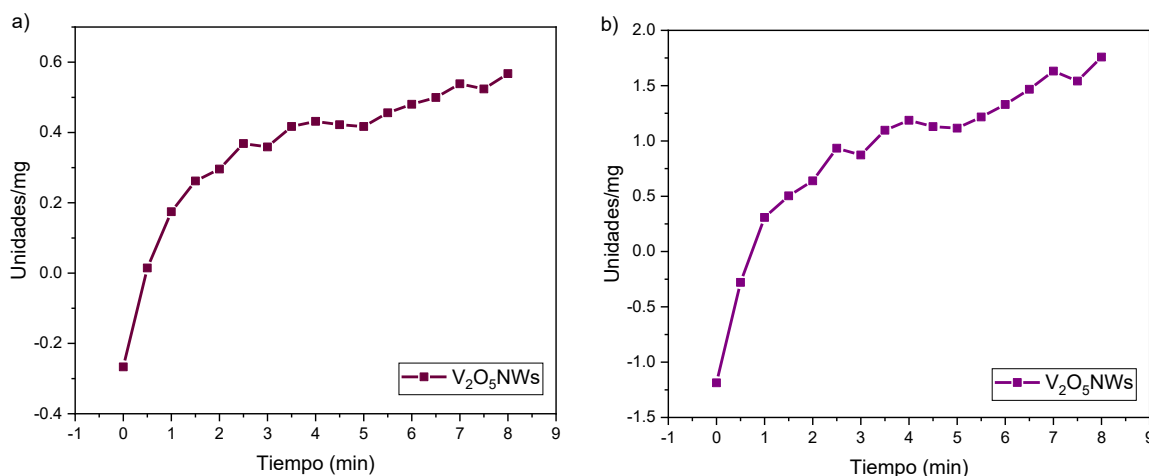


Figura 9. Tiempo de reacción de V_2O_5NWs . a) H_2O_2 0.5 mM. b) H_2O_2 100mM.

Una vez que se definió el tiempo de reacción, se realizó el ensayo de actividad enzimática en donde, de acuerdo con la Figura 10, se puede observar un incremento progresivo de la absorbancia conforme la concentración del sustrato aumenta, lo cual evidencia la generación de purpurogalina derivada de la oxidación del pirogalol. En bajas concentraciones se presenta un incremento notorio, lo cual es indicativo de una alta afinidad catalítica hacia el peróxido de hidrógeno, esto debido a los centros redox del vanadio (V^{5+}/V^{4+}) actúan como sitios catalíticos para la descomposición del sustrato, lo cual promueve la transferencia de electrones hacia el cromógeno (Hu et al., 2023). Mientras que a concentraciones mayores la curva adopta una tendencia lineal, lo cual es característico de un comportamiento tipo Michaelis-Menten, característico de los sistemas enzimáticos donde la velocidad de la reacción se aproxima a un valor máximo el cual es producto de la saturación de los sitios activos (Cornish-Bowden, 2015). En conjunto, la respuesta obtenida en la Figura 10, valida el uso de V_2O_5NWs como nanozimas con actividad peroxidasa-mimética, lo cual a su vez, concuerda con lo presentado en estudios recientes sobre nanozimas basadas en óxidos metálicos con este tipo de actividad enzimática (Zhang et al., 2025; Huang et al., 2019).

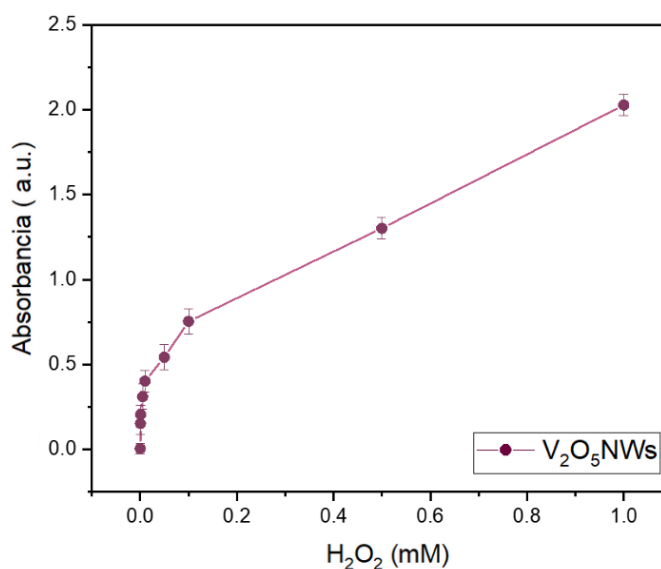


Figura 10. Relación entre la absorbancia y la concentración de H_2O_2 para la determinación de la actividad tipo peroxidasa de los V_2O_5NWs .

C. Evaluación colorimétrica de H_2O_2

Para la evaluación de la aplicación de V_2O_5NWs en sistemas de detección colorimétrica se analizó la respuesta óptica de estos frente diferentes concentraciones de H_2O_2 (0-100 mM), registrando los cambios en los niveles de color en los canales rojo, verde y azul (RGB). Se ha reportado que el análisis digital de imágenes en RGB permite tener un reconocimiento sensible a cambios de color, así aplicándolo en el desarrollo de biosensores colorimétricos (Jeon et al., 2022). En la Figura 11.a se presentan los valores RGB obtenidos para cada concentración de H_2O_2 evaluada con V_2O_5NWs sin inmovilizar en papel Whatman. Se puede observar una tendencia decreciente en los tres canales de color conforme la concentración del analito va aumentando, lo cual refleja un cambio en la señal cromática registrada. En el canal de color rojo se presenta una buena sensibilidad en concentraciones bajas de H_2O_2 debido a que se presenta una mayor intensidad, de aproximadamente 170 unidades, en estas concentraciones, para que después se presentará una disminución progresiva hasta los 50 mM y una estabilización en aproximadamente 130 unidades. De igual forma, se puede observar que el canal verde presenta un comportamiento similar con una caída inicial de 130 unidades y una estabilización en concentraciones medias, así

alcanzando valores cercanos a 125 unidades en 100 mM. Finalmente, en el canal azul se registraron los valores más bajos de intensidad, con una disminución en bajas concentraciones pasando de 150 a 120 unidades, y una estabilización de aproximadamente 120 unidades en concentraciones más altas. Este comportamiento indica que los canales verde y azul se reducen en más intensamente que el rojo, lo cual genera una transición de color perceptible en el espectro visible; con lo cual se puede evidenciar la actividad catalítica de las nanozimas para inducir un cambio colorimétrico dependiente de la concentración del analito.

Ahora bien, en la Figura 11.b y 11.c se presentan los colores obtenidos a partir de las coordenadas cromáticas correspondientes al diagrama de cromaticidad CIE 1931, las cuales fueron obtenidas utilizando los componentes XYZ correspondientes a cada valor RGB de cada color, para que después estos fueran convertidos, utilizando la ecuación 3, en dichas coordenadas (Fairchild, 2013).

$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad ; \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad \text{Ec. 3}$$

El espacio de color de la CIE 1931, el cual corresponde al espacio XYZ del color y se basa en mediciones directas del ojo humano; en donde el color puede dividirse en luminosidad y cromaticidad. Una vez que se obtenían las coordenadas x y y se les denominaban coordenadas proyectivas y los colores del diagrama ocupan una región del plano real proyectivo. Las principales propiedades de dicho diagrama son: i) representa todas las cromaticidades promedio que son visibles para el humano. ii) representa los valores no negativos de x , y y z . iii) todos los colores pueden formarse al mezclar dos colores correspondientes a dos puntos del diagrama. iv) una distancia en el diagrama xy no corresponde a los grados de diferencia entre dos colores (Salazar, 2008). En ambas figuras se puede observar un desplazamiento cromático perceptible dentro del espectro visible, lo cual indica que el cambio de coordenadas leídas con $\text{V}_2\text{O}_5\text{NWs}$ traduce la reacción catalítica en una respuesta visual que puede interpretarse con mayor facilidad.

De igual forma, se calculó la distancia euclidiana presente en los valores RGB de las lecturas obtenidas utilizando la ecuación 4, donde los valores con subíndice M

corresponden a los valores obtenidos de las muestras experimentales; mientras que los valores con subíndice B corresponden al blanco utilizado; esto con el fin de poder cuantificar el cambio en los canales de color.

$$D.E = \sqrt{(R_M - R_B)^2 + (G_M - G_B)^2 + (B_M - B_B)^2} \quad \text{Ec. 4}$$

Se construyó una curva de calibración, Figura 11.d, en donde se observa que el aumento de la distancia euclidiana tiende a fluctuar en bajas concentraciones, esto aunado a un valor de pendiente pequeño (0.512) y un valor ajustado de R^2 de 0.7226, señala que aunque exista una tendencia lineal entre la concentración de peróxido y la DE, la respuesta no es muy consistente. Utilizando estos datos, se obtiene el límite de detección de 25.05 mM.

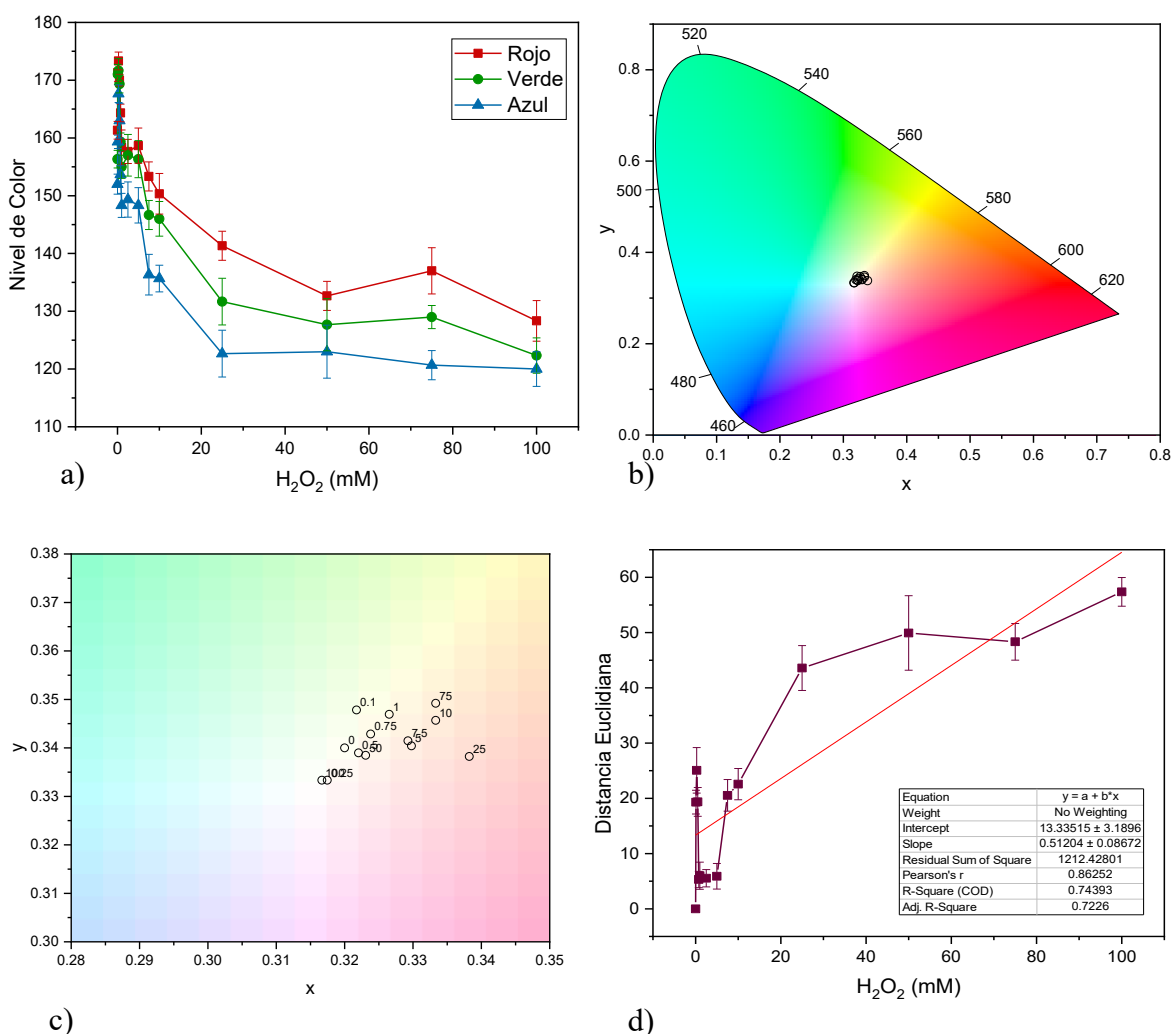


Figura 11. a) Detección colorimétrica de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con nanozimas de V_2O_5 sin inmovilizar, mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de H_2O_2 . Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de H_2O_2 . d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de H_2O_2 .

Por otro lado, en la Figura 12.a se presentan los valores de RGB obtenidos con los V_2O_5 NWs inmovilizados en una matriz de TBAB/Nafión sobre papel Whatman; en donde se observa una disminución progresiva en los tres canales de color conforme va aumentando la concentración de H_2O_2 . En el canal rojo se mantienen inicialmente los valores más altos correspondientes a aproximadamente 185 unidades, pero este decrece constantemente hasta estabilizarse en 100 unidades a 100 mM. A su vez, los canales verde y azul presentan caídas más notorias, alcanzando niveles cercanos a 90 unidades en la concentración más alta del analito; al presentar este comportamiento en los tres canales se puede observar que la inmovilización de V_2O_5 NWs en la matriz de TBAB/Nafión mejora la estabilidad de la señal y potencia la capacidad de respuesta frente al H_2O_2 , lo cual genera un cambio de color más marcado. Esto también es confirmado por la Figura 12.d, ya que se muestra que presenta una mejor linealidad que el sistema presentado en la Figura 11.d, en el sistema inmovilizado se tiene una pendiente de 1.3558 y una R^2 ajustada de 0.9179; con lo cual se tiene un límite de detección de 1.95 mM, el cual es más de 10 veces menor que el correspondiente al sistema anterior.

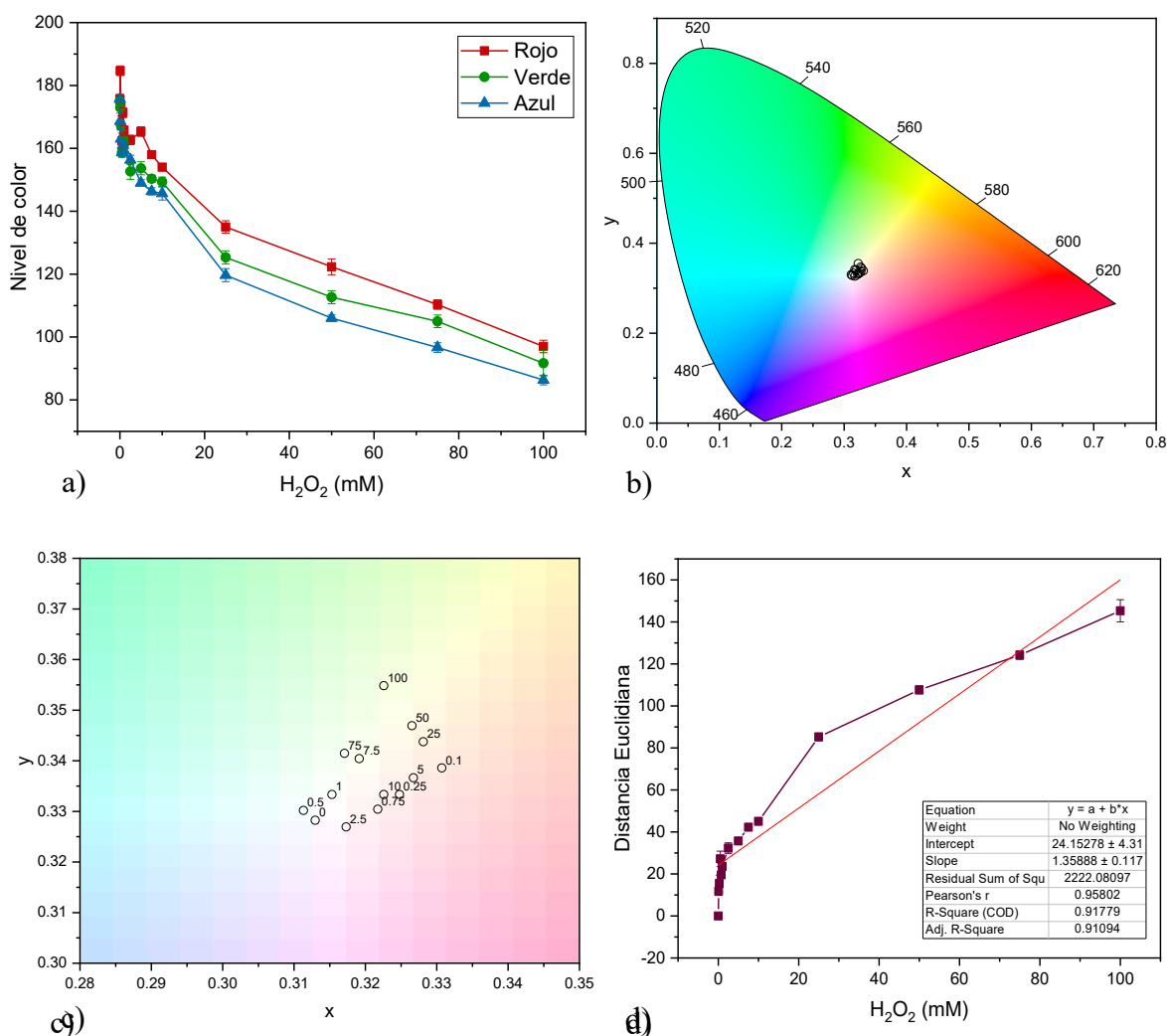


Figura 12. a) Detección colorimétrica de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con nanozimas de V_2O_5 inmovilizadas en matriz de TBAB/Nafión mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de H_2O_2 . Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de H_2O_2 . d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de H_2O_2 .

De esta forma, la inmovilización de los V_2O_5 NWs en la matriz TBAB/Nafión mejora la linealidad de la respuesta colorimétrica y, a su vez, mejora la sensibilidad del sistema. Esto se debe a que la matriz genera un microambiente más estable, gracias a la neutralización de los grupos sulfónicos del Nafión por el ion TBA^+ , lo cual favorece que las interacciones sean más controladas.

D. Estudio cinético de acoplamiento proteico

La cinética de acoplamiento proteico presentado en la Figura 13 corresponde al proceso de adsorción de albúmina en los V_2O_5 NWs. Durante los primeros 10 minutos se obtiene un incremento rápido en el porcentaje de unión, indicando que se tiene una alta disponibilidad inicial de los sitios activos de la nanozima (Barberi et al., 2022). Posteriormente, la tasa de adsorción aumenta gradualmente hasta alcanzar un porcentaje de acoplamiento máximo de 25.32% a los 50 minutos, representando un equilibrio entre las moléculas de albúmina adsorbidas y las remanentes en la solución; con lo cual se puede definir el tiempo mínimo necesario para tener un acoplamiento eficiente en el sistema. Dicho comportamiento es característico de la adsorción de proteínas en donde la unión inicial está gobernada por interacciones electrostáticas, puentes de hidrogeno y fuerzas de Vander Waals, como el caso del V_2O_5 , con grupos funcionales de la proteína (Hu et al., 2023; Klok et al., 2020). Ahora bien, el aumento gradual después de los 10 min surge como producto de la saturación por recubrimiento de sitios activos y repulsiones estéricas entre las moléculas que ya se encuentran adheridas (Klok et al., 2020).

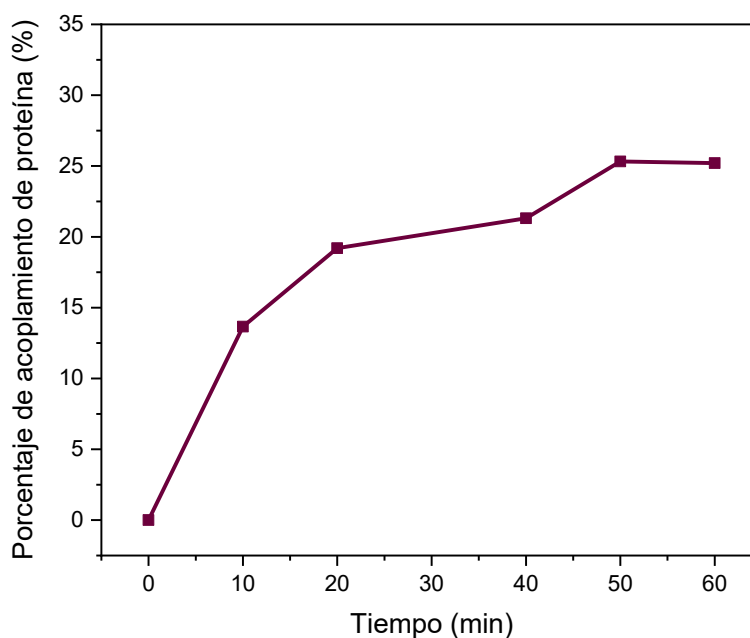


Figura 13. Estudio cinético de acoplamiento proteico en V_2O_5 NWs, expresado como porcentaje de unión en función del tiempo de incubación.

E. Pruebas de actividad enzimática

En función del pH

Las nanozimas presentan un gran potencial como alternativa a las enzimas naturales; sin embargo, estas necesitan de reacciones catalíticas biológicamente relevantes a un pH fisiológico para poder contar con aplicaciones analíticas eficientes (Chen et al., 2023). Ahora bien, las nanozimas que imitan la actividad catalítica de tipo peroxidasa suelen tener un pH óptimo ácido (Sun et al., 2016). Sin embargo, este puede modificarse modulando el microambiente de las nanozimas para romper las limitaciones del pH y así potenciar sus actividades en valores fisiológicos y que no se comprometa su actividad y rendimiento (Li et al., 2024). Para poder atender estas limitaciones se utilizó la matriz de TBAB/Nafión para modificar el microambiente alrededor de los V_2O_5 NWs para poder trabajar eficazmente en pH neutro; ya que, el Nafión cuenta con dominios hidrófilos correspondientes a los grupos sulfónico ($-SO_3H$) los cuales forman canales iónicos que retienen agua, creando un ambiente local con una alta actividad iónica, la cual al intercambiar los protones de dichos grupos por el catión de tetrabutylamonio (TBA^+) se reduce la acidez de esos dominios modificando la microestructura y amortiguando el pH hacia valores más neutros, manteniendo la eficiencia de la nanozima (Zhu et al., 2022; Orsino, 2020).

La Figura 14 muestra la actividad catalítica registrada para la creatinina, creatina y sarcosina en un intervalo de pH 6 a 8. Se puede observar que la creatinina presenta una actividad mayor en pH 7, la sarcosina muestra un comportamiento similar; mientras que la creatina incrementa progresivamente conforme el medio se vuelve más básico. Este comportamiento evidencia que a pH superiores a 7 la creatina y sarcosina pueden generar respuestas que interfieran con la detección selectiva de creatinina; razón por la cual se eligió pH óptimo el pH 7 ya que la creatinina conserva una respuesta estable.

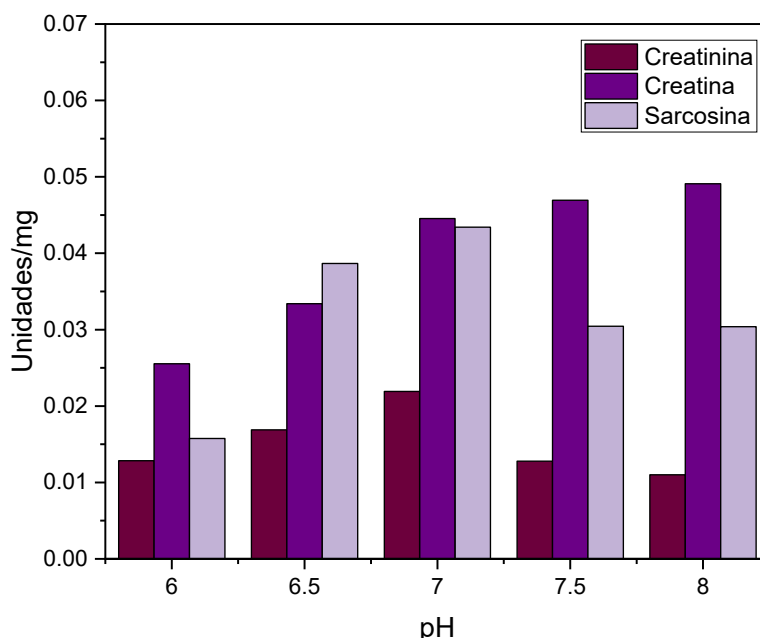


Figura 14. Efecto del pH en la actividad catalítica de los V_2O_5NWs en creatinina, creatina y sarcosina.

En función a la temperatura

La Figura 15 presenta que los valores de actividad catalítica, correspondientes a la creatinina, presentan un máximo a $25^{\circ}C$, comportamiento que se repite tanto en la creatina como en la sarcosina. Esto sugiere que la señal del analito se mantiene estable a dicha temperatura, ya que, no se compromete la especificidad del sistema. Estos resultados apoyan la selección de condiciones experimentales compatibles con las condiciones biológicas, favoreciendo la aplicabilidad práctica del biosensor. La selección de $25^{\circ}C$ como temperatura óptima se puede fundamentar con la cinética catalítica; ya que a bajas temperaturas como $15^{\circ}C$ la energía cinética de las moléculas es limitada, lo cual retrasa la velocidad global de la reacción. Por otro lado, en temperaturas elevadas la descomposición no catalizada del H_2O_2 se ve favorecida, lo cual disminuye la disponibilidad del sustrato oxidante (De la Macorra et al., 2004; Jiménez et al., 2021).

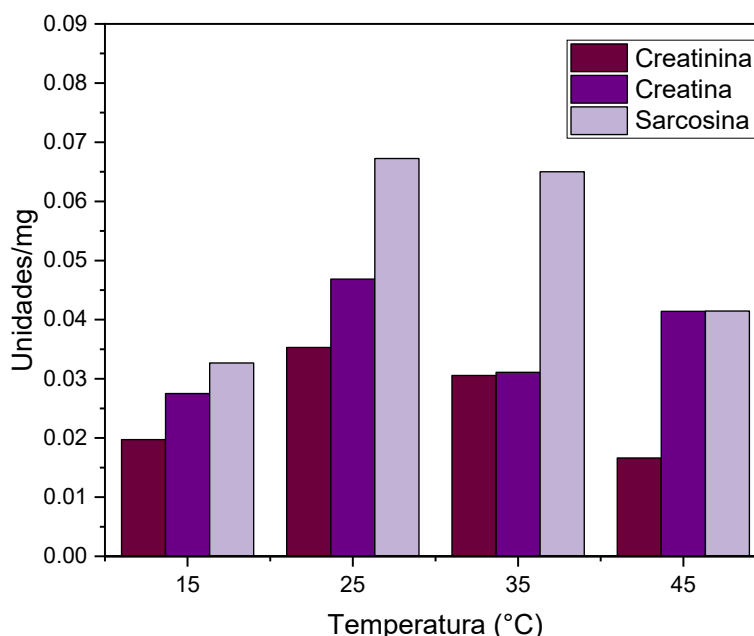


Figura 15. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica de los V_2O_5NWs en creatinina, creatina y sarcosina.

F. Evaluación de interferentes

Como se mencionó anteriormente una de las principales características que deben de presentar los biosensores es una alta selectividad, es decir, estos deben de tener la capacidad de emitir una respuesta positiva relacionada solamente a la interacción del analito, y que el resultado no se vea afectado por la presencia de cualquier material o molécula que pueda modificar la verdadera concentración de la muestra estudiada (Rodríguez et al., 2024). Los principales interferentes que se pueden presentar en el suero sanguíneo es la albumina, glucosa, urea, ácido ascórbico, ácido úrico, entre otros (Byrne et al., 2020). La Figura 16 muestra la evaluación del efecto de dichos interferentes en la detección colorimétrica del H_2O_2 ; en todos los casos, los niveles de color correspondientes a los canales RGB no presentaron variaciones significativas en comparación con los obtenidos únicamente con H_2O_2 . Esto representa que la señal cromática es generada específicamente por la descomposición catalítica del H_2O_2 por los V_2O_5NWs , y no a reacciones alternas con los interferentes estudiados. Estos comportamientos señalan que las nanozimas presentan una buena selectividad, lo cual sugiere que el sistema es confiable y adecuado para aplicaciones prácticas en muestras biológicas reales en biosensores

colorimétricos. Dicha selectividad se puede atribuir a los centros activos del vanadio, los cuales alternan entre los estados de oxidación V^{5+}/V^{4+} , lo cual permite habilitar rutas catalíticas tipo peroxidasa (Ko et al., 2022); ya que, facilita la transferencia de electrones y la generación de especies reactivas de oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno, permitiendo la oxidación del cromógeno (o-dianisidina) (Hu et al., 2023).

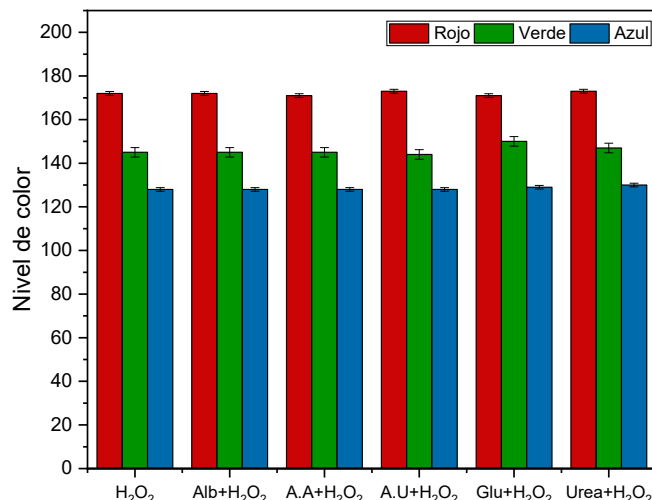


Figura 16. Evaluación de la selectividad de V_2O_5NWs , mostrando una respuesta exclusiva hacia H_2O_2 , sin variaciones significativas ante la presencia de otras biomoléculas (albúmina, ácido ascórbico, ácido úrico, glucosa y urea).

G. Detección colorimétrica de creatinina

La Figura 17.a muestra los valores RGB obtenidos en diferentes concentraciones de sarcosina (0-0.05 mg/dL); se puede observar que existe una tendencia decreciente en los tres canales de color conforme la concentración del analito, lo cual refleja un cambio progresivo en la señal colorimétrica. En específico se puede observar que en el canal correspondiente al color rojo se registran los valores más altos, de aproximadamente 210 unidades, en las concentraciones más bajas, pero estas disminuyen constantemente hasta alcanzar las 150 unidades. El canal verde presenta un comportamiento similar, iniciando en 185 unidades y descendiendo hasta 130 unidades. Por otro lado, el canal azul presenta los niveles de color más bajos de todo el rango, con valores iniciales a 160 unidades, terminando en 120 unidades. El patrón descrito anteriormente refleja que el incremento de la concentración de la sarcosina se ve representado con la disminución de la señal en los canales azul y verdes, lo cual genera un color final más rojizo o naranja. En la Figura 17.d

se puede observar que la distancia euclidiana aumenta de forma casi lineal con la concentración de sarcosina, alcanzando valores próximos a 100 unidades en la concentración máxima; teniendo una R^2 ajustada de 0.9877, lo cual representa una buena correlación entre concentración de analito y el cambio cromático, teniendo un límite de detección de 0.028 mg/dL.

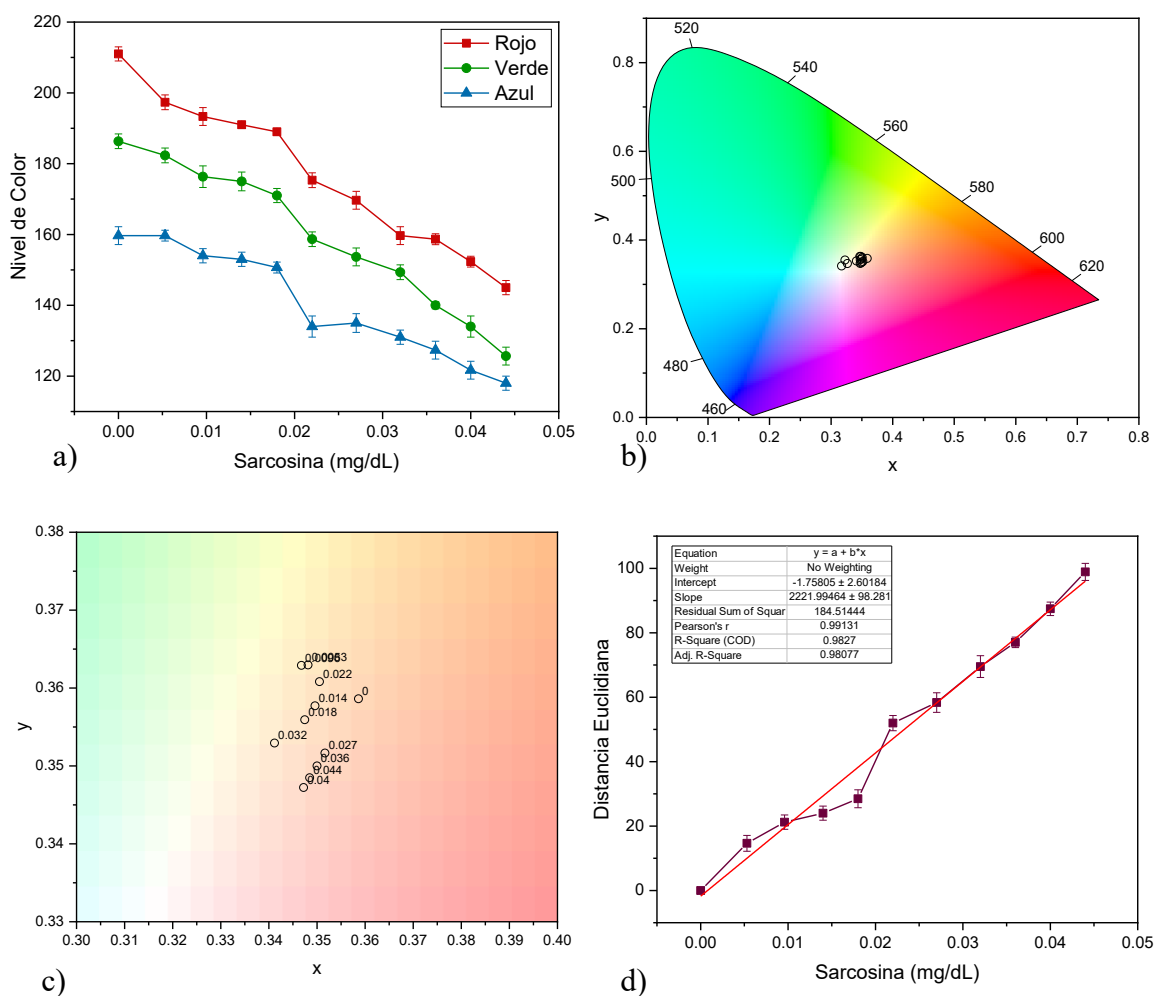


Figura 17. a) Detección colorimétrica de sarcosina con V_2O_5NWs , mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de sarcosina. Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de sarcosina. d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de sarcosina.

Ahora bien, en la Figura 18.a se presenta una disminución en los tres canales de color conforme aumenta la concentración de creatina, lo cual señala que la respuesta cromática depende directamente de la concentración del analito. De manera más específica, en el canal rojo se encuentran los valores iniciales más altos, 180 unidades, los cuales van disminuyendo hasta llegar a 125 unidades en la concentración máxima. Por otro lado, el canal verde inicia en aproximadamente 170 unidades y decae continuamente hasta llegar a 110 unidades. Finalmente, en el canal azul se observan los niveles más bajos de todo el rango de color, iniciando en 155 unidades y descendiendo hasta 95 en 3 mg/dL. Este comportamiento refleja, que igual que en el caso de la sarcosina, la reducción de la señal en los canales verde y azul genera una transición hacia tonos más rojizos o naranjas en el espectro visible. En la Figura 18.d la DE aumenta en función de la concentración de creatina, teniendo un valor ajustado de R^2 de 0.986 mostrando una buena correlación entre la señal cromática y la concentración del analito; teniendo un límite de detección de 0.96 mg/dL. Con este comportamiento se puede observar que la creatina muestra una buena reproducibilidad y linealidad, con lo cual se puede confirmar la capacidad del sistema basado en los V_2O_5 NWs para poder cuantificar este analito. En comparación con los resultados de la sarcosina, la pendiente de la curva es menor lo cual indica que la sensibilidad hacia la creatina es más baja, pero igualmente adecuada para la detección.

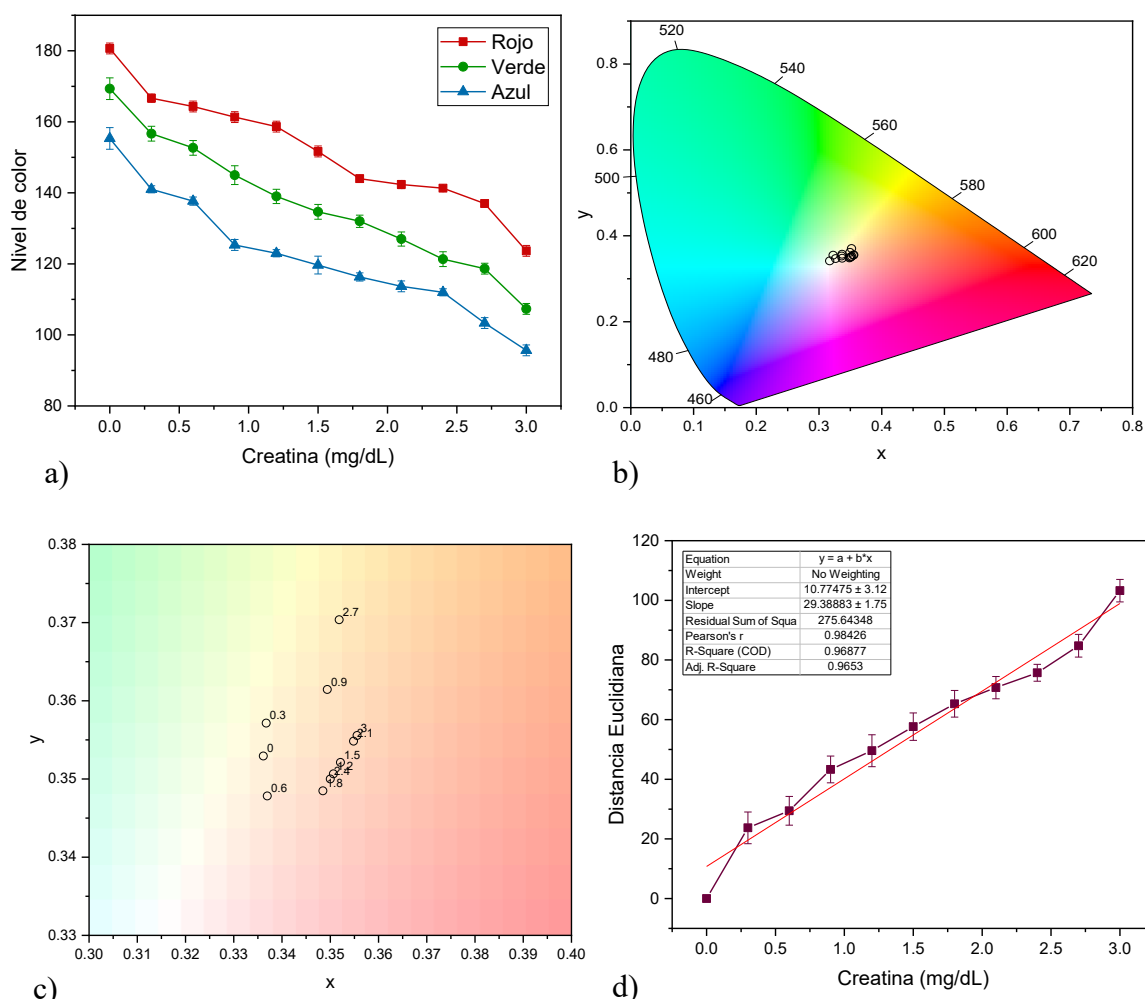


Figura 18. a) Detección colorimétrica de creatina con V_2O_5NWs , mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de creatina. Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de creatina. d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de creatina.

De igual manera, en la Figura 19.a se presenta una disminución progresiva en los tres canales conforme aumenta la concentración de creatinina; en el canal rojo se tienen los niveles de color más alto a bajas concentraciones iniciando en 165 unidades y estabilizándose en aproximadamente en 120 unidades en concentraciones más altas. En el canal verde se presenta un descenso de 160 a 100 unidades, mientras que en el azul, los valores correspondientes a las concentraciones más bajas presentan una caída más pronunciada alcanzando niveles de color cercanos a 90 unidades. Este comportamiento genera un cambio en la señal cromática hacia tonos más rojizos o naranjas. En la Figura

19.d se puede observar que la DE alcanza valores cercanos a 90 – 100 unidades en la concentración más alta de creatinina. El ajuste lineal presenta un valor de R^2 ajustada de 0.976 y un límite de detección de 1.43 mg/dL.

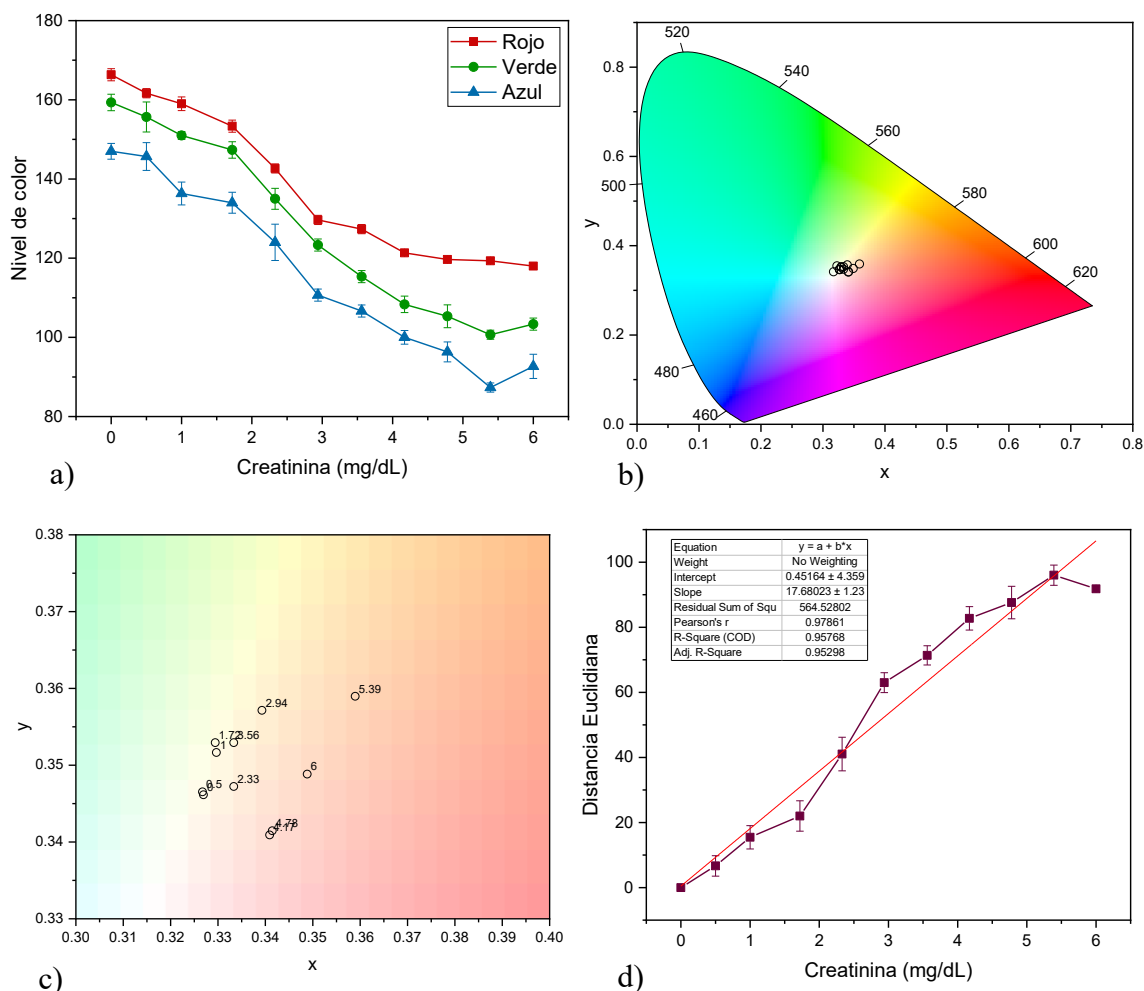


Figura 19. a) Detección colorimétrica de creatinina con V_2O_5 NWs, mediante análisis de niveles de color (RGB). b) Diagrama de cromaticidad CIE 1931 de los valores obtenidos. c) Visualización de los colores generados en el sistema de coordenadas cromáticas para cada concentración de creatinina. Cada marcador representa la respuesta cromática del biosensor colorimétrico frente a niveles específicos de creatinina. d) Curva de calibración de la distancia euclidiana obtenida a partir de los valores de RGB correspondientes al cambio de color frente a la concentración de creatinina.

Ahora bien, en el biosensor propuesto; el analito de interés es la creatinina, la cual se transforma mediante el mecanismo enzimático descrito en la Figura 3. Los resultados experimentales obtenidos respaldan dicho mecanismo; ya que, en la Figura 17.a, 18.a y 19.a se observa una caída gradual en los tres canales de color al aumentar la concentración del

sustrato correspondiente a cada figura, validando cada una de las etapas de la cascada enzimática; demostrando que los V_2O_5 NWs imitan eficazmente el comportamiento de la peroxidasa convencional. Al comparar la sensibilidad y linealidad de los tres metabolitos (sarcosina, creatina y creatinina) se pudo observar que el menor límite de detección corresponde a la sarcosina; sin embargo, la linealidad del sistema evaluado muestra que el uso de creatinina presenta menos sensibilidad que la sarcosina, pero es más relevante desde el punto biomédico, ya que su rango de detección coincide con los niveles fisiológicos de creatinina en suero sanguíneo canino.

Finalmente, con el objetivo de poder situar el desempeño del sistema desarrollado en el presente trabajo, éste se comparó contra diversos biosensores reportados en los últimos años para la detección de creatinina (Tabla 11); los cuales emplean diferentes métodos de detección, principalmente colorimétricos y electroquímicos. En donde los electroquímicos presentan los menores límites de detección, sin embargo estos necesitan de instrumentación especializada; mientras que los colorimétricos cuentan con diversas ventajas como su bajo costo y su detección visual. De manera más específica, el sistema propuesto en el trabajo demuestra un rendimiento competitivo al de los biosensores previamente reportados; aunque el límite de detección este dentro del rango de los otros biosensores colorimétricos reportados, su principal ventaja es la ausencia de instrumentación especializada, lo cual señala su potencial para la detección rápida y en tiempo real (3.5 min) en fluidos biológicos simulados.

Material	Método	Límite de detección	Muestra	Referencia
<i>Nanocompuesto $Cu_2/Pd/PPy$</i>	Amperométrico	0.05 μM	Orina	Nagarajan et al. (2023)
<i>Nanocompuesto CNT / $CuO@Cu_2O$ en electrodo de carbono</i>	Electroquímico	2 μM	PBS	Liang et al. (2025)
<i>Electrodo modificado con $AuNPs$+multienzimas</i>	Electroquímico	10 μM	Suero Sanguíneo	Yang et al. (2025)



<i>sobre un electrodo de carbono con membrana de Nafion</i>				
<i>Aptámero funcionalizado con AuNPs</i>	Colorimétrico	0.87 mM	Orina simulada	Das et al. (2024)
<i>Dispositivo basado en papel integrado con microfluidos digitales con reacción de Jaffé</i>	Colorimétrico	1.4 mg/dL	Orina simulada	Velasco et al. (2025)
<i>Plataforma lab-on-a-chip con ELISA colorimétrico; chip de microdepósitos + barra con anticuerpos.</i>	Colorimétrico	2 mg/dL	Suero fetal bovino	Karakuzu et al. (2022)
<i>Dispositivo basado en papel integrado con V_2O_5NWs inmovilizados en una matriz TBAB/Nafion</i>	Colorimétrico	1.43 mg/dL	Fluido simulado de plasma canino	Este trabajo

Tabla 12. Resumen comparativo de biosensores para la detección de creatinina y desempeño del sistema propuesto con V_2O_5 NWs.

VII. CONCLUSIONES

El desarrollo de biosensores colorimétricos basados en nanozimas es un campo con alto potencial para aplicaciones tanto clínicas como veterinarias. Durante el desarrollo de la presente tesis se abordó la síntesis, caracterización y aplicación de nanohilos de óxido de vanadio (V_2O_5 NWs) como nanozimas miméticas de la peroxidasa convencional, para poder implementar un sistema de detección para creatinina en muestras de suero sanguíneo canino con el fin de apoyar en el diagnóstico de la enfermedad renal crónica (ERC). Los resultados obtenidos permitieron cumplir con los objetivos planteados, al demostrar la viabilidad de los V_2O_5 NWs como material catalítico al aplicarlos en una plataforma colorimétrica y su uso práctico en la detección de creatinina.

En primer lugar, se logró una caracterización estructural y morfológica de los V_2O_5 NWs mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM), microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia Raman, confirmando la presencia de estructuras definidas lo cual tiene relación con lo reportado anteriormente en literatura. Dichos resultados pudieron validar la metodología de síntesis hidrotérmal utilizada; y a su vez, lograron evidenciar la morfología de nanohilos para poder favorecer las interacciones superficiales y los procesos de adsorción de las nanozimas. La morfología de nanohilos fue fundamental para poder obtener una alta área superficial y así poder tener una mayor eficiencia en la aplicación.

Por otro lado, los estudios cinéticos señalaron que durante los primeros minutos de reacción se presenta un incremento marcado en la actividad catalítica, lo cual confirma una rápida interacción con el sustrato, teniendo como tiempo de reacción idónea 3.5 min, lo cual permite una lectura en tiempo real. Estos resultados sustentan la hipótesis de que las nanozimas funcionan como alternativas frente a enzimas naturales. Se validó el desempeño del sistema propuesto en diferentes condiciones de pH y temperatura, teniendo las condiciones fisiológicas como óptimas (pH 7, 25°C).

En el desempeño analítico, se logró alcanzar un límite de detección en el rango micromolar, lo cual cubre los niveles fisiológicos de creatinina en suero sanguíneo canino. Los ensayos

colorimétricos presentaron una respuesta gradual y reproducible en función de la concentración del analito, lo cual fue evidenciado tanto por los valores de absorbancia como en los cambios generados en el espacio de color RGB y las coordenadas CIE 1931; lo cual le brinda una doble validación al biosensor, instrumental y visual, así permitiendo tener una señal fácil de interpretar por el ojo humano.

Un aspecto central de la investigación fue la inmovilización de los V_2O_5 NWs en una matriz de TBAB/Nafión soportados en papel Whatman tratado con *o*-dianisidina, lo cual le brindó una mayor estabilidad mecánica y química, para poder aplicarlo en dispositivos portátiles, de bajo costo y desechables. La propuesta desarrollada cuenta con nivel competitivo frente a otros tipos de biosensores elaborados basados en nanopartículas de oro, plata y enzimas naturales; ya que esta combina simplicidad, eficiencia y robustez que son aplicables al ámbito veterinario. Este biosensor presenta una alternativa para el monitoreo de la función renal en perros; ya que, el método convencional de Jaffe presenta varias desventajas como interferencias químicas, reactivos de alto costo y equipos de laboratorio especializados; en contraste, el biosensor basado en V_2O_5 NWs ofrece rapidez, detección en tiempo real y bajo costo. No obstante, también se identificaron algunas limitaciones, como la evaluación de la estabilidad del biosensor en condiciones de almacenamiento y validación a gran escala.

En conclusión, el presente trabajo demuestra que los V_2O_5 NWs constituyen nanozimas eficientes y viables para la construcción de un biosensor colorimétrico para la detección de creatinina en aplicaciones veterinarias; aportando en el campo de la nanotecnología aplicada a la biomedicina, mediante la modificación estructural de materiales inorgánicos, como el óxido de vanadio, para poder brindar comportamientos catalíticos específicos, imitando funciones biológicas sin la necesidad de utilizar biomoléculas naturales.

VIII. REFERENCIAS

- Abid Haleem;Mohd Javaid;Ravi Pratap Singh;Rajiv Suman;Shanay Rab; (2021). Biosensors applications in medical field: A brief review . Sensors International. doi:10.1016/j.sintl.2021.100100
- Active kidney Injury Biomarkers in the diagnosis of Kidney Diseases. IRIS. <https://www.iris-kidney.com/active-kidney-injury-biomarkers-in-the-diagnosis-of-kidney-diseases>
- Agnifili L, Pieragostino D, Mastropasqua A, et al. (2015). Molecular biomarkers in primary open-angle glaucoma. En: Progress in Brain Research. 1-32. doi:10.1016/bs.pbr.2015.05.006
- AIP Advances Editorial. (2023). Reaction-temperature-dependent bandgap and particle size in V_2O_5 nanostructures. AIP Advances, 13(1), 015010. <https://doi.org/10.1063/5.0123456>
- Alvarado-Ramírez, L., Rostro-Alanis, M., Rodríguez-Rodríguez, J., Sosa-Hernández, J. E., Melchor-Martínez, E. M., Iqbal, H. M., & Parra-Saldívar, R. (2021). Enzyme (single and multiple) and nanozyme biosensors: recent developments and their novel applications in the water-food-health nexus. Biosensors, 11(11), 410.
- Álvarez Menéndez, G. (2023). Desarrollo de un dispositivo Point of Care para el diagnóstico y seguimiento de patologías renales basado en un biosensor enzimático con detección electroquímica (Doctoral dissertation).
- Barberi, J., Ferraris, S., Giovannozzi, A. M., Mandrile, L., Piatti, E., Rossi, A. M., & Spriano, S. (2022). Advanced characterization of albumin adsorption on a chemically treated surface for osseointegration: An innovative experimental approach. *Materials & Design*, 218, 110712.
- Braun, J. P., Lefebvre, H. P., & Watson, A. D. J. (2003). Creatinine in the Dog: A Review. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(4), 162–179. doi:10.1111/j.1939-165x.2003.tb00332.x

- Bucio, K. D. G., & Rosales, C. C. (2024). Desarrollo de un multi-sensor colorimétrico de glucosa, colesterol y dopamina, orientado a la obesidad por síndrome de deficiencia de recompensa.
- Byrne, H. J., Bonnier, F., McIntyre, J., & Parachalil, D. R. (2020). Quantitative analysis of human blood serum using vibrational spectroscopy. *Clinical Spectroscopy*, 2, 100004.
- Chadha, U., Bhardwaj, P., Agarwal, R., Rawat, P., Agarwal, R., Gupta, I., ... & Chakravorty, A. (2022). Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 109, 21-51.
- Chen, X., Liao, J., Lin, Y., Zhang, J., & Zheng, C. (2023). Nanozyme's catalytic activity at neutral pH: reaction substrates and application in sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(18), 3817-3830.
- Chhillar, M., Kukkar, D., Deep, A., Yadav, A. K., & Kim, K. H. (2023). Zn²⁺/GNPs nanocomposite for highly selective colorimetric detection of creatinine in urine samples of CKD patients. *Inorganic Chemistry Communications*, 158, 111618.
- Cornish-Bowden, A. (2015). One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. *Perspectives in Science*, 4, 3-9.
- Correal, S., Martínez, D., & Rincón, C. (2023). Sol–gel synthesis of V₂O₅ nanoparticles: Structure, bandgap and catalytic properties. *Scientific Reports*, 13, 5512. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32779-5>
- Creatinine (Dog). IRIS. <https://www.iris-kidney.com/new-page-1>
- Curia, M. V. (2010). Estudio fisicoquímico y catalítico del sistema Mn-OV (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Das, B., Franco, J. L., Logan, N., Balasubramanian, P., Kim, M. I., & Cao, C. (2021). Nanozymes in point-of-care diagnosis: an emerging futuristic approach for biosensing. *Nano-micro letters*, 13(1), 193.
- Das, C., Raveendran, J., Bayry, J., & Rasheed, P. A. (2024). Selective and naked eye colorimetric detection of creatinine through aptamer-based target-induced passivation of gold nanoparticles. *RSC advances*, 14(46), 33784-33793.



- Das, R., Mukherjee, M., & Sen, P. (2024). Colorimetric biosensors for creatinine detection: Advances and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 235, 115620. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.115620>
- De Fisiología Celular Unam. Instituto de Fisiología Celular UNAM. <https://www.ifc.unam.mx/tem.php>
- De la Macorra García, C., Brizard, A., Rincón, P., & Sánchez, R. (2004). Estudio Cinético de la Descomposición del Peróxido de Hidrógeno en Condiciones de Extrema Alcalinidad. *Tecnología y desarrollo*, 2, 13.
- Delgado-Herrera, J., Quinchía-Giraldo, M., Portillo-Paba, J. A., Solar-Vega, R. S., Cordoba-Pacheco, L. S., & Meza-Fernández, M. E. (2024). Concordancia entre Simetría Dimetilarginina (SDMA) y la Creatinina para Evaluación de Daño Renal en Caninos Senior en dos Clínicas Veterinarias de Valledupar.
- Dhananjaya, M., Prakash, N. G., Narayana, A. L., & Hussain, O. M. (2018). Microstructural and supercapacitive properties of one-dimensional vanadium pentoxide nanowires synthesized by hydrothermal method. *Applied Physics A*, 124(2), 185.
- Díaz Ortega, M., & Cerda Saldaña, G. (2015). Comparación de los niveles de glucosa sanguínea en perros adultos cuantificados mediante glucómetro portátil y ensayo enzimático colorimétrico.
- Ding, H., Zhang, J., & Li, Y. (2020). Vanadium oxide nanomaterials as peroxidase mimics for biosensing applications. *Analytica Chimica Acta*, 1125, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.025>
- Ding, Y., Zhang, H., Li, X., & Chen, Y. (2020). V₂O₅ nanobelts mimic tandem enzymes to achieve cascade reactions for biosensing. *Analytical Chemistry*, 92(16), 11319–11327. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05872>
- Enzymatic Assay of peroxidase (EC 1.11.1.7). (s.f.). <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-peroxidase?srltid=AfmBOorzBWsSsGqHsGlDNyK83wwjQ2c8PxBzDbDCr-IC7Dprh0yDmTf>

- Europe PMC. (2016). Europe <https://europepmc.org/article/med/19253273>
- Fairchild, M. D. (2013). Color appearance models. John Wiley & Sons.
- Feng, S., Shi, R., Xu, P., Bhamore, J. R., Bal, J., Baek, S. H., ... & Park, T. J. (2020). Colorimetric detection of creatinine using its specific binding peptides and gold nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 44(37), 15828-15835.
- Gao, L., Yan, X., & Zhao, M. (2024). Nanozyme-based biosensors: Recent advances and future directions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 171, 117156. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117156>
- García, C. A. R. (2023). Inmovilización de peroxidasa del rábano picante sobre nanopartículas de plata para detección de oxitetraciclina en miel de abeja.
- Ghosh, A., Verma, P. y Nanda, KK (2020). Nanozimas de óxido de vanadio con control morfológico y actividad similar a la de la glutatión peroxidasa para la regulación del estrés oxidativo. *Materials Today*, 36, 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.05.018>
- Glencoe Animal Hospital and Kennel. (2019) CREATININE LEVEL – Canine <https://glencoeanimalhospital.com/creatinine-level-canine/#:~:text=The%20creatinine%20level%20is%20an,for%20abnormalities%20involving%20the%20kidneys>.
- Guan, J., Xiong, Y., Wang, M., Liu, Q., & Chen, X. (2024). A novel functionalized CdTe@ MOFs based fluorometric and colorimetric biosensor for dual-readout assay of creatinine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 399, 134842.
- Gutiérrez, C. M. (2003). Caracterización de Muestras Biomédicas por Espectroscopia Raman. Centro de Investigaciones en Óptica, AC, León Guanajuato, Tesis.
- Hu, P., Hu, P., Vu, T. D., Li, M., Wang, S., Ke, Y., ... & Long, Y. (2023). Vanadium oxide: phase diagrams, structures, synthesis, and applications. *Chemical Reviews*, 123(8), 4353-4415.
- Huang, Y., Ren, J., & Qu, X. (2019). Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications. *Chemical reviews*, 119(6), 4357-4412.

- INEGI. (2022). Comunicado de prensa: Estadísticas nacionales. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia/7021>
- Inshyna, N. M., Chorna, I. V., Primova, L. O., Hrebenyk, L. I., & Khyzhnia, Y. V. (2020). Biosensors: Design, classification and application.
- Jeon, H. J., Kim, H. S., Chung, E., & Lee, D. Y. (2022). Nanozyme-based colorimetric biosensor with a systemic quantification algorithm for noninvasive glucose monitoring. *Theranostics*, 12(14), 6308.
- Jeyachandran, Y. L., et al. (2023). Smartphone-assisted colorimetric biosensors: Design strategies and clinical applications. *Sensors*, 23(7), 3450. <https://doi.org/10.3390/s23073450>
- Jimenez Valencia, A. M., Kryszak, L. A., Goheen, J., Van Roy, W., Woronoff, G., Mathieu, E., ... & Clarke, W. A. (2021). Rapid quantification of plasma creatinine using a novel kinetic enzymatic assay. *The journal of applied laboratory medicine*, 6(3), 688-701.
- Karakuzu, B., Tarim, E. A., Oksuz, C., & Tekin, H. C. (2022). An electromechanical lab-on-a-chip platform for colorimetric detection of serum creatinine. *ACS omega*, 7(29), 25837-25843.
- Khan, H., Raza, M., Barek, J., Imran, M. (2023) Cancer biomarkers and their biosensors: A comprehensive review. *Trends in Analytical Chemistry*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116813>.
- Kim, H. J., et al. (2020). Evaluation of serum biomarkers for early detection of chronic kidney disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(6), 2231–2239. <https://doi.org/10.1111/jvim.15876>
- Ko, T. R., Lin, C.-H., Chen, P.-C., & Huang, T.-H. (2022). Oxygen-deficient V₂O₅ with enhanced peroxidase-like activity for colorimetric biosensing. *Chemical Engineering Journal*, 439, 135740. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135740>
- Küme, T., Sağlam, B., Ergon, C., & Sisman, A. R. (2018). Evaluation and comparison of Abbott Jaffe and enzymatic creatinine methods: Could the old method meet the new requirements?. *Journal of clinical laboratory analysis*, 32(1), e22168.



- Laboratorio Microscopio de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM). Facultad De Ciencias Físicas Y Matemáticas - Universidad De Chile. <https://ingenieria.uchile.cl/investigacion/laboratorios/departamento-de-geologia/laboratorio-microscopio-de-transmision-de-alta-resolucion-hr-tem>
- Latham K. (2021) Serum vs. Plasma. Biology Dictionary. <https://biologydictionary.net/serum-vs-plasma/>
- Lee, S. H., et al. (2024). Biomarkers of kidney injury and their clinical relevance in veterinary medicine. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1423341. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1423341>
- Leonardo Gomez, E. M. (2018). Catálisis. Catálisis enzimática. Concepto. Definición. Aplicaciones. Integración de la ecuación de velocidad de reacciones catalíticas Hipótesis del estado estacionario. Hipótesis del pre-equilibrio Mecanismo de reacciones enzimáticas. Mecanismo de Michaelis Menten.
- Li, J., Wang, Z., & Chen, X. (2024). V₂O₅ nanozymes with cascade catalytic activity for colorimetric biosensing. *ACS Applied Nano Materials*, 7(3), 2356–2367. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c04215>
- Li, T., Wang, X., Wang, Y., Zhang, Y., Li, S., Liu, W., ... & Wei, H. (2024). Microenvironmental modulation breaks intrinsic pH limitations of nanozymes to boost their activities. *Nature Communications*, 15(1), 10861.
- Li, T., Zhang, Q., & Xu, H. (2024). Microenvironmental modulation expands pH operating windows of enzyme-mimicking nanozymes. *Science Advances*, 10, eadk1234. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adk1234>
- Liang, M., & Yan, X. (2019). Nanozymes: From New Concepts, Mechanisms, and Standards to Applications. *Accounts of Chemical Research*. doi:10.1021/acs.accounts.9b00140
- Liang, T., Zhang, Y., Guo, J., Lv, J., Hu, T., Guo, X., ... & Guo, L. (2025). Unveiling Superior Creatinine Detection: Advanced Electrochemical Biosensor with Remarkable Sensitivity. *Materials Advances*.



- Lin, S., Wu, J., Yao, J., Cao, W., Muhammad, F., & Wei, H. (2018). Nanozymes for Biomedical Sensing Applications. *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials*, 171–209. doi:10.1016/b978-0-323-50878-0.00007-0
- Ling, Y., Fan, H., Wang, K., Lu, Z., Wang, L., Hou, C., ... & Wang, H. (2022). Electrochemical actuators with multicolor changes and multidirectional actuation. *Small*, 18(15), 2107778.
- Lutz, C., Breuckmann, M., Hampel, S., Kreyenschmidt, M., Ke, X., Beuermann, S., ... & Fittschen, U. E. (2021). Characterization of dimeric vanadium uptake and species in nafion™ and novel membranes from vanadium redox flow batteries electrolytes. *Membranes*, 11(8), 576.
- Madera Santos, B., & Ruiz Barrios, E. M. (2023). Síntesis verde de nanopartículas de Ag a partir de biomasa vegetal para la determinación de Hg mediante colorimetría digital-Smartphone.
- Malik, P., Sharma, R., & Singh, A. (2024). Paper-based biosensors integrated with smartphone detection: Emerging tools for point-of-care diagnostics. *Biosensors*, 14(2), 112. <https://doi.org/10.3390/bios14020112>
- Malik, S., Singh, J., Goyat, R., Saharan, Y., Chaudhry, V., Umar, A., ... & Baskoutas, S. (2023). Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review. *Heliyon*, 9(9).
- Mao, H., Xu, F., Wang, J., & Li, J. (2024). Oxygen-vacancy and heterojunction co-boosted peroxidase-like KV_6O_{15}/V_2O_5 nanoribbons for sensitive colorimetric assays. *Microchemical Journal*, 198, 109566. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109566>
- Martínez, C. B., Gómez, N. T., Gutiérrez, D. I. G., & Néstor, A. R. V. (2022). Síntesis hidrotermal de nanomateriales. *Materiales Avanzados y Nanomateriales: Aprovechamiento de fuentes naturales y sus beneficios al medio ambiente*, *OmniaScience*, 239-280.
- Materials Project. (2023). V_2O_5 (mp-1970) . Recuperado de <https://materialsproject.org/materials/mp-1970>
- Materials Project. (2025). V_2O_5 (Orthorhombic, Pmmn). mp-25279 / mp-624689. <https://materialsproject.org>

- Melo Tinjaca, A. N., & Barreto Vega, O. F. (2024). Revisión de literatura: generalidades de la enfermedad renal crónica en caninos.
- Monroy Rodríguez, J. (2023). " Conversaciones" entre humanos y mascotas.
- Morales Urrea, D. A. (2020). Desarrollo de biocatalizadores inmovilizados para el tratamiento de efluentes líquidos industriales (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ingeniería; Argentina).
- Mwakikunga, B. W., Maaza, M., Hillie, K. T., Arendse, C. J., Malwela, T., & Sideras-Haddad, E. (2012). From phonon confinement to phonon splitting in flat single nanostructures: A case of VO₂@ V₂O₅ core-shell nano-ribbons. *Vibrational Spectroscopy*, 61, 105-111.
- Nagarajan, A., Sethuraman, V., & Sasikumar, R. (2023). Non-enzymatic electrochemical detection of creatinine based on a glassy carbon electrode modified with a Pd/Cu 2 O decorated polypyrrole (PPy) nanocomposite: an analytical approach. *Analytical Methods*, 15(11), 1410-1421.
- Naresh, V., & Lee, N. (2021). A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors*, 21(4), 1109.
- Natalio, F., André, R., Hartog, AF, Stoll, B., Jochum, KP, Wever, R. y Tremel, W. (2020). Nanocables de pentóxido de vanadio y su uso como imitadores de haloperoxidasas de vanadio. *Nature Nanotechnology* , 15(2), 161–166. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0600-3>
- Nguyen, Q. H., & Kim, M. I. (2020). Nanomaterial-mediated paper-based biosensors for colorimetric pathogen detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, 116038.
- Nunes, D., Pimentel, A., Santos, L., Barquinha, P., Pereira, L., Fortunato, E., & Martins, R. (2018). Metal oxide nanostructures: synthesis, properties and applications. Elsevier.
- Orsino, C. M. (2020). Influence of Sidechain Structure and Interactions on the Physical Properties of Perfluorinated Ionomers.
- Penagos, J. I. C. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3), 133-146.



- Perazzi, B., & Angerosa, M. (2011). Creatinina en sangre: calidad analítica e influencia en la estimación del Índice de Filtrado Glomerular. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 45(2), 265-272.
- Pérez-Sánchez, A. P., Perini-Perera, S., Del-Angel-Caraza, J., & Quijano-Hernández, I. A. (2023). Correlación de biomarcadores de función renal en el primer acercamiento diagnóstico de la enfermedad renal crónica en perros. *Revista MVZ Córdoba*, 28(1), e2782. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2782>
- Perini-Perera, J., et al. (2021). Chronic kidney disease in dogs: Pathophysiology and diagnostic challenges. *Veterinary Sciences*, 8(4), 65. <https://doi.org/10.3390/vetsci8040065>
- Qian, C., Liu, Y., & Zhou, J. (2022). Recent progress in nanozyme-based biosensors for biomedical applications. *Nano Today*, 44, 101512. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2022.101512>
- Quintero Rivas, S. A., Vega Pérez, F. A., & Sarmiento Monsalve, J. T. (2024). Biosensores moleculares (colorimétricos, fluorimétricos o electroquímicos) para la detección de hepatitis B y C: Estado actual y perspectivas en el contexto colombiano.
- Rackauskas, S., Nasibulin, A. G., Jiang, H., Tian, Y., Kleshch, V. I., Sainio, J., ... & Kauppinen, E. I. (2009). A novel method for metal oxide nanowire synthesis. *Nanotechnology*, 20(16), 165603.
- Rivas, J. C. L. (2024). Cinta para detección colorimétrica multi-sensora para marcadores de daño renal.
- Rodríguez, D. O., Medina, L. M. C., González, R. G. G., & Jaramillo, A. A. F. (2024). Biosensores ópticos para el monitoreo de fosfato. *Digital Ciencia@ UAQRO*, 17(2), 71-82.
- Ruiz Vila, R. (2017). Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de vanadio por descomposición térmica.
- Salazar, i. F. E. C. (2008). Facultad de ingeniería análisis de los diagramas de color de la cie en la televisión (doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México).

- Sanhueza Martínez, J. F. (2024). Relación entre la producción de peróxido de hidrógeno en miel y su contenido de flavonoles, flavonas y cationes de hierro y cobre.
- Santillana Ormaeche, C. V. (2021). Perfil hematológico y bioquímico de caninos gerontes para el tratamiento que mejore su bienestar, Bellavista, 2020.
- Shalileh, S., et al. (2023). Smartphone-based colorimetric assays for clinical biomarker detection: Trends and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415, 2281–2295. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04756-9>
- Sivasankaran, U., Jos, T. C., & Kumar, K. G. (2018). Selective recognition of creatinine—development of a colorimetric sensor. *Analytical biochemistry*, 544, 1-6.
- Strimbu K, Tavel JA (2010). What are biomarkers? *Current Opinion In HIV And AIDS*. 5(6):463-466. doi:10.1097/coh.0b013e32833ed177
- Sun, J., Li, C., Qi, Y., Guo, S., & Liang, X. (2016). Optimizing colorimetric assay based on V2O5 nanozymes for sensitive detection of H2O2 and glucose. *Sensors*, 16(4), 584.
- Tarim, E. A., & Tekin, H. C. (2024). Colorimetric detection of serum creatinine on a miniaturized platform using hue-saturation-value space analysis. *Scientific Reports*, 14(1), 19441.
- Tarim, U. A., et al. (2024). Portable colorimetric biosensor for creatinine detection with high sensitivity. *Biosensors*, 14(5), 362. <https://doi.org/10.3390/bios14050362>
- Valderrama, J. J. A., Pérez, C. A. D. P., Sánchez, M. B., & Figueroa, T. A. C. (2022). Incursionando en el Mercado Pet Care. In *Vestigium Ire*, 16(2), 26-46.
- Velasco, L. G., Rocha, D. S., de Campos, R. P., & Coltro, W. K. (2025). Integration of paper-based analytical devices with digital microfluidics for colorimetric detection of creatinine. *Analyst*, 150(1), 60-68.
- Wang, Y., Su, Q., Chen, C. H., Yu, M. L., Han, G. J., Wang, G. Q., ... & Liu, X. Q. (2010). Low temperature growth of vanadium pentoxide nanomaterials by chemical vapour deposition using VO (acac) 2 as precursor. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 43(18), 185102.
- Wang, Z., Zhang, R., Yan, X., & Fan, K. (2020). Structure and activity of nanozymes: Inspirations for de novo design of nanozymes. *Materials Today*, 41, 81-119.

- Xie, J., Zhang, C., Li, H. y Yang, W. (2021). Mecanismos catalíticos y aplicaciones biomédicas de nanozimas basadas en vanadio. *ACS Nano* , 15(4), 7531–7547. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c09340>
- Yang, J., Yu, R., Zhang, W., Wang, Y., & Deng, Z. (2025). Electrochemical Determination of Creatinine Based on Multienzyme Cascade-Modified Nafion/Gold Nanoparticles/Screen-Printed Carbon Composite Biosensors. *Sensors*, 25(13), 4132.
- Yang, J., Yu, X., & Liu, J. (2024). Advances in enzyme-mimicking nanomaterials for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 233, 115413. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.115413>
- Yang, L., Xu, X., Song, Y., Huang, J., & Xu, H. (2024). Research progress of nanozymes in colorimetric biosensing: Classification, activity and application. *Chemical Engineering Journal*, 487, 150612
- Zeng, L., Zhao, Y., & Wu, X. (2023). Vanadium-based nanozymes: Catalytic mechanisms and biomedical applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 21, 150. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01823-6>
- Zeng, X., Wang, H., Ma, Y., Xu, X., Lu, X., Hu, Y., ... Li, J. (2023). Vanadium oxide nanozymes with multiple enzyme-mimic activities for catalytic biosensing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(11), 13768–13779. <https://doi.org/10.1021/acsaami.2c20878>
- Zhang, R., Yan, X., Gao, L., & Fan, K. (2025). Nanozymes expanding the boundaries of biocatalysis. *Nature Communications*, 16(1), 6817.
- Zhang, X., Chen, X., & Zhao, Y. (2022). Nanozymes: versatile platforms for cancer diagnosis and therapy. *Nano-Micro Letters*, 14(1), 95.
- Zhu, D., Liu, B., & Wei, G. (2021). Two-dimensional material-based colorimetric biosensors: A review. *Biosensors*, 11(8), 259.
- Zhu, L. Y., Li, Y. C., Liu, J., He, J., Wang, L. Y., & Lei, J. D. (2022). Recent developments in high-performance Nafion membranes for hydrogen fuel cells applications. *Petroleum Science*, 19(3), 1371-1381.