

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**SENSOR MICROFLUÍDICO COLORIMÉTRICO DE
LACTOSA, PH ÁCIDO LÁCTICO, Y COLESTEROL
PARA MEDICIÓN DE LA CALIDAD DE LECHE
BOVINA**

T E S I S

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

**P R E S E N T A:
FLORENCIA AYLEN TENNANT**

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.

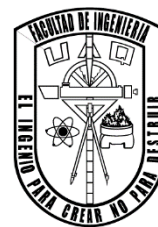
Avisos:

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
Facultado de Ingeniería



Especialidad en Ingeniería en Nanotecnología

**“SENSOR MICROFLUÍDICO COLORIMÉTRICO DE
LACTOSA, PH ÁCIDO LÁCTICO, Y COLESTEROL PARA
MEDICIÓN DE LA CALIDAD DE LECHE BOVINA”**

TESIS

Que como para obtener el grado de
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Florencia Aylen Tennant

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Presidente

Firma

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Secretario

Firma

Dra. Alejandra Álvarez López

Vocal

Firma

Dra. Sandra Virginia Rivas Gándara

Sinodal

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Junio, 2024

RESUMEN

Uno de los alimentos más consumidos por la población mundial es la leche bovina, es considerado un producto completo con proteínas, grasas, vitaminas, carbohidratos y minerales. El monitoreo de la frescura y ciertos parámetros de calidad es importante para garantizar la inocuidad alimentaria.

La leche es un producto en el que se evalúa mediante análisis que monitorea la composición y los factores que generan un deterioro del producto. Esta composición es variada en función de fisiología, alimenticios y tecnologías utilizadas en la producción. Existen valores predeterminados esperados en la composición de la leche, pero si los valores medidos no se encuentran en este rango se considera una anomalía.

El estándar de los componentes de regula en la industria dependiendo del tipo de leche que se quiere comercializar. Los métodos analíticos son necesarios para garantizar la calidad fisicoquímica, microbiológica y la estabilidad de las materias primas, los procesos y sus productos. Los analitos de interés expuestos en este trabajo son: el ácido láctico, la lactosa y el colesterol.

La leche bovina contiene un 5% en peso de lactosa, indigerible para cierto sector de la población, y el correcto control de la lactosa es indispensable para el acceso a este sector de consumidores.

La presencia de proteínas, minerales y dióxido de carbono es lo que determina la acidez natural de la leche de vaca. Sin embargo, la actividad de las bacterias que utilizan la lactosa como nutriente, descomponiéndola en ácido láctico, puede aumentar la acidez.

Por último, el colesterol es precursor metabólico de los ácidos biliares, hormonas y vitamina D, por lo que es necesario para los sistemas metabólicos. Además juega un papel integral en el transporte de lípidos; igualmente el abuso del consumo del colesterol contribuye al incremento de enfermedades cardiovasculares.

Es un tema de interés encontrara métodos de detección rápidos y eficientes para valorar la calidad de la leche. El desarrollo de biosensores microfluídicos colorimétricos utilizando enzimas y nanomateriales es prometedor, utilizando las propiedades químicas y ópticas del cambio de color en presencia de estos analitos como herramienta útil de detección *in situ*.

Palabras clave: nanotecnología, lactosa, ácido láctico, colesterol, biosensor, colorimetría, calidad de la leche bovina.

ABSTRACT

One of the most consumed foods by the world's population is bovine milk, which is considered a complete product with proteins, fats, vitamins, carbohydrates and minerals. Monitoring freshness and certain quality parameters is important to ensure food safety.

Milk is a product that is evaluated by analysis that monitors the composition and factors that generate a deterioration of the product. This composition varies according to physiology, food and technologies used in production. There are predetermined values expected in the composition of milk, but if the measured values are not in this range, it is considered an anomaly.

The standard of the components is regulated in the industry depending on the type of milk to be marketed. Analytical methods are necessary to guarantee the physicochemical and microbiological quality and stability of raw materials, processes and their products. The analytes of interest in this work are: lactic acid, lactose and cholesterol.

Bovine milk contains 5% by weight of lactose, which is indigestible for a certain sector of the population, and the correct control of lactose is essential for access to this sector of consumers.

The presence of proteins, minerals and carbon dioxide is what determines the natural acidity of cow's milk. However, the activity of bacteria that use lactose as a nutrient, breaking it down into lactic acid, can increase the acidity.

And finally, cholesterol is a metabolic precursor of bile acids, hormones and vitamin D. It is required for metabolic systems, and plays an integral role in lipid transport; likewise, abuse of cholesterol intake contributes to increased cardiovascular disease.

It is a matter of interest to find fast and efficient detection methods to assess milk quality. The development of colorimetric microfluidic biosensors using enzymes and nanomaterials is promising, using the chemical and optical properties of color change in the presence of these analytes as a useful *in situ* detection tool.

Keywords: nanotechnology, lactose, lactic acid, cholesterol, biosensor, colorimetry, bovine milk quality.

Dedicatoria

Para mi madre

Agradecimientos

Gracias a Dios.

A mis padres, les agradezco profundamente por su inquebrantable apoyo y constante impulso. Este logro no hubiera sido posible sin su amor incondicional. Les agradezco por dedicar su tiempo en revisar planes de estudio a mi lado, por sostenerme en todos los aspectos, por la invaluable compañía en cada etapa de este viaje, por sus consejos, por las deliciosas comidas que me reconfortaron en momentos difíciles. Gracias, mamá, por nutrirme. Gracias, papá, por tu sustento. Ángel, gracias por involucrarte.

A mis queridos amigos, hermanos de otra madre, compañeros de camino. Quienes brindaron apoyo y compañía en los momentos de agotamiento y celebraron mis avances a mi lado. Andrea Q., Pau L., Jesús P. y Alonso T., Elihú R., Efrén L., su amistad ha sido un tesoro invaluable.

Expreso mi sincero agradecimiento a los doctores que compartieron generosamente su conocimiento y orientación. Al Dr. Juan de Dios, por su paciencia, apertura y dedicación incansable, y a las Dras. Sandra, Alejandra y Vanessa, por abrirme las puertas de Biosens y contribuir significativamente a mi crecimiento profesional.

A mi familia, quienes vivieron conmigo y aguantaron mis frustraciones y estrés, quienes me han alzado los ánimos y quienes siempre demuestran interés. Familiares que desde Argentina y España se acuerdan de mí y me brindan ánimo, y a mi familia en México que me acompaña en cada paso. Gracias a mi abuela Sabina por tantas oraciones, y a Oma por el aliento.

No puedo dejar de agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro, al Fondo para el Desarrollo del Conocimiento FONDEC-UAQ y al proyecto de Nuevos Talentos Científicos 2022 por su invaluable respaldo, proporcionando los recursos, el tiempo y el espacio necesarios para llevar a cabo esta investigación y contribuir a mi desarrollo académico y personal.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi esposo, Felipe, cuyo apoyo inquebrantable y aliento constante han sido el motor que impulsa mi camino. Su compañía incondicional y su amor han sido empuje en esta etapa. Juntos hemos enfrentado desafíos y celebrado triunfos, y estoy profundamente agradecida por su presencia en mi vida

Por último, quiero reconocer a mi constante compañía, Suri, quien fue mi fiel compañera durante cada hora dedicada a este trabajo y quien se sentó a mi lado tantas horas de estudio haciéndome más ameno este camino.

Contenido

Contenido

1	Introducción.....	1
2	Planteamiento del problema	2
3	Justificación.....	4
4	Objetivos.....	6
4.1	Objetivo general	6
4.2	Objetivos específicos.....	6
5	Hipótesis	6
6	Marco Teórico	7
6.1	Calidad de los alimentos	7
6.2	Los biosensores enzimáticos	8
6.3	Inmovilización enzimática	9
6.3.1	Adsorción.....	11
6.3.2	Unión covalente	11
6.3.3	Atrapamiento	12
6.3.4	Cross-linking (biconjugación)	12
6.4	Los nanomateriales en la inmovilización enzimática	13
6.5	Nanopartículas de quitosano	14

6.5.1	Quitina y quitosano	14
6.5.2	Propiedades del quitosano.....	16
6.5.3	Síntesis de NPs.....	17
6.6	Presencia de lactato en la leche bovina	18
6.6.1	Relación del pH.....	20
6.6.2	Lactato oxidasa.....	20
6.7	Presencia del colesterol en la leche bovina	21
6.7.1	Colesterol oxidasa	22
6.8	Presencia de lactosa en la leche bovina.....	23
6.8.1	Lactasa.....	25
6.8.2	Glucosa oxidasa.....	26
6.8.3	Peroxidasa	27
7	Antecedentes.....	29
7.1	Sensores microfluídicos para aplicación alimenticia.....	29
7.2	Sensores colorimétricos para aplicación alimenticia	32
7.3	Sensores colorimétricos para la medición de analitos de la leche bovina.....	34
8	Metodología	36
8.1	Preparación	36
8.2	Diseño de prototipo	36
8.3	Síntesis de nanoesferas de quitosano	37
8.4	Inmovilización de enzimas en nanopartículas de quitosano	37

8.5	Análisis colorimétrico cuantitativo para determinar las concentraciones de los marcadores	38
8.6	Ensayo enzimático del colesterol oxidasa	38
8.7	Ensayo enzimático lactosa.....	40
8.8	Ensayo enzimático del lactato oxidasa	42
9	Resultados y discusión	45
9.1	Biosensor de colesterol	47
9.1.1	Evaluación de la actividad enzimática de la enzima colesterol oxidasa inmovilizada y en estado libre dependiente del pH.....	47
9.1.2	Evaluación de la actividad enzimática de la enzima colesterol oxidasa inmovilizada y en estado libre dependiente de la temperatura.....	48
9.1.3	Acoplamiento enzimático del colesterol oxidasa sobre diferentes soportes	50
9.1.4	Pruebas colorimétricas para la detección enzimática de colesterol con colesterol oxidasa.....	51
9.2	Biosensor de lactosa.....	58
9.2.1	Pruebas colorimétricas para la detección enzimática de colesterol con colesterol oxidasa.....	58
9.3	Biosensor de ácido láctico	62
9.3.1	Pruebas colorimétricas para la detección enzimática de ácido láctico con lactato oxidasa	62
9.4	Nano-esferas de quitosano	45
9.4.1	Caracterización SEM.....	45
9.4.2	Caracterización Raman.....	46
10	Conclusiones	66

Anexos.....	67
Referencias.....	67

1 Introducción

La leche de vaca es uno de los alimentos más consumidos por la población mundial. Se estima que el consumo de leche debería de ser entre 2-4 raciones al día, según la FESNAD (Federación Española de Sociedades de Nutrición y Dietética), donde cada ración equivale a aproximadamente 250 mililitros. Se necesita cubrir cierta cantidad diaria para poder abastecer las necesidades exigentes del mercado. Este alimento es considerado como uno de los productos más completos; contiene proteínas, grasas, vitaminas, carbohidratos y minerales haciéndolo un medio óptimo de cultivo microbiano, por lo cual, el monitoreo de la frescura y ciertos parámetros de calidad es importante para garantizar la inocuidad alimentaria. (Moreno Aznar et al., 2013).

La calidad de la leche es fundamental para garantizar que llegue en buen estado a los consumidores, así como para la calidad de los productos lácteos derivados de esta. Aproximadamente el 20% de la leche cruda producida en México se destina a la producción de leche pasteurizada y ultrapasteurizada (SIAP-SAGARPA 2012). El análisis de este producto, de las características en menor o mayor medida constantes, determinan también el proceso que se debe seleccionar o los métodos a utilizar según el producto derivado que se desee obtener. Tiene ciertos parámetros que se deben monitorear; debe poseer un contenido de bacterias bajo, así como una composición y acidez normales, de los cuales los rangos aceptables han sido establecidos según las normas establecidas en la NOM-155-SCFI-2012. (En Tuxtepec & México Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios, 2015).

La presencia de proteínas, minerales y dióxido de carbono contribuye a la acidez natural de la leche. Sin embargo, también puede producir más acidez porque las bacterias descomponen la lactosa de la leche en ácido láctico. Es por esto por lo que se debe determinar la acidez total, una alta acidificación es indicativo de la presencia de muchos microorganismos. Una disminución del pH puede indicar un mal almacenamiento o manipulación (Alais, 1985). Se estima que las pérdidas de este producto durante el procesamiento industrial son del 2,31% en volumen en comparación con los litros acopiados por las diferentes empresas. Esto se debe a algunas variaciones en el rango aceptado de los diferentes componentes monitoreados para garantizar la calidad de la leche. (Rodríguez López, M. 2016). El constante monitoreo reduciría las ineficiencias del proceso industrial y permitirá adecuarse según las necesidades del producto a procesar. Además, el monitoreo de los compuestos es crucial porque está directamente relacionado con la salud del consumidor. Se requiere un control adecuado de lactosa y lípidos para garantizar el etiquetado y el manejo de procesos correctos.

La leche bovina contiene un 5% en peso de lactosa. Este azúcar es indigerible para cierto sector de la población, alrededor del 8% de la población de México (Martínez Vázquez, S.E. 2020 in press), debido a la incapacidad del organismo de producir lactasa. Este padecimiento se manifiesta como un síndrome de intestino irritable. Es por esto por lo que el correcto control de la lactosa es indispensable para el correcto etiquetado para garantizar el acceso de este producto a ese sector de consumidores. La leche bovina es un importante componente de la dieta humana, sirviendo como medio de suministro para cruciales moléculas incluyendo el colesterol. El colesterol es un precursor metabólico de los ácidos biliares, esteroide hormonas y vitamina D. Es de vital importancia para los sistemas metabólicos que participan en la síntesis de ADN y la división celular, así como el transporte de lípidos. La molécula orgánica llamada colesterol sirve para mantener la temperatura de la membrana celular. Los altos niveles de colesterol aumentan el riesgo de enfermedades cardíacas y estrechan las arterias. El control de los niveles de colesterol en los productos lácteos es crucial porque tiene un impacto en la salud de los consumidores. Los tipos de colesterol incluyen lipoproteína de baja densidad (LDL) o colesterol malo, y lipoproteína de alta densidad (HDL) o colesterol bueno (Do et al., 2022).

Se representa como un problema resolver encontrar métodos de detección rápidos y eficientes para valorar la calidad de la leche bovina debido a que es un producto comercial que genera muchos beneficios económicos. El uso de enzimas y de nanomateriales como soporte puede ayudar a crear biosensores microfluídicos colorimétricos que puedan medir parámetros cruciales en la leche sin la necesidad de realizar análisis de laboratorio que pueden tardar, lo que beneficia a las personas que se encargan de monitorear la calidad de la leche.

2 Planteamiento del problema

Uno de los alimentos más antiguos que los humanos han consumido es la leche, que se remonta a la domesticación de animales, el descubrimiento posterior del ordeño y las diversas formas en que se puede conservar y usar, principalmente la leche bovina. El consumo de la leche y sus productos lácteos constituye una parte importante de los alimentos que componen la dieta habitual de la población (del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2013) Se considera tradicionalmente un alimento con un alto contenido de nutrientes en comparación con el contenido calórico: contiene hidratos de carbono (principalmente lactosa), grasas, vitaminas, minerales y proteínas de alto calor biológico debido a la presencia de aminoácidos. La leche contiene vitaminas liposolubles e hidrosolubles, así como fósforo, magnesio, zinc y selenio (Sánchez et al., 2020) . Debido en parte a que el calcio y el fósforo de la leche se combinan con la caseína, son muy fáciles de digerir.

Podría decirse que la leche bovina es un alimento esencial para la alimentación humana en todas las etapas de la vida. Por lo tanto, el procesamiento industrial es crucial para permitir

el acceso generalizado a su consumo por parte de la población, lo que contribuye significativamente al nivel de salud (Fernández et al., 2015).

El crecimiento de la población, el poder adquisitivo de los países, las negociaciones internacionales y las políticas de apoyo a la producción son algunos de los factores que tienen un impacto en el consumo y comercio mundial de los lácteos. El aumento de la población es la principal causa del aumento en el consumo de productos lácteos. Muchas naciones priorizan la producción y distribución de leche.

En México, la definición de leche va de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 155, es “el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; tales como clarificación, homogenización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con sus especificaciones de denominación” (NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, 2012). Se sabe que la leche de vaca no se debe ingerir en su estado crudo, ya que puede contener agentes patógenos que puedan dañar la salud (Maza Pastrana et al., 2011).

El desarrollo de la ganadería lechera como producto principal y su relación a la industria y comercialización en México es un tema económico importante. Históricamente ha habido una brecha entre la producción de leche del país y la demanda. Esto indica que existe una oportunidad de crecimiento de la producción lechera en el país, únicamente para satisfacer el exceso de demanda interna. (Secretaría de Economía, 2012) El volumen estimado de leche bovina producida para 2022 fue de 12 mil millones de litros, con un aumento anual de 1%. Jalisco, Chihuahua, Coahuila y Durango son los principales estados productores de leche, que aproximadamente general el 53% del volumen total en 2021 (Lara & Alvarado, 2021).

Se estima que las pérdidas de este producto durante el procesamiento industrial son del 2.31% en volumen en comparación con los litros acopiados por las diferentes empresas. Esto se debe a anomalías en el rango aceptado de los diferentes componentes monitoreados para garantizar la calidad de la leche (Alejandro & López, 2016).

La leche es sometida a una serie de análisis para evaluar su composición y se monitorean todos los factores, si no se cuidan, pueden causar deterioro del producto. La composición de la leche varía según diversos factores, incluidos los fisiológicos, los alimenticios y las diferentes tecnologías utilizadas en la producción de la leche. La composición de la leche tiene unos rangos establecidos que se consideran “normales”; si los valores medidos difieren de estos rangos, se considera una anomalía. (Bracho-Espinoza, 2013).

La leche es un producto que se altera fácilmente, especialmente por el calor. Muchos microorganismos pueden proliferar allí, especialmente aquellos que descomponen la lactosa en ácido láctico, lo que provoca la floculación de las proteínas. Por no tener una protección natural eficaz, el uso de ese producto para consumo y su transformación industrial en otros productos

requiere medidas de protección contra la invasión de microbios y la actividad de enzimas.(Alais, 1985).

Debe ser manejada correctamente desde su obtención por su naturaleza perecedera. Medir los componentes de la leche es de importancia al ser un óptimo medio de cultivo para el crecimiento microbiano. De igual manera, garantizar la calidad de la leche es esencial para asegurar la satisfacción y la seguridad del consumidor. La industria se regula mediante estándares de varios componentes de la leche de vaca, dependiendo del tipo de leche que se quiere comercializar, para asegurarse de que este producto esté en condiciones adecuadas para su venta (NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, 2012) . Para lograr el control fisicoquímico se hacen varios análisis de muestras de la leche bovina, se utilizan diferentes métodos con tiempos diferentes de obtención del resultado (Bernal Martínez, et al. 2006). Se requiere un sensor capaz de medir los diversos parámetros necesarios para agilizar y facilitar el análisis e interpretación de los resultados.

3 Justificación

La colorimetría es una técnica analítica rápida, y los sensores colorimétricos se remontan incluso antes de los comienzos de la química con una cuantificación directa "a simple vista". La detección colorimétrica es una técnica bastante simple, y el advenimiento de la imagen digital universal le ha brindado nuevas y emocionantes posibilidades. Los colorantes quimiosensibles contienen un centro para interactuar fuertemente con los analitos, este centro de interacción debe estar fuertemente acoplado a un cromóforo intenso. Los colorantes quimiosensibles pueden cambiar de color en la luz reflejada o absorbida dependiendo del entorno químico (Suslick et al., 2004).

La determinación colorimétrica tiene numerosas ventajas. En primer lugar, los métodos colorimétricos permiten la detección visual in situ basada en el cambio de color sin instrumentos sofisticados. En segundo lugar, con la ayuda de imágenes digitales, los conjuntos de sensores colorimétricos proporcionan un enfoque fácil, eficiente y sensible para la detección e identificación rápidas de sustratos químicos. En tercer lugar, las matrices de sensores colorimétricos podrían miniaturizarse fácilmente y permitir múltiples análisis con un solo instrumento de control en el sitio central. Además, también presenta ventajas como buena selectividad, alta sensibilidad, no destructivo, económico, bajo límite de detección y respuesta rápida. Por lo tanto, la tecnología de matriz de sensores colorimétricos muestra el gran potencial en la detección de diferentes moléculas en alimentos (Jazen et al., 2006; Quin et al., 2012).

Para poder crear un sensor colorimétrico microfluídico para medir lactosa, colesterol y ácido láctico es importante seleccionar a las bioreceptores adecuados, siendo las enzimas las más indicadas ya que son altamente selectivas y pueden operar de forma adecuada con el pH y temperatura de la leche bovina. Para llevar esto a cabo, es necesario elegir los materiales apropiados para la matriz física, la cual inmoviliza estas biomoléculas. Las enzimas se inmovilizan con quitosano.

La inmovilización de enzimas en soportes sólidos es un método técnico que provoca variaciones a nivel estructural en sistemas catalíticos confinados, lo que mejora las propiedades de reacción de los sistemas y posibilita emplear las enzimas retenidas repetidamente en el mismo proceso. Existen un sinnúmero de técnicas para inmovilizar enzimas (entre ellas está la encapsulación, la unión covalente, la adsorción, el entrecruzamiento y el atrapamiento), y de opciones de soportes, el cual se selecciona basándose en la experiencia empírica, pero se basa en la idea de que se debe mantener la actividad enzimática y su estabilidad, igualmente debe de ser de síntesis sencilla y con varias opciones de formas, no ser tóxicos, tener una alta afinidad por las proteínas y compatibilidad fisiológica, así como poseer grupos funcionales que reaccionen con las enzimas o en su caso, ser susceptibles a modificaciones químicas (Salazar, et al., 2014).

Aunque no representa una técnica en específico, el uso de nanomateriales es otra opción para la inmovilización de enzimas, brinda beneficios que disminuyen las limitantes respectivas a la transmisión de productos y sustratos en gran cantidad, así como que asegurar y reforzar la unión entre el soporte y la enzima puesto que al hablar de materiales nanoestructurados significa que existe una gran superficie de contacto. Según estudios recientes, los sistemas catalíticos a nivel nanométrico representan una forma muy viable para su aplicación en áreas afines con la biotecnología (Salazar-Leyva et al., 2014) y es por lo ya señalado que el interés de emplear nanomateriales como soportes para inmovilizar enzimas ha ido en aumento. Los procedimientos utilizados en esta tecnología son los mismos que se utilizan generalmente en los mecanismos de los métodos tradicionales de inmovilización de enzimas; por ejemplo, la inmovilización de enzimas a partir de una superficie de nanopartículas fue una de las primeras formas en que se manejó esta área y sigue siendo muy utilizada actualmente. El quitosano puede modificar químicamente a los grupos hidroxilo y aminos que lo conforman, de hecho, se sabe que la forma primaria de sus grupos amino (-NH₂), lo puede conferir la propiedad de ser solubles en medios ácidos (en específico en pH menor a 6.5) al convertirse en un polielectrolito catiónico, y lo anterior le brinda la posibilidad de formar membranas y geles con buenas características mecánicas, esto lo convierte en una base ideal para crear materiales compuestos y el diseño de estructuras de inmovilización con características delimitadas.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Desarrollar un dispositivo microfluídico colorimétrico para detección de colesterol, lactosa y ácido láctico en leche bovina.

4.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de quitosano que cumplan la función de soporte para la inmovilización de enzimas.
- Inmovilizar y evaluar el efecto de la inmovilización de las enzimas lactato oxidasa, lactasa y colesterol oxidasa sobre las nanopartículas de quitosano.
- Evaluar la detección colorimétrica de las fases sensoras diseñadas para detección de lactosa, ácido láctico y colesterol en soluciones amortiguadoras y leche bovina.
- Evaluar interferentes en la detección colorimétrica de las fases sensoras desarrolladas.
- Diseñar el dispositivo microfluídico colorimétrico para detección de los analitos seleccionados.

5 Hipótesis

La inmovilización de las enzimas colesterol oxidasa, lactasa y lactato oxidasa sobre nanopartículas de quitosano incrementará la estabilidad de las biomoléculas, así como tendrán una buena retención de la actividad enzimática produciendo una eficiente reacción con agentes cromogénicos logrando una detección colorimétrica de colesterol, lactosa y ácido láctico en leche bovina.

6 Marco Teórico

6.1 Calidad de los alimentos

La contaminación alimentaria puede provocar enfermedades transmitidas por alimentos, pueden ser graves e incluso mortales. Además, la inocuidad de los alimentos es fundamental para mantener una imagen positiva de las empresas y los productos que procesan, lo que puede fomentar la fidelidad de los clientes y aumentar las oportunidades de comercio internacional. Por lo tanto, la inocuidad de los alimentos es esencial para garantizar la salud pública y el bienestar de los consumidores (Conocimiento & Kleeberg Hidalgo, 2007).

Para poder garantizar la seguridad alimentaria y la satisfacción del consumidor, es importante que la industria monitoree la calidad de los alimentos. Existen varios factores que pueden afectar la calidad de los alimentos, incluida la contaminación, la manipulación inadecuada, el almacenamiento incorrecto, los alérgenos y los patógenos (Wiedmann et al., 2019). Los alimentos de baja calidad pueden ser perjudiciales para la salud del consumidor, y dañar la reputación del proveedor y empresa.

Para cualquier proceso industrial de producción de productos lácteos, el control de la calidad de la leche cruda es de gran importancia. La leche cruda de alta calidad debe carecer de sedimentos y de residuos, así como sustancias químicas ajenas a la composición de la leche, como antibióticos y detergentes. Debe tener una baja contaminación microbiana y tener características organolépticas típicas.

El proceso del control de calidad de la leche incluye: recepción de leche cruda, filtración, clarificación, enfriamiento y almacenamiento. En la recepción de la leche cruda, cada productor muestrea la leche de cada contenedor para su análisis en el laboratorio. En el laboratorio, se realizan pruebas para determinar la composición y calidad de la leche, como el recuento de células somáticas, la grasa, las proteínas, los sólidos no grasos y la acidez. Además, se realizan pruebas con el fin de detectar la presencia de contaminantes como antibióticos. Si el producto no cumple con los requisitos, se rechaza y notifica al productor (Santiago Vazquez et al., 2007).

Los métodos analíticos son necesarios para que la industria alimenticia pueda garantizar la calidad fisicoquímica, microbiológica y la estabilidad de la materia prima, los procesos y sus productos. Estos métodos deben proporcionar datos en tiempo real para controlar cada producto con el propósito de garantizar la seguridad e inocuidad de los alimentos.

6.2 Los biosensores enzimáticos

Los biosensores son dispositivos de análisis conformados de elementos biológicos sensibles de reconocimiento (células, tejidos, receptores, enzimas, entre otros), nanomateriales o compuestos biomiméticos que tienen la capacidad de cambiar su comportamiento debido a un mecanismo que garantiza la detección e interpretación de la variación de respuesta de la interacción entre el analito y el dispositivo de análisis. Un sistema de traducción adecuado se puede utilizar para analizar los cambios de estas variables (Morales Castaño et al., 2019).

Su desarrollo comenzó con Leland C. Clark, el padre de los biosensores, en 1956, usándolo para medir una variedad de analitos presentes en el cuerpo humano. Posterior a eso, su comercialización comenzó alrededor de los años 60, enfocándose en aplicaciones clínicas (Karunakaran et al., 2015). El primero desarrollado fue un sensor enzimático que usó la reacción catalizada con la glucosa oxidasa para medir la cantidad de glucosa en la sangre. Fue diseñado en 1962, acoplando la glucosa oxidasa a un electrodo de oxígeno (Jiménez & León P, 2009).

Los biosensores se clasifican de acuerdo con la heterogeneidad de los materiales, las variaciones de sus componentes estructurales, los mecanismos químicos, físicos o fisiológicos de su funcionalidad y los mecanismos de detección de la señal:

- Tipo de interacción: biocatalíticos o de bioafinidad.
- Método de detección: directo o indirecto.
- Elemento de reconocimiento: célula, tejido, enzima, receptor, anticuerpo, ácido nucleico, polímero de impresión molecular, ácido nucleico peptídico o aptómero.
- Sistema de transducción: nanomecánico, piezoeléctrico, electroquímico, termoeléctrico, óptico o colorimétrico.

En los sistemas biológicos, las enzimas catalizan las reacciones, con frecuencia con más eficiencia que los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Funcionan en soluciones acuosas en condiciones suaves de temperatura y pH, tienen un alto grado de especificidad respecto a sus sustratos y aceleran significativamente las reacciones químicas. (Nelson & Cox, 2009). Son proteínas que catalizan una variedad de reacciones químicas en los organismos y su estructura tridimensional, donde se encuentran sitios activos, que tienen afinidad por ciertas moléculas, determina la actividad catalítica de las enzimas (Ramírez Ramírez, 2014).

Los sensores enzimáticos son dispositivos analíticos que incorporan una enzima como bioreceptor asociado a un transductor físico para generar una señal óptica o electrónica

discreta o continua que es proporcional a la concentración del analito en la muestra (Karunakaran et al., 2015). Funcionan mediante la interacción de una enzima y su sustrato.

Estos biosensores son herramientas de gran utilidad para el análisis de la calidad y seguridad de los alimentos en la industria alimentaria. Debido a su alta sensibilidad, especificidad y posibilidad de miniaturización, tiene un gran potencial en este sector (Boix, 2016). Además, tienen varias ventajas en comparación con otros métodos de detección de analitos: su especificidad nos permite detectar una sustancia específica dentro de una muestra sin ser afectados por otras sustancias presentes, su sensibilidad puede detectar cantidades muy pequeñas de determinada sustancia, incluso son capaces de detectar sustancias *in situ* y en tiempo real, lo que resulta en una detección rápida y eficiente.

6.3 Inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática es una etapa crucial en el desarrollo de biosensores enzimáticos. Se pueden utilizar una variedad de métodos que confinan la enzima en un soporte en un área determinada de espacio, lo que permite que la enzima mantenga su actividad catalítica y poder reutilizarlas repetidamente.

Existen algunos beneficios en el empleo de enzimas inmovilizadas (Arroyo, 1998):

- Mayor estabilidad de las enzimas.
- La posibilidad de reutilizar el material, resultando en la reducción de costo.
- La posibilidad de diseñar un dispositivo de fácil manejo.

La fijación o retención de enzimas en soportes sólidos se conoce como inmovilización enzimática. Como resultado se producen sistemas enzimáticos heterogéneos donde sus estructuras enzimáticas mejoran su actividad y estabilidad, en la **Figura 1**. Métodos de inmovilización enzimática (Nguyen & Kim, 2017) se visualiza de manera simple los distintos métodos de inmovilización enzimática.

La heterogeneidad de los sistemas facilita la recuperación y separación del producto, lo que permite que el sistema enzima-soporte se pueda reutilizar repetidamente. Los métodos de inmovilización enzimática más comunes se basan en la adsorción y disposición no covalentes, que resultan simples, baratos y efectivos, pero reversibles; denominado como atrapamiento físico, unión covalente y bioconjugación. En el lado izquierdo de la **Figura 1** podemos ver representados estas uniones débiles. Por otro lado, los enlaces fuertes con los soportes los vemos representados en el lado derecho de la imagen.

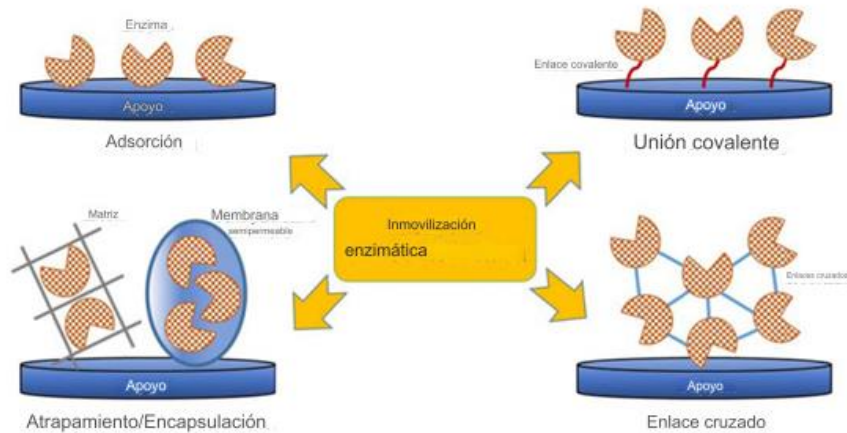


Figura 1. Métodos de inmovilización enzimática (Nguyen & Kim, 2017)

La unión de la enzima al soporte puede ser química, que implica enlaces covalentes y enlaces débiles, o física, que es más débil que la unión química y apenas puede mantener la enzima fijada al soporte. El objetivo de la inmovilización enzimática es facilitar la reutilización de las enzimas relevantes y al mismo tiempo lograr una mejor relación costo-beneficio (Mammarella, 2001).

El proceso de inmovilización de enzimas tiene algunos inconvenientes; la modificación de la estructura de la enzima a comparación con su estado original; la heterogeneidad; la pérdida de la actividad de la enzima durante la inmovilización es ligera; El costo del biocatalizador superior al de la enzima (Arroyo, 1998).

La inmovilización de enzimas en superficies solidas se divide en dos categorías: (Suelter & Kricka, 1992a);

1. Irreversible. Una vez la enzima se garra al soporte, no se puede eliminar sin causar daño a la actividad enzimática. Son sistemas estables;
 - a. Unión covalente
 - b. Atrapamiento
2. Reversible. En estos sistemas, se puede separar la enzima del soporte bajo ciertas condiciones sin afectar la actividad enzimática:
 - a. Adsorción
 - b. Enlace cruzado

6.3.1 Adsorción

La adsorción es el método de inmovilización más sencillo. Es un proceso económico, sin reactivos y no daña la actividad enzimática ya que no es necesaria la funcionalización del soporte. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes: Si las enzimas no se unen bien al soporte, los cambios de temperatura, pH o fuerza iónica pueden lixiviarlas.

Este método no requiere la inmovilización química de la enzima, lo que mantiene su actividad aceptable. Las interacciones débiles como la fuerza de Van der Waals, las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas son esenciales para la adsorción. (Suelter & Kricka, 1992a)

La enzima se disuelve en una solución, posteriormente se coloca en contacto con un soporte sólido y se hace entrar en contacto con la solución durante un periodo de tiempo en condiciones adecuadas para mantener la actividad enzimática. El siguiente paso consiste en remover las enzimas que no se adsorbieron mediante un lavado de la superficie con un buffer.

Se puede dividir en 3 subcategorías:

- **Adsorción física**
Requiere sumergir el soporte en una solución de la enzima e incubar durante un periodo determinado de tiempo para que se produzca la adsorción. Se deja secar y se enjuagan las enzimas que no fueron adsorbidas.
- **Unión electrostática**
Es importante considerar tanto el punto isoeléctrico de la enzima como el pH de la solución. La superficie de la enzima puede tener carga positiva o negativa, por lo que podría ser inmovilizada a una superficie que tenga la carga contraria. Dos técnicas de inmovilización de este método sería: deposición capa a capa y dopaje electroquímico.
- **Adsorción hidrofóbica**
Se beneficia de la interacción hidrofóbica entre la enzima y el soporte, formada por los desplazamientos de moléculas de agua del material de la superficie del soporte y las moléculas de enzima durante la inmovilización. Depende en gran medida de la hidrofobicidad tanto del adsorbente como de la enzima.

6.3.2 Unión covalente

Es la unión de las enzimas a través de un enlace covalente con un soporte insoluble, Su función principal es prevenir el desprendimiento de la enzima-soporte.

La unión se produce por su grado de reactividad de los grupos funcionales de las enzimas, como son: grupo carboxilo, amino, indol, sulfhídrido, tiol e hidroxilo. De igual manera, la unión se puede dar por ciertos aminoácidos presentes en la enzima: lisina, cisteína, tirosina, histidina y arginina, entre otros, cuando estén expuestos al exterior de la superficie proteica.

La ventaja de esta metodología es la estabilidad generada por el enlace entre el soporte y la enzima, la cual se une en varios puntos de la estructura, esto le confiere rigidez, y mejora la estabilidad del sistema con respecto al pH, la fuerza iónica, los solventes orgánicos y la temperatura. La proporción de uniones fuertes entre las enzimas y la matriz del soporte producen pocas fugas de enzimas (Mammarella, 2001).

6.3.3 Atrapamiento

En este tipo de inmovilización, no se liga directamente a la superficie del soporte, en cambio se atrapa en él a través de una red polimérica que permite que el sustrato se mueva con el analito, pero retiene la enzima (Fajardo Ochoa et al., 2011).

El proceso consta de dos pasos; primero consiste en mezclar una solución monomérica para después, a través de una reacción química, polimerizarlo. Cuando la enzima es físicamente confinada, esta no reacciona químicamente con la red polimérica, por lo que este método puede aumentar la estabilidad de la enzima y reducir el riesgo de desnaturalización.

Una de las ventajas de este método en particular es que se puede mejorar el ambiente de la enzima, mediante la manipulación del medio donde esta encapsulada para obtener un pH óptimo, polaridad, etc. El riesgo es la posibilidad de la fuga de las enzimas, cuando el tamaño de los poros es más grande, controlado por el tipo de la ruta de polimerización que se siga: electropolimerización, fotopolimerización, sol-gel y microencapsulación (Nguyen & Kim, 2017).

6.3.4 Cross-linking (biconjugación)

Este método “cross-linking” es una reticulación que une dos o más moléculas mediante un enlace covalente y se reconoce como bioconjugación. Este proceso depende principalmente del tamaño y tipo del agente y de los grupos funcionales (Suelter & Kricka, 1992b). Cuanto menor sea el tamaño de la red, mejor será el resultado porque la difusión será más fácil. La fuerza del enlace dependerá de la naturaleza del reticulante (Spahn & Minter, 2008).

Las enzimas pueden inmovilizarse con reactivos bifuncionales. La combinación de reactivos más utilizada es el glutaraldehído como reactivo bifuncional y la albúmina de suero bovino como material inerte. Es un método simple y rápido que permite controlar las propiedades físicas y el tamaño de partícula del producto final (Thangaraj & Solomon, 2019).

6.4 Los nanomateriales en la inmovilización enzimática

El rápido desarrollo de la nanotecnología ha aumentado considerablemente las posibilidades de utilizar los nanomateriales para su interacción con las enzimas para aplicaciones en biomedicina, ingeniería bioquímica, monitorización medioambiental y el diseño de biosensores para la industria.

Los nanomateriales, debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, han ganado la atención como soportes potenciales para la inmovilización de enzimas, surgen nuevos fenómenos favorables cuando el tamaño del portador se aproxima a dimensiones nanométricas. Se ha encontrado que los nanomateriales que se presentan como nanopartículas, nanofibras, nanoporos, nanotubos, nanohojas y nanocompositos tienen una variedad de usos en la biotecnología industrial.

El uso de estos materiales como potenciales soportes para la inmovilización enzimática ha crecido en los últimos años, estos presentan varias ventajas en la inmovilización enzimática. Una de las ventajas es la posibilidad de recuperación de la enzima, puede mejorar la estabilidad operacional del biocatalizador y la selectividad de la reacción, incluso pueden mejorar la actividad catalítica (Verma et al., 2013).

Se pueden usar unas pruebas repetidas en una variedad de condiciones con varios valores de pH, temperatura, concentración de enzimas, tiempo de inmovilización y concentración de nanopartículas para poder determinar las condiciones de inmovilización ideales de las enzimas de interés (M. Chen et al., 2017).

Existen varias consideraciones importantes al momento de evaluar la idoneidad de un nanomaterial para la inmovilización de enzimas. Un factor importante es la estabilidad del mismo nanomaterial en las condiciones necesarias para la reacción, así como su compatibilidad con la enzima. El tamaño y la forma del nanomaterial también pueden influir en su eficacia para la propia inmovilización. Otros factores para tener en cuenta son el costo y la disponibilidad del nanomaterial, así como su posible toxicidad o impacto medioambiental (Panadero, 2017). Además de estos, existen varios factores, en el contexto de los nanomateriales, que se toman en consideración al momento de la elección del nanomaterial (Verma et al., 2013):

- a. Relación superficie-volumen. Los nanomateriales ofrecen una gran relación superficie volumen.
- b. Carga enzimática. Ofrecen una alta carga enzimática gracias a su gran superficie relativa, lo que mejora la actividad biocatalítica y la estabilidad.

- c. Transferencia de masa. Las enzimas inmovilizadas en materiales tienen una a la transferencia de masa y, por lo tanto, tienen una actividad y una estabilidad elevadas.
- d. Facilidad de separación.

Se pueden utilizar en una variedad de situaciones los nanomateriales para la inmovilización enzimática. Los nanomateriales más comunes utilizados en la inmovilización enzimática incluyen nanopartículas de oro, plata, sílice, óxido de hierro, grafeno y nanotubos de carbono, entre otros (Verma et al., 2013).

Tabla 1 Ejemplos de Usos de Soportes Nanoestructurados para la Inmovilización de Enzimas

Nanomaterial	Tipo de soporte	Referencia
Tinta de afinidad poli(HEMA-GMA). Azul cibacron F3GA	Nanopartículas	(Alpay & Uygun, 2015)
Lipasa de <i>Apergillus niger</i>	Fe_2O_3 recubiertas de quitosano	(Osuna et al., 2015)
Peroxidasa de rábano picante	Nanopartículas magnéticas en criogel de quitosano y alcohol polivinílico	(Laochai et al., 2016)
Pepsina	AuNPs con terminación COOH hidrofílica	(Höldrich et al., 2016)
Lacasa	Nanopartículas magnéticas de Fe_2O_4 modificadas con polietilamina	(Xia et al., 2016)

6.5 Nanopartículas de quitosano

6.5.1 Quitina y quitosano

La quitina, es el precursor del quitosano, está presente en la naturaleza (Hernández Cocolletzi et al., 2009). Al menos 10Gton de quitina está presente en la biosfera, de manera natural sintetizada por los organismos por un camino común que termina con la polimerización de la N-acetilglucosamina a partir del precursor activado UDP-GINAc (Kumar et al., 2004).

La quitina de origen animal está asociada con proteínas insolubles en agua y sales inorgánicas, lo que vuelve difícil su aislamiento. Después de que Braconot lo descubriera en 1811, se encontró que se podía tratar la quitina con una solución concentrada de hidróxido de potasio. Únicamente con disolventes ácidos minerales se logra aislar, como **N, N'-dimetilacetamida** con cloruro de litio, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, entre otros (Gacén & Gacén, 1996).

Las propiedades del quitosano se ven considerablemente alteradas como resultado de la transformación de quitina a quitosano, lo que hace que sea fácilmente soluble en soluciones acuosas de la mayoría de los ácidos orgánicos e inorgánicos (Escobar Sierra et al., 2003).

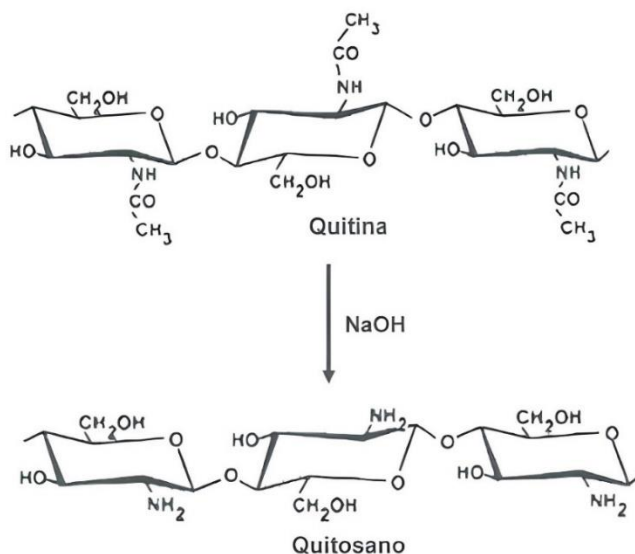


Figura 2. Extracción del quitosano mediante desacetilación química de quitina (Escobar Sierra et al., 2003)

Para la extracción de quitina y la obtención de quitosano se requieren de al menos cuatro pasos, que incluyen la preparación de la muestra (Monter Miranda et al., 2016). Comenzando con el acondicionamiento de la materia prima:

- a. Extracción de proteínas.
- b. Eliminación de impurezas inorgánicas.
- c. Decoloración de la quitina.
- d. Se desacetila la quitina.

Siendo el último paso donde se obtiene el quitosano como derivado de la quitina, cuando esta es desacetilada en más de un 50%, sin alcanzar el 100% donde el polímero resultante sería el quitano (Colina et al., 2014).

6.5.2 Propiedades del quitosano

El quitosano es un aminopolisacárido, el término define una familia de herteropolisacáridos lineales compuestos por $2 - amino - 2 - deoxi - \beta - D - glucosa$ y $2 - acetamido - 2 - deoxi - \beta - D - glucosa$. A menudo se presentan de menor proporción el tipo *amino*, y la relación molar entre estos dos se denomina grado de acetilación. Las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano están directamente relacionadas por el grado de polimerización, que es otro parámetro determinante (Goycoolea et al., 2009).

La fuerza de las estructuras quitinosas se debe a la abundancia de grupos hidroxilo y amino altamente reactivos y su tendencia a formar puentes de hidrogeno. La apariencia se puede apreciar como un sólido blanco amorfo (Avila et al., 2007). Al estas debajo de un pH de 6.5, se comporta como un polielectrolito catiónico, exhibiendo una alta densidad de carga y se adhiere fácilmente a superficies negativamente cargadas (Gacén & Gacén, 1996).

El quitosano generalmente se solubiliza con solventes como el ácido fórmico, el ácido acético, ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido cítrico, a un pH menor de 6. Este material es considerado no tóxico y como un polímero biocompatible con los seres vivos (Hernández Cocolletzi et al., 2009).

Tabla 2. Parámetros del quitosano

Parámetro	Quitosano
Peso molecular	$1 - 3 \times 10^5$
Grado de desacetilación (%)	80 - 90
Contenido de nitrógeno (%)	7.8 - 4
Contenido de humedad (%)	2 - 10

Nota. Tabla adaptada de (Gacén & Gacén, 1996).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, lo que influye en sus características funcionales y biológicas, tiene aplicaciones en diversos campos. El quitosano puede formar fibras, hidrogeles, andamios porosos, micro y nanopartículas (Avila et al., 2007).

6.5.3 Síntesis de NPs

La síntesis de nanomateriales poliméricos se divide en dos categorías principales: construcción y deconstrucción, también conocidas como *bottom down* y *bottom up*, respectivamente. Los métodos por *bottom up* se basan en agregar moléculas, hasta obtener la estructura de tamaño deseado, mientras que los métodos por *bottom down*, se basa en fraccionar los materiales, partiendo de un material para ser reducido al tamaño deseado (Caro-León et al., 2018).

Se han desarrollado numerosos métodos para la síntesis de nanopartículas a base de quitosano desde que Ohya las describió por primera vez en 1994. En la mayoría de los casos, se obtienen mediante métodos de *bottom up* mediante el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, cuyo orden determina la estructura nanoscópica, por interacciones intramoleculares o intermoleculares de tipo covalente y no covalente (Goycoolea et al., 2009). En el diagrama de la **Figura 3** se puede visualizar de manera simple los diferentes métodos de síntesis *bottom up*, y bajo que principio funcionan de manera general.

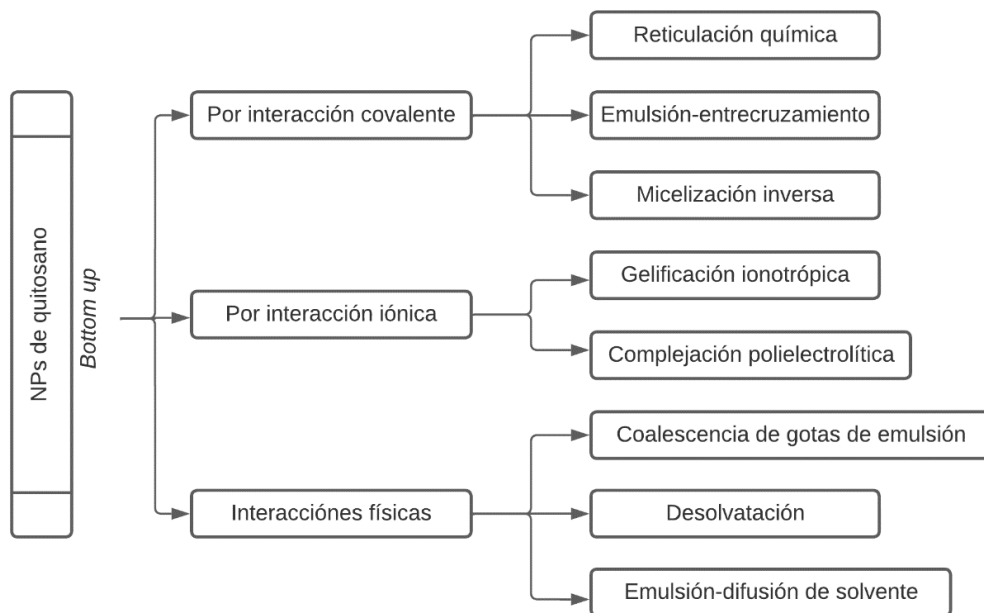


Figura 3. Diagrama de diferentes métodos para la síntesis de NPs de quitosano (Caro-León et al., 2018), (Calderon Perea, 2015).

Debido a que el proceso toma lugar en un ambiente acuoso, utilizando condiciones no agresivas y de manera más rápida, los métodos basados en interacciones iónicas se posicionan como la primera opción para la producción de estas nanopartículas (Saucedo-Plascencia et al., 2023).

Una de las formas más comunes de crear estas nanopartículas es la gelación iónica, como se puede observar gráficamente de manera general en la **Figura 4**. Esta técnica utiliza un agente entrecruzante, que actúa como eslabón entre las cadenas de polímero debido a las interacciones de cargas opuestas. El tripolifosfato de sodio (TPP) es el agente más común en esta técnica (Caro-León et al., 2018).

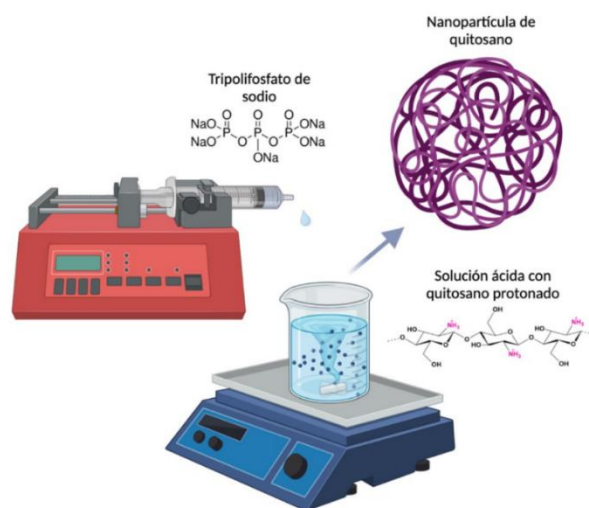


Figura 4. Síntesis de NPs de quitosano mediante gelación iónica.(Saucedo-Plascencia et al., 2023).

El uso de las nanopartículas de quitosano es estimulado por sus propiedades únicas con diferentes aplicaciones, entre el amplio rango, destaca las ventajas para la inmovilización enzimática. Es conocido como el material ideal para este propósito por su resistencia a la degradación química, evita la perturbación de los iones metálicos a una enzima y su grupo funcional amino (Divya & Jisha, 2018).

6.6 Presencia de lactato en la leche bovina

El lactato, también conocido como ácido láctico, es un ácido orgánico que se encuentra naturalmente en la leche bovina. La concentración de este compuesto depende de una

variedad de factores, incluida la salud del bovino, la etapa de lactancia, la presencia de otros compuestos e incluso otros organismos.

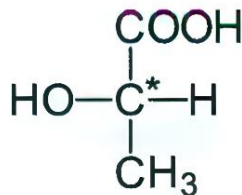


Figura 5. Estructura química del ácido láctico (Olivarez Orozco, 2011).

Una de las medidas más cruciales para determinar la calidad de la leche es la acidez, que se presenta principalmente por la presencia de los fosfatos, las proteínas y el dióxido de carbono, que son los principales componentes presentes en la leche después del ordeño. Los microorganismos conocidos como ácidos lácticos, del grupo *Streptococcus* lácticos, fermentan la leche para convertirla en ácido láctico, lo que altera este parámetro (Chagunda et al., 2006).

En el ámbito industrial, una vez que se recibe, la calidad de la leche puede ser valorada por métodos ya establecidos. Esto se hace para eliminar la leche que no es adecuada para el tratamiento térmico, aquella que presenta niveles elevados de acidez debido a la contaminación y las bacterias fermentadoras de lactosa que aumentan las concentraciones de ácido láctico (Chacón Villalobos, 2006).

Es fundamental que la leche no se encuentre fermentada antes de llegar a las plantas de producción, ya que, si lo está, el carácter ácido de la leche podría causar reacciones perjudiciales para su calidad. Por lo tanto, el valor de acidez es un indicador de contaminación microbiana y un criterio de calidad muy importante.

En general, la acidez de la leche se expresa en ácido láctico de 1,3 a 1,7 g/L. La acidez se mide con una titulación alcalimétrica con 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH) utilizando fenolftaleína como indicador o con un potenciómetro para encontrar el pH de 8.3, que corresponde al resultado correcto de la titulación (NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, 2012).

$$\text{Acidez}(g/L) = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

Donde:

V son los mililitros

N es la normalidad

M es el volumen

Aunque la valoración con $NaOH$ $0.1 N$ es un examen común en la industria láctea, algunas fábricas artesanales tienen problemas para manejar químicos estandarizados, lo que puede afectar los resultados de un análisis adecuado. El porcentaje de ácido láctico en la leche también se puede medir mediante enzima, potenciómetros, espectrofotómetros y cromatografía de gases. A pesar de estas opciones, los pequeños y medianos productores, que son una gran parte de la agroindustria, aun no pueden acceder a estos procedimientos (Chacón Villalobos, 2006).

6.6.1 Relación del pH

El valor normal de pH de la leche es un factor importante en la determinación del ácido láctico en la leche. Esta medida se basa en la concentración de protones o iones de hidrógeno, así como en la acidez o la basicidad. Es importante para la estabilidad de numerosos alimentos porque controla el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos (Negri, 2005).

El pH típico de la leche es entre 6.6 y 6.8. Un pH-metro se usa para medir el pH de la leche directamente sobre ella. El pH debe ser de 0.10 pH entre los resultados de varias determinaciones consecutivas (Armas Alba & Hernández Borges Javier González Sálamo, 2016).

6.6.2 Lactato oxidasa

En presencia del oxígeno, la enzima lactato oxidasa (LOX) oxida el lactato a piruvato, produciendo peróxido de hidrógeno como subproducto.

Es una molécula importante en el metabolismo energético, la glucogénesis y la señalización celular. La LOX ha sido utilizada en el desarrollo de biosensores para detectar el lactato en productos lácteos, generalmente aceptada para su reacción colorimétrica (Esther Mejía Díaz, 2016).

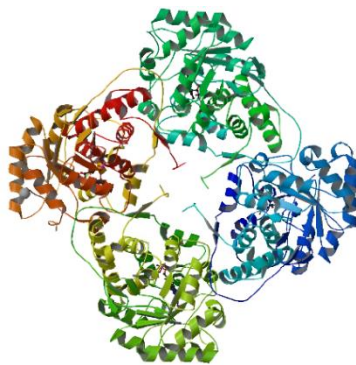
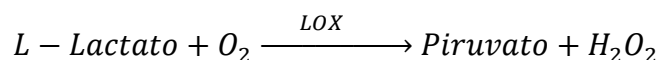


Figura 6. Estructura del lactato oxidasa (Guaque Torres & Liliana Gómez RESUMEN, 2019).

La temperatura óptima es de $35^{\circ}C$ y pierde rápidamente su actividad a temperaturas superiores a $45^{\circ}C$ y en un medio con pH de 6.5., el K_m utilizado como sustrato L-lactato es de $7 \times 10^{-4}M$. La reacción que cataliza es la siguiente (Parra et al., 2006):



Donde:

LOX es el L-Lactato Oxidasa

6.7 Presencia del colesterol en la leche bovina

La leche contiene triglicéridos, diacilglicerol, fosfolípidos, ácidos grasos libres, colesterol libre y colesterol esterificado. Los microglóbulos emulsionados de los lípidos en la fase acuosa de la leche facilitan su hidrólisis por las enzimas digestivas (Moreno Aznar et al., 2013). Su contenido es expresado como *mg colesterol/g de grasa láctea*, para la leche entera es de 10 – 13 *mg* en 100 *g* (103 *ml*) (Maza Pastrana et al., 2011).

El contenido de materia grasa total aumenta o disminuye junto con el contenido de colesterol; sin embargo, la proporción de colesterol y materia grasa generalmente permanece constante. Los productos concentrados en grasa láctea suelen tener una alta concentración de colesterol (Cazzaniga et al., 2013).

El colesterol es una molécula del grupo de esteroides que se puede encontrar en los alimentos de origen animal. Se puede encontrar en dos formas: como colesterol libre o como éster, que es el resultado de la mezcla de colesterol con varios ácidos grasos (Tudela, 1996).

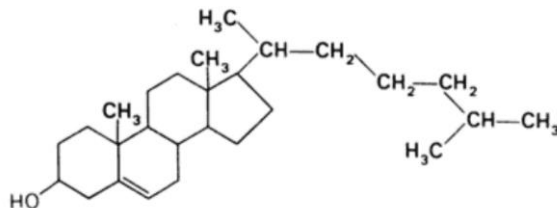


Figura 7. Estructura química del colesterol (Tudela, 1996).

Es un componente esencial de las membranas celulares, precursor de hormonas esteroideas, precursor de la síntesis de glucocorticoides en las glándulas suprarrenales, generador de ácidos biliares, precursor de la vitamina D, constituyente importante en la resistencia de la piel ante sustancias externas (Guzmán, 2006).

En el organismo, un poco más de la mitad del colesterol se origina de sus síntesis dentro del mismo, y el resto es proporcionado por la alimentación. Se acepta que la ingesta de colesterol debe ser menor a 300 *mg* al día (Rozycki et al., 2013).

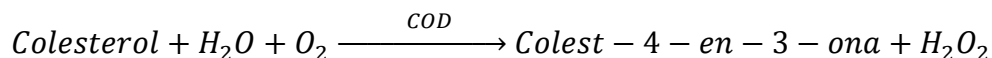
6.7.1 Colesterol oxidasa

Los diferentes tipos de colesterol oxidasa son flavoproteínas bacteriales que catalizan la degradación del colesterol (Vrielink & Ghisla, 2009). Es producida por diversos microorganismos que se encuentran en diferentes ambientes, como: *Corynebacterium*, *Nocardia erythropolis*, *Nocardia rhodochrous*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Schizopyllum commune*, *Brevibacterium sterolicum*, *Streptomyces violascens*, *Rhodococcus* (Maclachlan et al., 1999). Las bacterias se dividen en dos grupos. El grupo I es muy estable en la fase acuosa, pero inestable en la fase orgánica. El grupo II es estable en la fase orgánica pero inestable en la fase acuosa (Ignacio Domínguez Álvarez, 2017).



Figura 8. Estructura del colesterol oxidasa (Kreit & Sampson, 2009).

La principal función de la enzima es oxidar el grupo hidroxilo del colesterol libre transformándolo en un grupo cetónico y produciendo *cholest – 5 – en – 3 – ona* isomerizándolo en presencia de oxígeno y agua a *cholest – 4 – en – 3 – ona* (Hernández et al., 2011).



Donde

COD Colesterol Oxidasa

El centro activo es de tipo FAD (Favin Adenin Nucleótido), complementario a las de tipo Nicotin Adenin Dinucleótido (Ignacio Domínguez Álvarez, 2017). Su actividad optima se fa a una temperatura de 37°C y a un pH de 7 en un medio acuoso (Maclachlan et al., 1999).

La enzima ha despertado interés como herramienta biotecnológica para medir el colesterol en productos lácteos y fluidos biológicos relevantes, a través de un acoplamiento de la enzima colesterol oxidasa con una segunda reacción con la peroxidasa unto con un agente cromógeno (Chaves-Chavarría et al., 1997).

6.8 Presencia de lactosa en la leche bovina

La lactosa es un disacárido que se compone de galactosa y glucosa por una unión $\beta - 1 - 4$ *glucosídico*. Existe en dos formas isoméricas, α y β , que se distinguen por la posición

de un hidroxilo. Es el único glúcido libre en la leche, y es el componente más común en la leche bovina y el más resistente a los microbios (Sharma, Kumar, et al., 2007).

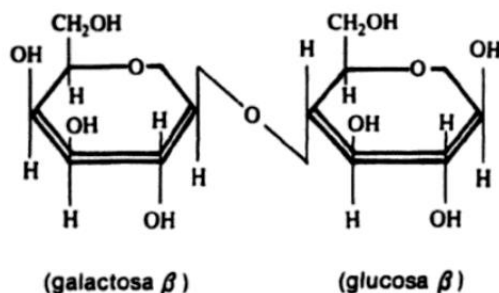


Figura 9. Estructura de la lactosa (Alais, 1985).

Está presente en la leche bovina y constituye un 2 – 8%, medido en g/L es esperable un valor entre 43 – 52 (NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, 2012). En la industria, la determinación de la lactosa es de gran importancia principalmente porque es un indicador de la leche recibida y e anomalías en el compuesto. Por ejemplo, en vacas con mastitis, los niveles de lactosa y leche son un indicador de esta enfermedad.

Las soluciones de acetato de zinc y ferrocianuro de potasio se utilizan para separar las proteínas de la muestra de leche. Se filtra y encuentra la lactosa utilizando su característica de ser un azúcar reductor directo, lo que reduce el cobre utilizando una evaluación volumétrica. La concentración de lactosa en la muestra, en porcentaje (NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, 2012):

$$\% \text{ reductores directos en lactosa} = \frac{250/V(100)(F)}{M}$$

V mililitros gastados de la muestra para titular la solución de sulfato de cobre y tartrato de sodio y potasio

M peso de la muestra

F factor del reactivo de Fehling, en gramos de lactosa

Otros métodos generalmente usados para la determinación de la lactosa en la leche bovina en la industria suelen ser a través de las siguientes metodologías: gravimetría, colorimetría, cromatografía líquido-gas, y cromatografía de alta presión (Marrakchi et al., 2008).

Muchos de estos métodos consumen mucho tiempo o no son adecuados para la medición in situ en tiempo real. Es por esto por lo que se ha acrecentado el desarrollo de herramientas que pueden monitorear el contenido de lactosa con más facilidad, tales como la inmovilización enzimática para biosensores (Ammam & Fransaer, 2010).

Además, el interés industrial de la calidad de la leche para su comercialización, es crucial monitorear la cantidad de lactosa presente en los productos lácteos debido a la precisión de control para la salud pública, ya que un parte de la población tiene intolerancia a la lactosa, una condición médica que impide la digestión de la lactosa (Domínguez et al., 2019).

6.8.1 Lactasa

La lactasa (β – galactosidasa) es una metaloenzima que presenta un alto rango de especificidad. Pertenece a la familia de las glucosidasas, donde el glutamato es el sitio activo crítico (Kretchmer, 1972). La secuencia aceptada del sitio activo de la β – galactosidasa es X – ácido glutámico – asparagina – glicina donde X puede ser treonina, serina, valina o metionina (Souza et al., 2018).

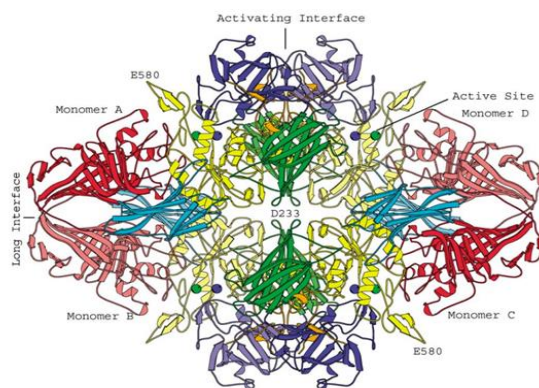


Figura 10. Estructura de la lactasa (Brian. W., 2005).

Esta enzima se encuentra naturalmente en microorganismos, animales y plantas; en los mamíferos se encuentra principalmente en el intestino (Sharma, Sehgal, et al., 2007). Mientras que las β – galactosidasas para la hidrólisis de la lactosa son extraídas de levaduras, como *Kluveromyces*; o extraídas de hongos como el *Aspergillus oryzae*.

Esta enzima es activa en forma dimérica y tetramérica. Su actividad enzimática es baja debajo de pH 6 y arriba de pH9, con temperaturas menores a 35°C y mayores a 40°C ; sus condiciones óptimas es a pH 7 y a 35°C (Souza et al., 2018). El peso molecular de la lactasa de diferentes fuentes de obtención varía entre 67 – 630 KD (Sharma, Sehgal, et al., 2007).

Esta enzima cataliza la hidrólisis de la lactosa, produciendo glucosa y galactosa, tal como podemos observar en el esquema representado en la **Figura 11**.

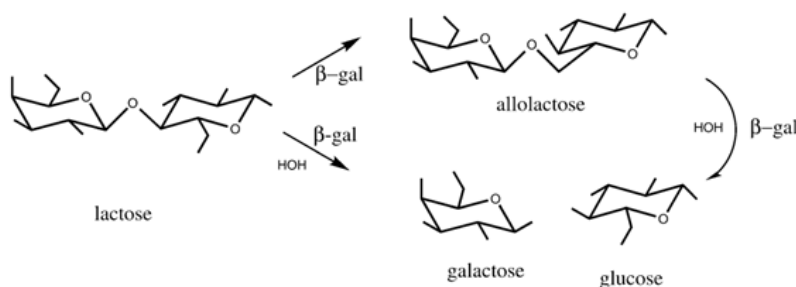
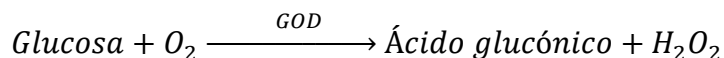


Figura 11. Esquema general de la acción de la lactasa sobre la lactosa (Brian. W., 2005).

La inmovilización de esta enzima ocurre mucho en el sector industrial alimenticio, para operaciones repetitivas, especialmente en biosensores en conjunto con otras enzimas (Souza et al., 2018).

6.8.2 Glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa es una flavoproteína que cataliza la oxidación de $\beta - D - \text{glucosa}$ a $D - \text{glucono} - \delta - \text{lactona}$, que es hidrolizado a ácido glucónico (Bankar et al., 2009).



Donde

GOD Glucosa oxidasa

Usando oxígeno molecular, acepta electrones. Los dos pasos de esta reacción son reductivos y oxidativos. En la mitad reductiva, la enzima cataliza la oxidación de la glucosa, subsecuentemente el dinucleótido de flavina (*FAD*) es reducido a *FADH₂* (Bankar et al., 2009). En la etapa oxidativa, la enzima reducida se oxida por el oxígeno lo que da lugar al peróxido de hidrógeno (Raba & Mottola, 1995).

Esta enzima tiene un alto valor comercial, por su interés principal en la industria, ampliamente utilizado en biosensores (Wilson & Turner, 1992). Estructuralmente es un homodímero constituido de dos subunidades idénticas y dos *FAD* (Wong et al., 2008).



Figura 12. Estructura de la glucosa oxidasa (Khatami et al., 2022).

La glucosa oxidasa se puede obtener a partir de algunas variedades de hongos, principalmente del género *Aspergillus* y *Penicillium* (Montañez et al., 2011). La actividad de esta enzima se da dentro de los rangos de pH 4 – 7 y en temperaturas entre 20°C a 37°C, con un peso molecular entre 150 – 186 *kDa* (Wong et al., 2008).

6.8.3 Peroxidasa

Las hemoperoxidasas son peroxidasa cuyos sustratos son peróxidos alquílicos y peróxido de hidrógeno. Las catalasas son las enzimas más afines al peróxido, mientras que las peroxidasa son las enzimas más afines a los alquílicos (Peña García, 2005).

Se encarga de las funciones fisiológica de los animales, plantas y microorganismos aerobios que elimina el peróxido de hidrógeno producido por varias flavoproteínas oxidasas (Fernández Martínez, 2020).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es un sustrato de la enzima peroxidasa, de gran interés industrial, por lo cual se busca el desarrollo de sistemas de detección sensible y selectiva del H_2O_2 . Existe gran interés debido a sus múltiples aplicaciones prácticas en la industria, por la sencillez de detección con métodos colorimétricos (Sakharov et al., 1999).

La peroxidasa comercial con alta actividad se obtiene a partir del *Raphanus sativus* del cual, la isoenzima C (*HRP C*) es la más abundante (Gajhede et al., 1997). Estas enzimas pertenecen a la clase III dentro de las familias de las peroxidasa de origen bacteriano, fúngico

o vegetal, esta clasificación está basada en la secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional. Contiene tres hélices α alrededor del núcleo de la peroxidasa (Ojeda et al., 2020).

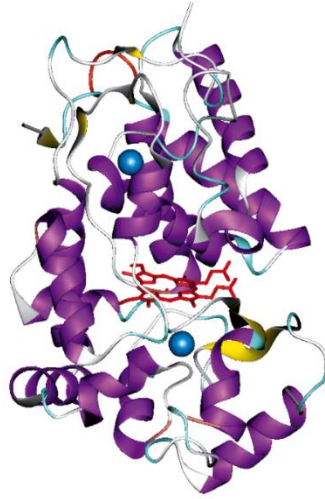


Figura 13. Representación de la estructura cristalográfica de la HRP C (Veitch, 2004).

Las unidades en las que se mide la pureza de la peroxidasa es en RZ (*reinheitszahl*), que es la relación entre la absorbancia a 403 y 280 nm registrada mediante espectrofotometría UV-VIS. Valor reportado para la HRP C esta entre 3.0 y 3.4 en condiciones óptimas (Veitch & Smith, 2000).

Estas enzimas presentan alta estabilidad a la temperatura, observada hasta los 70°C y tienen un rango amplio de pH de 2 hasta 12 (Vargas Ramírez, 2016). Si se somete a la enzima en soluciones de peróxido de hidrogeno con concentraciones superiores a 15mM lo vuelven un sustrato suicida par la enzima (Sánchez Zamorano, 2009).

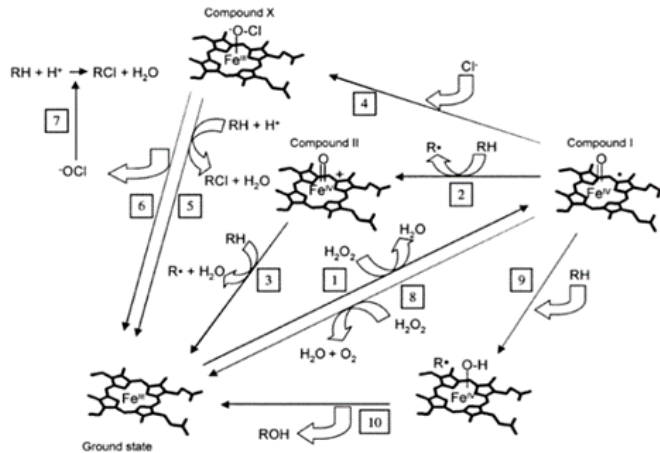


Figura 14. Ciclo catalítico de las peroxidasas (Vargas Ramírez, 2016).

7 Antecedentes

7.1 Sensores microfluídicos para aplicación

alimenticia

La microfluídica es la ciencia y tecnología de los sistemas que procesas o manipulan cantidades pequeñas (de 10^{-8} a 10^{-18} litros) de alguna sustancia líquida. Los sensores, dispositivos que permiten la detección y el análisis de sustancias en fluidos a nivel microscópico, son una de las aplicaciones más prometedoras (Whitesides, 2006).

La aparición de sensores microfluídicos basados en papel sucedió en el 2007, los cuales se aprovechan del mecanismo del movimiento del fluido que es a través de fuerzas capilares de las microfibras del papel (Burdallo-Bautista, 2014). Estos sensores son prometedores, ya que la mayoría de los sensores de papel adsorben físicamente los elementos de biorreconocimiento, lo que los convierte en dispositivos altamente eficientes. (Hossain et al., 2009).

Ofrecen ventajas relevantes sobre otros métodos tradicionales, incrementando el interés en estos:

- Alta sensibilidad y especificidad: los sensores microfluídicos pueden detectar cantidades muy pequeñas de sustancia con precisión.
- Análisis rápido: estos sensores pueden proporcionar resultados *in situ* en menos tiempo.
- Volumen de muestra: requieren de poco volumen de muestra.
- Portabilidad: ideal por su tamaño pequeño, ideales para análisis *in situ*.
- Costo: algunos sensores microfluídicos son más accesibles que métodos tradicionales.

Tienen aplicaciones en diversas áreas, esto incluye al sector alimenticio en la industria, por su gran capacidad de mejoramiento de la seguridad y control de calidad.

Los métodos de detección tradicionales generalmente están basados en el análisis instrumental, que es preciso y confiable, pero tiene limitaciones, tales como, tiempo de respuesta, baja sensibilidad, operación compleja, consumo de material y muestras (Neethirajan & Lin, 2010). El análisis de la seguridad alimentaria adecuada es importante para controlar la contaminación de la materia prima y su supervisión (Gao et al., 2020b).



Figura 15. Diferentes métodos para la fabricación de dispositivos microfluídicos (Jurinjak Tušek et al., 2021).

Los sensores microfluídicos en la industria alimentaria ha tomado mayor importancia para la detección y análisis de varias sustancias. Funcionan detectando y midiendo parámetros microbiológicos en las superficies de contacto con las sustancias por analizar. Estos sensores pueden detectar cambios en las reacciones entre el elemento de reconocimiento y el analito, para traducirlo a señales medibles y que son proporcionales a la cantidad del analito presente (Jiménez & León P, 2008).

Desarrollos destacables de sensores microfluídicos para la seguridad alimentaria se han dado en diferentes campos; residuos de pesticidas; medicamentos veterinarios y agentes promotores del crecimiento; bacteria patogénica y toxinas naturales (Farré et al., 2012).

7.2 Sensores colorimétricos para aplicación

alimenticia

La colorimetría es una técnica basada en la medición de los colores primarios observables por el ojo humano (RGB). Su diseño está principalmente basado en los tintes quimio-responsivos y soportes sólidos. Funcionan detectando cambios de color, usualmente utilizando un lector portátil para una medición más precisa (Xiao-wei et al., 2018).

En la industria alimenticia, los sensores colorimétricos se utilizan principalmente para monitorear la calidad, la frescura y la detección de contaminantes, así como para garantizar la seguridad alimentaria. Estos sensores pueden detectar una variedad de sustancias, como metales pesados, toxinas naturales, patógenos bacterianos, pesticidas, etc (Bülbül et al., 2015). Son simples, rápidos y rentables para el monitoreo constante de los productos o materia prima en la industria alimentaria (Liu et al., 2018).

Los sensores colorimétricos a base de quitosano se muestran prometedores en la industria alimenticia mejorando la seguridad alimentaria y control de calidad, por ser rentables, biodegradables y sensibles a las variaciones de pH (Alaya et al., 2019).

Tabla 3. Ejemplos de sensores colorimétricos en la industria alimentaria

Sensor	Principio	Estrategia de detección	Referencia
Sensor colorimétrico basado en AuNp.	Se basa en las propiedades ópticas de la nanopartícula. Agregación inducida por el enlace de hidrogeno a nanopartículas de oro modificadas con melamina. El cambio de color de los distintos colorantes ópticos,	Herbicida atrazina.	(Liu et al., 2015)
Código de barras colorimétrico.	en un soporte de papel, que componen el código se debe a la emisión de compuestos volátiles.	pH y compuestos orgánicos volátiles.	(Y. Chen et al., 2017)

Sensor colorimétrico de AuNp.	Se funcionaliza la Np con aptámeros.	β -antagonistas en alimentos de origen animal.	(Li et al., 2020)
Matrices de sensores colorimétricos.	Colorantes quimiorreactivos según su sensibilidad, selectividad y estabilidad. Con la condición de que deben de tener un centro de interacción.	Porfirinas y metaloporfirinas.	(Xiao-wei et al., 2018)
Películas de quitosano como indicador de deterioro de pescado.	Película de quitosano con almidón, con colorante de extracto de col roja, que es sensible a los cambios de pH.	Indicador de pH.	(Silva-Pereira et al., 2015)

El desarrollo de sensores colorimétricos se ha basado en la búsqueda de métodos de detección rápidos, económicos, altamente selectivos y simples que satisfagan la necesidad como método analítico para determinar diferentes compuestos. En la **Tabla 3** se proporcionan algunos ejemplos de desarrollo de sensores colorimétricos supliendo estas necesidades. Debido a sus propiedades ópticas, químicas, electrónicas y catalíticas, que dependen del tamaño de la nanopartícula, las nanopartículas de oro son muy interesantes. Aunado a esto la biocompatibilidad (Li et al., 2020; Liu et al., 2018; Vantasin et al., 2013).

Se describen dos usos diferentes de las nanopartículas de oro en esta tabla. El primer ejemplo, como método de detección de atrazina en agua de grifo, funcionalizando las nanopartículas con melamina, esperando la aglomeración de estas en respuesta a la presencia de atrazina, así cambiando su color de rojo a azul del sensor (Liu et al., 2015, 2018); otro ejemplo del uso de AuNps para desarrollo de sensores colorimétricos para detectar aditivos ilegales en los alimentos procesados de consumo humano, tales como: formaldehído, nitritos, clenbuterol, dióxido de azufre, colorante rojo sudan, ftalatos (Li et al., 2020).

Igualmente existe interés en tintes quimioresponsivos, que responden según su entorno químico, interacción que se da entre los analitos y su centro activo acoplado con un cromóforo. Se han desarrollado sensores para responder ante los VOCs (Compuestos orgánicos volátiles), con el objetivo de mantener la calidad de los alimentos en el anaquel y proporcionar al consumidor una imagen visual de su estado. En la Tabla 3. Ejemplos de sensores colorimétricos en la industria alimentaria se describen dos ejemplos. El primero es un código de barras desarrollado en papel colocado en envolturas, para monitorear el estado de descomposición de la comida. Se indica por medio del cambio de colores, así como la combinación de las barras que reaccionan y las que no, resultando en un patrón (Xiao-wei et al., 2018). El segundo ejemplo de estos

sensores es un código de barras que cambia de color, mismo que denota el estado de descomposición de los alimentos (Y. Chen et al., 2017).

Finalmente, el quitosano como material base para los sensores colorimétricos tiene la ventaja de ser un material no tóxico y biocompatible, obteniéndose de fuentes renovables, implicando también un bajo costo. Sus aplicaciones más notables en la industria alimenticia incluyen la creación de revestimientos antioxidantes, cubiertas para prolongar la vida útil del anaquel y envases inteligentes que muestran la calidad del alimento. En el ejemplo de **Tabla 3** se utilizó extracto de col roja en un revestimiento de quitosano, que es reactiva al cambio de pH, lo que indicaría el estado de descomposición del alimento monitoreado (Silva-Pereira et al., 2015).

7.3 Sensores colorimétricos para la medición de analitos de la leche bovina

Los sensores colorimétricos se han desarrollado para múltiples aplicaciones en el análisis de la leche bovina dentro de la industria alimentaria. Estos sensores ofrecen un medio para la detección rápida, simple y portable de varios compuestos o sustancias en las muestras de leche (Poghossian et al., 2019). Sus ventajas para el uso del monitoreo en la industria alimenticia de la leche bovina incluyen:

- Simplicidad: ofrece un método fácil de interpretar.
- Portabilidad: es un método que puede hacerse in situ.
- Costo-efectivo: a menudo son de bajo costo, lo que abre una ventana al monitoreo de rutina.
- Procesamiento mínimo de muestra: requiere poca cantidad de muestra.
- Especificidad y sensibilidad:

Algunos ejemplos del uso de sensores colorimétricos en el control de la calidad de la leche bovina; para la detección de residuos de antibióticos, resultado de su uso en el ganado para control de procesos infecciosos y aumento de la capacidad de producción (Díaz-García et al., 2022); para la detección y cuantificación de la urea, que se eleva en caso de añadirle aditivos a la leche (Nandeshwar et al., 2023); para la cuantificación de sulfonamidas, que en cantidades elevadas puede causarle daño al consumidor (Carolina Rafanhin Sousa et al., 2021); para la detección de mastitis y cetosis en la leche bovina, como monitoreo del bienestar de las vacas (Thiruvengadam et al., 2020); incluso existen sensores para los propios alérgenos de la leche misma (Nehra et al., 2020).

En el caso de monitorear la calidad de la leche, con el propósito de cuidar los estándares de ésta, podemos encontrar lo siguiente:

Tabla 4. Sensores colorimétricos para el monitoreo de los analitos de la leche bovina.

Sensor	Principio	Estrategia de detección	Referencia
Sensor colorimétrico para el sentido del pH de la leche.	La acidez de la leche es un marcador de su estado. Sensor de un nanocomposito de polipirrol/plata depositado químicamente en fibra de poliéster.	Indicador de pH.	(Voskoboynikova et al., 2021)
Detección colorimétrica de compuestos volátiles orgánicos.	Sensor colorimétrico basado en nanopartículas de SiO_2 y reactivo de Schiff.	Detección de VOCs. Esto indica el estado de descomposición de la leche.	(Ziyaina et al., 2019)
Cuantificación colorimétrica del contenido de proteína presente en la leche bovina.	AuNps estabilizadas con almidón. Se basa en la estabilización de las proteínas que inhibe la agregación de las Nps inducida por el ácido clorhídrico.	Basado en el cambio de color inducido en la presencia de proteínas.	(Vantasin et al., 2013)

Con los ejemplos brindados en la **Tabla 4** podemos destacar los beneficios de la creación en este tipo de sensores para el monitoreo de la leche bovina en la industria, en cualquier instancia de la cadena de producción; reduciendo las pérdidas de producto y los costos de monitoreo. El primer sensor mide el pH, basándose en el conocimiento de que la acidez es un marcador del estado de la leche, esto debido al crecimiento de bacterias ácido-lácticas. Este propone un sensor químico óptico, reactivo al pH, cambiando de rojo a verde según su acidez o alcalinidad respectivamente, diseñado para monitorear la leche envasada en anaquel (Voskoboynikova et al., 2021).

En el caso del segundo sensor citado en la tabla, se basa en la detección de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) liberados por las bacterias ácido-lácticas, con el propósito de monitorear a la leche en anaquel. Es un sensor colorimétrico basado en nanopartículas de dióxido de silicio (SiO_2), en presencia de los VOCs se produce un cambio de color de rosa a morado, según el estado de descomposición de la leche (Ziyaina et al., 2019).

Por último, un método analítico colorimétrico para cuantificar el contenido de proteína presente en la leche bovina. Este método se desarrolló con base en el poder de estabilización de las proteínas que inhibe la agregación de las nanopartículas inducida por ácido clorhídrico; el cambio resultante por la agregación de las nanopartículas de oro (AuNps) estabilizadas con almidón presenta un cambio de color de rojo a azul, según la cantidad de proteínas presentes (Vantasin et al., 2013). Cabe destacar, que, al ser métodos colorimétricos, hace posible la lectura de resultado a simple vista, sin la necesidad de procesos largos y especializados.

8 Metodología

8.1 Preparación

Para llevar a cabo el estudio, se utilizó leche bovina como material de análisis obtenida de manera comercial, mediante la compra de diferentes marcas y tipos de leches en tiendas y supermercados locales. Se hicieron pruebas enzimáticas con muestras representativas de cada analito y concentraciones de interés de los análisis correspondientes en una solución de buffer de fosfatos de pH 7.

8.2 Diseño de prototipo

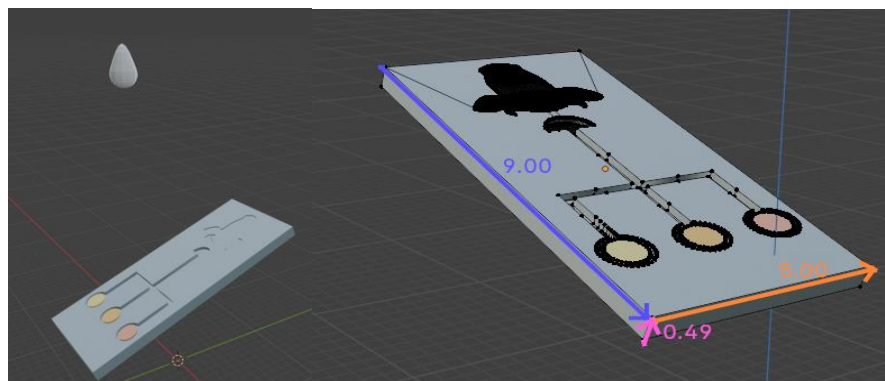


Figura 16. Diseño del dispositivo microfluídico colorimétrico

Diseño propuesto para la canalización de la leche bovina hacia tres sensores colorimétricos, en las cuales están inmovilizadas las enzimas correspondientes a cada analito,

con el fin de simplificar la presentación visual de los resultados. Las dimensiones están expresadas en centímetros (**Figura 16**). La inclusión de la imagen de la vaca se limita a propósitos estéticos.

8.3 Síntesis de nanoesferas de quitosano

El quitosano de bajo peso molecular se disolverá en tres soluciones acuosas de ácido acético glacial (0.5, 1.0 y 1.5% *v/v*) para formar una solución de concentración final de 1.25 *mg/ml*. Esta solución se mantuvo en agitación por 24 *h* a temperatura ambiente utilizando agitador magnético. El pH inicial resultante es de 4.7 usando una solución de *NaOH* 1*N*.

La solución fue filtrada a través de una jeringa con un tamaño de poro de 0.45 μm para la remoción de partículas insolubles. El tripolifosfato de sodio (*TPP*) fue preparado y disuelto en agua ultrapura a una concentración final de 0.56 *mg/ml* con ayuda de agitación magnética. El *TPP* fue agregado gota por gota con una jeringa 2 *ml* en la solución de 5 *ml* de quitosano para la elaboración de las nanopartículas de QTPP.

La mezcla se mantuvo en constante agitación durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión resultante con las nanopartículas se centrifugó a 3200 *rpm* por 20 min.

8.4 Inmovilización de enzimas en nanopartículas de quitosano

Mediante reactivos cromogénicos correspondientes a los marcadores de lactosa, colesterol y ácido láctico, para detectar a este marcador se usó una mezcla de enzimas: Xantina deshidrogenasa/Xantina oxidasa, y el adecuado colorante de respuesta y pH.

1. Para la detección de lactosa se utilizará una mezcla de enzimas: lactasa oxidasa, glucosa oxidasa y peroxidasa; y un colorante de respuesta propio, 4 – *aminofenazona*.
2. Para la detección de lactato se utilizó la siguiente mezcla de enzimas: lactato oxidasa y peroxidasa; y un colorante de respuesta propio, 4 – *aminofenazona*.

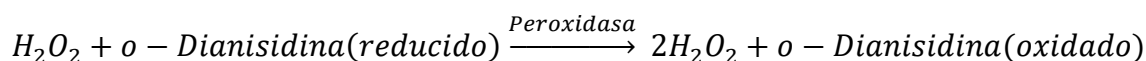
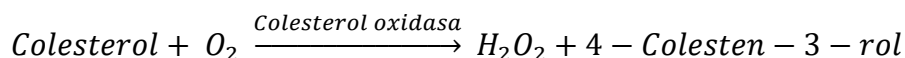
3. Por último, para la detección de colesterol se utiliza la siguiente mezcla: colesterol oxidasa y peroxidasa; y un colorante de respuesta propio, 4 – *aminofenazona*.

8.5 Análisis colorimétrico cuantitativo para determinar las concentraciones de los marcadores

Se realizó un análisis colorimétrico en donde se tomaron muestras del biofluido sobre papel de filtro y éste fue insertado en depósitos de contención. Las respuestas colorimétricas de cada ensayo sobre los rangos típicos de concentración para cada una de las químicas objetivo proporcionaron información espectral para los marcadores de referencia de color del número de señales e intensidad de estas, de la absorbancia y longitud de onda que se obtuvo de cada una. El ensayo de pH fue con un indicador comercial.

8.6 Ensayo enzimático del colesterol oxidasa

El ensayo enzimático se basa en la siguiente reacción:



Tomando en cuenta las siguientes condiciones:

$$T = 25^\circ\text{C}, \text{pH} = 7.5$$

El proceso de ensayo de Sigma Aldrich es un método colorimétrico, para la determinación del colesterol oxidasa se describe a continuación, tanto para las pruebas como para el blanco. Se prepararon diferentes soluciones para poder llevar a cabo el ensayo:

- Solución 50mM de buffer de fosfato potásico, *Ph* 7.5.
Se preparó una solución de fosfato de potasio 6.8Mg/ml en agua destilada, y se ajustó el pH con KOH 1M a 25°C.
- Solución *o* – Dianisidina 1% (*m/v*).
Se preparó 10.0 mg/ml en el Buffer de fosfatos.
- Colesterol 0.5% (*m/v*) con solución de Tritón 10% (*m/v*).

Se disolvieron 500mg de colesterol en 10ml de tritón. Se calentó la solución en constante agitación hasta la clarificación de esta. Después, lentamente se agregó 90ml de agua destilada a una temperatura entre 70 – 80°C. Se continuó con agitándose la solución a esa temperatura durante 10 minutos.

- Solución de peroxidasa.
Se preparó una solución de 100 u/ml de peroxidasa en agua destilada.
- Solución de colesterol oxidasa.
Se preparó una solución de 0.1 – 0.2 u/ml de colesterol oxidasa en el buffer de fosfatos.

Para la prueba, se preparó una solución de reacción pipeteando en un contenedor adecuado, 40ml de la solución de buffer de fosfatos y 0.50ml de la solución de *o* – *Dianisidina*. Se mantuvo en agitación para ajustar el pH a 7.5 con 0.1 M HCl o KOH según sea necesario.

Se colocaron los siguientes reactivos en contenedores adecuados:

Tabla 5. Reactivos utilizados en la prueba en ml

	Prueba	Blanco
Solución de reacción	2.70	2.70
Solución colesterol	0.10	0.10
Solución de peroxidasa	0.10	0.10

Se añaden las soluciones de acuerdo con la prueba:

Buffer	— — —	0.10
Solución de colesterol oxidasa	0.10	— — —

Posteriormente se leen las absorbancias del blanco y de las pruebas a una longitud de onda de 500 nm. Aproximadamente cada cinco minutos se toma la medición nuevamente.

Los cálculos se hacen de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Unidad}}{\text{ml enzima}} = \frac{(A_{500nm}Prueba - A_{500nm}Blanco)(3.0)(df)}{(7.5)(0.10)}$$

Donde:

3.0 Volumen total del ensayo (ml)

df Factor de dilución

7.5 Coeficiente de extinción milimolar de la 0 – *Dianisidina* oxidada a 500nm

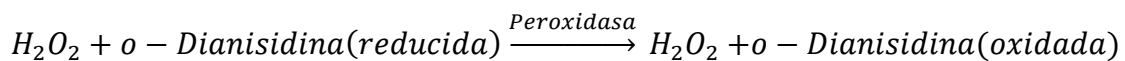
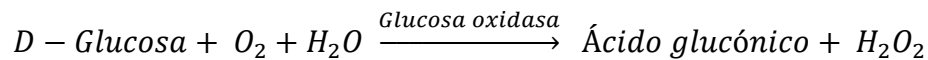
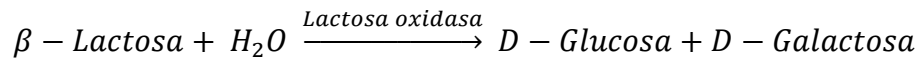
0.10 Volumen en mililitros de la enzima usada

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg de sólido}} = \frac{\text{Unidades/ml de enzima}}{\text{mg sólido/ml enzima}}$$

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\text{Unidad/ml de enzima}}{\text{mg sólido/mg enzima}}$$

8.7 Ensayo enzimático lactosa

El ensayo se basa en lo siguiente:



Tomando en cuenta las siguientes condiciones:

$$T = 37^\circ\text{C}, \text{pH} = 7.3$$

El proceso de ensayo de Sigma Aldrich es un método colorimétrico, para la determinación del colesterol oxidasa se describe a continuación, tanto para las pruebas como para el blanco. Se prepararon diferentes soluciones para poder llevar a cabo el ensayo:

- Se preparó 100 ml de buffer de potasio monobásico 100mM en agua destilada.
- Solución de Buffer de Fosfatos de Potasio 100mM en agua destilada.

- Solución de Lactosa al 1.0% (m/v).
Se preparó 40 mL con el Buffer de Potasio Monobásico.
- Solución de Sulfato de Magnesio 100 mM.
Se prepararon 5 ml.
- Solución de o-Dianisidina 6.3 mM.
- Solución de Peroxidasa-Glucosa oxidasa, conteniendo 3 – 5 u/ml en 100 ml agua desionizada.
- Se preparó una solución de Glucosa de concentración 100 g/l.
- Solución de la enzima Lactasa, conteniendo 3 – 5 u/ml, en solución de Buffer de Fosfatos.

Para el procedimiento se colocaron los reactivos en diferentes contenedores, las siguientes cantidades:

Tabla 6. Cantidades en ml de reactivo usados para el ensayo enzimático de la lactasa.

	Prueba	Blanco
Buffer de Fosfatos	0.70	0.70
Solución de Lactosa	4.00	4.00
Solución de Sulfato de Magnesio	0.20	0.20

Posteriormente, se equilibra la temperatura a 37°C y se añade lo siguiente:

Solución de Lactasa	0.10	— — —
Solución de Peroxidasa-Glucosa oxidasa	1.00	1.00
Solución o-Dianisidina	6.00	6.00

Posteriormente se leen las absorbancias del blanco y de las pruebas a una longitud de onda de 510 nm. Aproximadamente cada cinco minutos se toma la medición nuevamente.

Los cálculos se hacen de la siguiente manera:

$$A_{510nm} \text{ muestra} = A_{510nm} \text{ Prueba} - A_{510nm} \text{ Blanco}$$

$$\frac{\text{Unidad}}{\text{ml enzima}} = \frac{(\mu\text{moles de glucosa})(6)}{(0.2)(30)(0.1)}$$

Donde:

6 = Volumen (ml) usado de o-Dianisidina.

0.2 = Volumen (ml) usado de sol. De Sulfato de Magnesio.

30 = Tiempo del ensayo (min) por la definición de *unidad*.

0.1 = Volumen (ml) de enzima usada.

Definición de unidad:

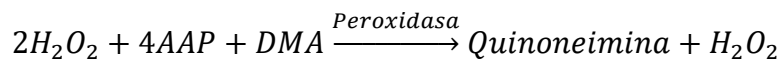
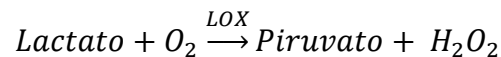
Una unidad hidrolizará 1.0 μmol de Lactosa a Glucosa y Galactosa por minuto a pH 7.3 a 37°C.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg de sólido}} = \frac{\text{Unidades/ml de enzima}}{\text{mg sólido/ml enzima}}$$

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\text{Unidad/ml de enzima}}{\text{mg sólido/mg enzima}}$$

8.8 Ensayo enzimático del lactato oxidasa

El principio del ensayo se basa en lo siguiente:



Tomando en cuenta las siguientes condiciones:

$$T = 37^\circ\text{C}, \text{pH} = 6.5$$

El ensayo de sigma-aldrich es a través de una determinación espectrofotométrica para la determinación del lactato oxidasa se describe a continuación, tanto para las pruebas como para el blanco. Se prepararon diferentes soluciones para poder llevar a cabo el ensayo:

- Buffer 200mM de Ácido 3,3-Dimetilglutárico, ajustado a un pH de 6.5 con NaOH.
- Solución de 4-Aminosntipirina 15mM.
- Solución de ácido láctico 500mM.
- Solución de la enzima peroxidasa, 50 u/ml.
- Buffer de Fosfato de Potasio 10mM con 0.010mM de FAD (Dinucleótido de Adenina y Flavina).
- Solución de *N,N – Dimetilanilina* 0.2%(v/v).
- 0.25%(P/v) de solución de ácido dodecibencesulfónico (DBS).
- Solución de la enzima lactato oxidasa 0.1 – 0.2 inoadad/ml.

Se preparó la solución de reacción utilizando las siguientes cantidades de los reactivos:

Tabla 7 solución de reacción para el ensayo enzimático del lactato oxidasa.

	mL
Buffer de Ácido 3,3-Dimetilglutárico	2.00
Solución de peroxidasa	1.00
Solución de 4-Aminostipirina	1.00
Solución de ácido láctico	1.00
Agua destilada	3.00

Posteriormente se prepararon los reactivos (en ml) para el ensayo enzimático, procurando mantener una temperatura de 37°C.

	Prueba	Blanco
Solución de reacción	0.80	0.80
Solución de Dimetilanilina	0.20	0.20
Solución de lactato oxidasa	0.020	— — —

Buffer de fosfatos	— — —	0.020
Solución de DBS	0.20	0.20

Los cálculos se hacen de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Unidad}}{\text{mg enzima}} = \frac{(A_{565\text{nm}}\text{Prueba} - A_{565}\text{Blanco})(3.02)(df)}{(35.33)(0.5)(10)(0.02)}$$

Donde:

3.02 = volumen total del ensayo

df =Factor de dilución

35.33 = Coeficiente de extinción milimolar del colorante Quinonediimina a 565 nm

0.5 = Factor de conversión basado en que un mol de H_2O_2 produce medio mol de colorante Quinonediimina

10 = Tiempo de ensayo según la definición de *unidad*

0.02 = Volumen (en ml) de enzima

$$\text{Unidad}/\text{mg solido} = \frac{\text{Unidad}/\text{ml enzima}}{\text{mg solido}/\text{ml enzima}}$$

Definición de unidad: Una unidad oxidará 1.0 μmolar de L-lactato a piruvato y H_2O_2 por minuto a un pH 6.5 a 37°C.

9 Resultados y discusión

9.1 Nano-esferas de quitosano

9.1.1 Caracterización SEM

La microscopía electrónica de barrido SEM es una técnica que utiliza un haz concentrado de electrones para la obtención de imágenes de la morfología y microestructura de los materiales (Omidi et al., 2017). Se ha utilizado ampliamente en el estudio de nanopartículas (Clavijo, 2013).

Pueden alcanzar resoluciones superiores a 1 nanómetro y son capaces de realizar análisis de puntos seleccionados de la muestra (Zhou et al., 2007). Los parámetros del proceso de síntesis, como el nivel de acetilación del quitosano, el pH de la solución, la concentración de quitosano utilizada, la presencia de surfactantes y otros aditivos, determinan el tamaño de las nanopartículas de quitosano (Dutta et al., 2022; Singh et al., 2021). Se han reportado que el tamaño de las Nps sintetizadas por el método de gelación iónica se encuentran en un rango de 10 – 1000nm (Khanmohammadi et al., 2015; Rosyada et al., 2019). El tamaño de la nanopartícula afecta directamente las propiedades de; estabilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Mikušová et al., 2021).

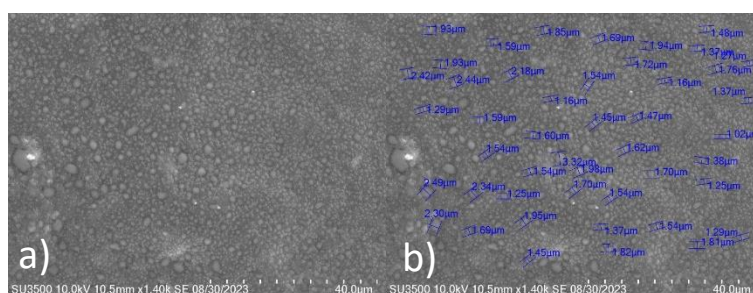


Figura 17. Imagen SEM de las nanoesferas de quitosano obtenidas. a) Imagen SEM con resolución de 40µm, b) Paneo de algunas nanopartículas.

Se obtuvieron las imágenes SEM de las nanopartículas de quitosano sintetizadas, como se muestran en la **Figura 17**. Se midieron los diámetros de las nanopartículas, obteniendo un promedio de aproximadamente 1256.0031nm, considerando su morfología como esféricas. En

la **Figura 17 b**), se tomaron aleatoriamente nanopartículas para su medición, donde se observan valores cercanos al promedio.

Se obtuvieron nanopartículas con diámetros que oscilaban entre 80 y 353nm, y más del 50% del material obtenido estaba cerca del diámetro promedio descrito en la literatura. Es importante mencionar que la distribución tan amplia de los diámetros se debe a la propia naturaleza del método de síntesis seleccionado, que es la gelación iónica. Es posible que también sea el resultado de la velocidad de aglomeración de la solución de nanopartículas de quitosano.

9.1.2 Caracterización Raman

La espectroscopía Raman es una técnica analítica no destructiva que proporciona información detallada sobre la cristalinidad, la polimorfía, la estructura química y las interacciones moleculares de un material. Los materiales de baja frecuencia pueden experimentar transiciones como la vibración y rotación (Warsito & Agustiani, 2021).

Está basado en la interacción de la luz con los enlaces químicos de la materia, y dependiendo de la estructura química del analito, la radiación incidente se dispersa en las moléculas vibrantes a diferentes longitudes de onda, produciendo un espectro Raman (Bumrah & Sharma, 2016). El espectro de vibración Raman es comúnmente utilizado para determinar los modos de vibración de las moléculas y provee de una “huella dactilar” característica de cada molécula para la identificación de los materiales (Xu et al., 2018). Puede ser aplicado para analizar sólidos, polvos, líquidos, etc.

Este tipo de espectroscopia se ha utilizado anteriormente para la caracterización de las nanopartículas del quitosano, con estudios que identifican cambios específicos en el material (Ren et al., 2014). Esta técnica también se ha aplicado para determinar el grado de acetilación del quitosano, y para estudiar el rendimiento de las nanopartículas de quitosano en una variedad de contextos, como sistemas de liberación de fármacos, aditivos alimenticios, clarificadores de agua y soportes para enzimas (Zajac et al., 2015).

Se ha reportado las bandas características de las nanopartículas de quitosano del espectro Raman, aparecieron en los correspondientes a la vibración de estiramiento de los anillos (969cm^{-1} , 1212cm^{-1} , 1325cm^{-1}) y principalmente a la vibración de estiramiento $C - H$ del epóxido (2837cm^{-1}), que también son los picos especiales del quitosano (Ren et al., 2014)(**Figura 18**).

De igual manera, en la literatura se pueden encontrar un pico característico 1378cm^{-1} que sugiere el doblamiento del enlace $P - O$, el cuál podemos observar ligeramente en el espectro resultante; mientras que, otro pico característico reportado sería el de la banda

Amida I (2857cm^{-1}), con posible variación dependiendo el grado de acetilación del quitosano (Piri-Gharaghie et al., 2022).

Por último, existe evidencia alrededor de 1550cm^{-1} . Asociada principalmente con la flexión del enlace N-H y la vibración de estiramiento del enlace C-N. Lo cual se ve reflejado en el espectro obtenido en este trabajo (Ren et al., 2014).

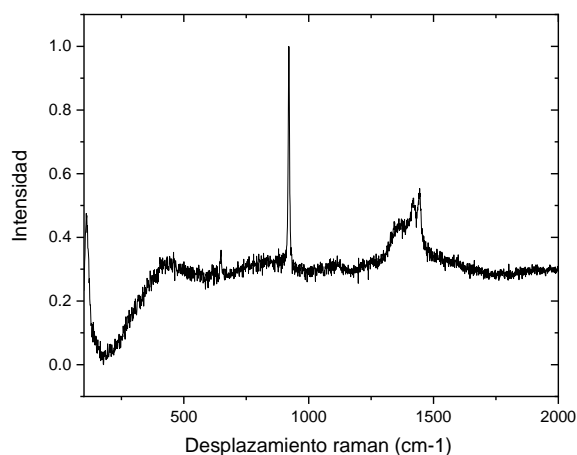


Figura 18. Espectro Raman de las nanoesferas de quitosano.

9.2 Biosensor de colesterol

9.2.1 Evaluación de la actividad enzimática de la enzima colesterol

oxidasa inmovilizada y en estado libre dependiente del pH

La **Figura 19**; se puede observar que el pH ideal en estado libre se encuentra en el rango de 7.0 a 8.0, encontrando un pico en 7.5, comparándolo con la literatura donde se reporta un pH óptimo de 7.0 en un medio acuoso, aunque la actividad puede variar considerablemente (Maclachlan et al., 2020).

De manera similar, se realizaron evaluaciones de la actividad enzimática en dos soportes: macroesferas de quitosano (MEQ) y nanoesferas de quitosano (NEQ). Se puede observar que la enzima inmovilizada en MEQ tiene una actividad enzimática más deficiente.

La actividad enzimática disminuye en los valores menores a 7.0 y valores mayores a 8.0 tanto para la enzima inmovilizada en diferentes soportes como en estado libre. Además, se puede observar que las acciones de las enzimas libres son similares a las de las enzimas inmovilizadas en NEQ, lo que indica una mayor estabilidad del pH.

El valor óptimo del pH puede variar según los materiales de soporte para la inmovilización, según su estructura y ambiente en el que están sometidos, el valor del pH depende de la carga de la enzima y de la matriz a la que está sujeta (Akkaya et al., 2009). Los nanomateriales poseen el tamaño ideal para la inmovilización de enzimas, siendo su área superficial mayor que los soportes convencionales, lo que brinda una relación volumen/superficie deseable (Ghosh et al., 2018).

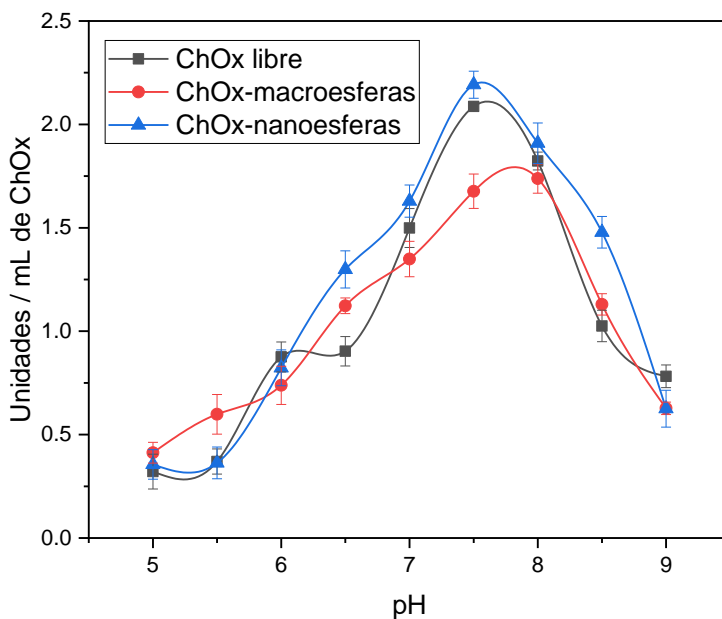


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la colesterol oxidasa inmovilizada sobre diferentes soportes.

9.2.2 Evaluación de la actividad enzimática de la enzima colesterol oxidasa inmovilizada y en estado libre dependiente de la temperatura

Se determinó la temperatura ideal para la actividad enzimática de la enzima COX libre e inmovilizada en soportes de NEQ Y MEQ. Se sometió a condiciones de temperaturas

crecientes, en un rango de 15 a 65°C con intervalos de 10°C cuyos resultados se muestran en la **Figura 20**.

Las características de la enzima libre e inmovilizada se compararon variando la temperatura, se puede observar que la actividad de la enzima aumenta a partir de los 30°C, pasando por la temperatura óptima de 40°C, después de esta temperatura hasta los 45°C donde la actividad va disminuyendo, lo que se puede atribuir a la desnaturalización de la enzima, lo reportado en la literatura comienza desde los 50°C (Vrieling & Ghisla, 2009).

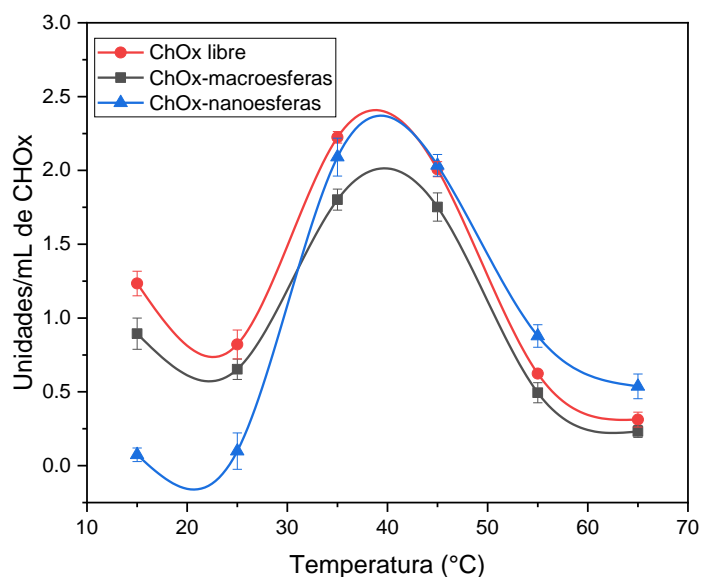


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la colesterol oxidasa inmovilizada sobre diferentes soportes (micro y nanoesferas de quitosano).

La temperatura óptima reportada en la literatura encontramos que es de 37°C (Ghosh et al., 2018). Podemos ver que el comportamiento de la enzima inmovilizada en MEQ presenta menor estabilidad a diferencia de la enzima libre que muestra una mejor estabilidad a temperaturas bajas, mientras que la enzima inmovilizada en NEQ mostró un mejor rendimiento o actividad del grupo de 40°C en adelante.

9.2.3 Acoplamiento enzimático del colesterol oxidasa sobre diferentes soportes

La inmovilización enzimática en soportes de quitosano con aplicación en biosensores es un área de gran interés con el objetivo de mejorar las características de las enzimas inmovilizadas (Lárez Velásquez, 2006). Esto debido a las mismas propiedades del material: alta afinidad por las proteínas, naturaleza no tóxica y compatibilidad fisiológica (Salazar-Leyva et al., 2013).

El quitosano tiene grupos funcionales que hacen posible este acoplamiento, tales como poliamina, amino e hidroxilo, los cuales confieren estabilidad a los soportes portadores. Los múltiples grupos funcionales que facilitan la unión entre la enzima y el quitosano (Verma et al., 2020).

En la **Figura 21** podemos observar la curva de acoplamiento, resultado de la inmovilización de la enzima colesterol oxidasa sobre un soporte de MEQ y de NEQ. En el caso de las MEQ, existe un cambio abrupto en la enzima inmovilizada a partir del minuto 15; los resultados se mantuvieron aproximadamente en el mismo valor de porcentaje de eficiencia de inmovilización. En el caso de las NEQ, se observa un comportamiento similar; se puede notar un cambio repentino a partir del minuto 20, con un ligero porcentaje mayor de eficiencia a partir de ese momento, estabilizándose en un porcentaje de 82% aproximadamente.

Se encuentra que el mejor acople de la enzima colesterol oxidasa lo exhibe las NEQ, en un porcentaje del 82%, utilizando 1 mg/mL de concentración para la experimentación.

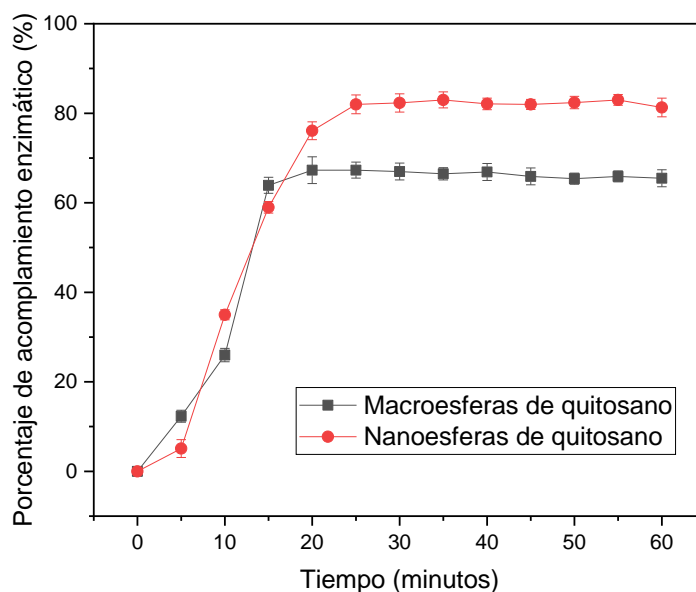


Figura 21. Acoplamiento de la enzima colesterol oxidasa sobre diferentes soportes (macroesferas y nanoesferas de quitosano).

La inmovilización ofrece ventajas en la estabilidad bioquímica de la enzima, como la tolerancia a las temperaturas altas y al pH. Aunque ninguna técnica puede inmovilizar por completo la enzima, cabe recalcar que es un resultado satisfactorio.

9.2.4 Pruebas colorimétricas para la detección enzimática de colesterol con la enzima colesterol oxidasa

9.2.4.1 Determinación colorimétrica de colesterol por distancias euclidianas

La distancia euclidiana en el espacio RGB (Red, Green, Blue por sus siglas en inglés) se utiliza habitualmente en el análisis de imágenes para representar la diferencia de color entre dos objetos en función de sus componentes rojo, verde y azul. Esta distancia puede utilizarse para medir una distinción entre colores, la diferencia entre dos colores corresponde aproximadamente a lo que el ojo humano puede percibir (Fan et al., 2021).

Las diferencias de color de una imagen pueden medirse objetivamente si se aplica la distancia euclidiana. Esto se consigue cuantificando la distancia entre los valores RGB de los píxeles, por color, de la imagen. El cálculo se hace de acuerdo con la ecuación de distancia RGB, herramienta que ayuda a medir las diferencias de color con precisión (Antonio et al., 2009).

$$DE = \sqrt{(R_M - R_B)^2 + (G_M - G_B)^2 + (B_M - B_B)^2}$$

Donde

DE es la distancia euclidiana

R, G y B son los valores promedio de los componentes de color rojo, verde y azul respectivamente.

M es la muestra

B es para el blanco, que no contiene la enzima, por lo que no tiene reacción química

En la **Figura 22** se puede observar la descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas donde se encontraron valores para las concentraciones de colesterol en las componentes R, G y B, que se encuentran dentro del rango establecido para las pruebas colorimétricas, incluido el blanco. Se puede apreciar una tendencia para cada componente, donde las tres componentes van de manera descendente, a una tasa diferente en cada una.

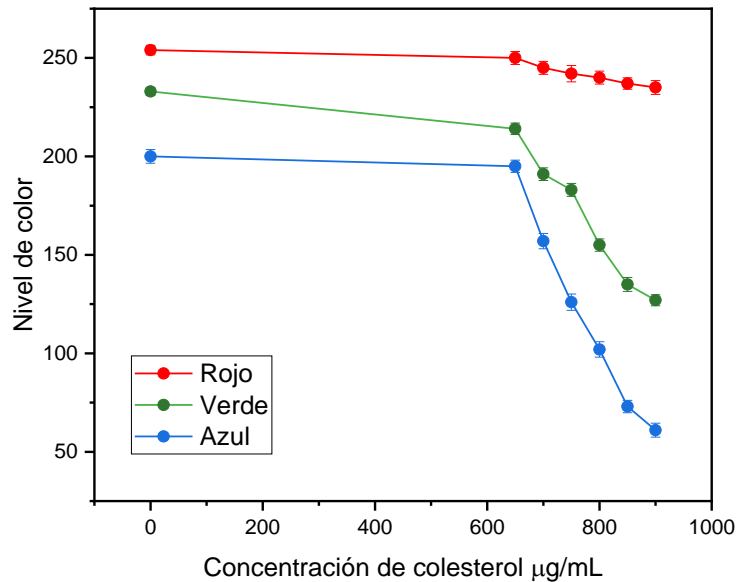


Figura 22. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de la enzima colesterol oxidasa.

La distancia euclidiana determina la diferencia que existe entre dos colores, lo que nos provee información de como el color cambia conforme al tiempo transcurrido para diferentes concentraciones de colesterol presente en la muestra, lo que nos permite detectar de manera colorimétrica los resultados.

Nos permite visualizar que el componente dominante es el R; a simple vista, se puede esperar un color rojizo, tornando a más oscuro por las otras componentes conforme va aumentando la concentración del colesterol.

Después de obtener las componentes RGB para cada concentración de colesterol, se realiza un análisis cuantitativo para relacionar las concentraciones de colesterol con la distancia euclidiana, en la **Figura 23** se muestra la curva de calibración para la determinación de la concentración de colesterol a partir de los valores RGB por el método de distancias euclidianas; en la cual se puede observar que conforme va aumentando la concentración del colesterol, el valor de la distancia euclidiana incrementa, lo que aprecia una relación proporcional.

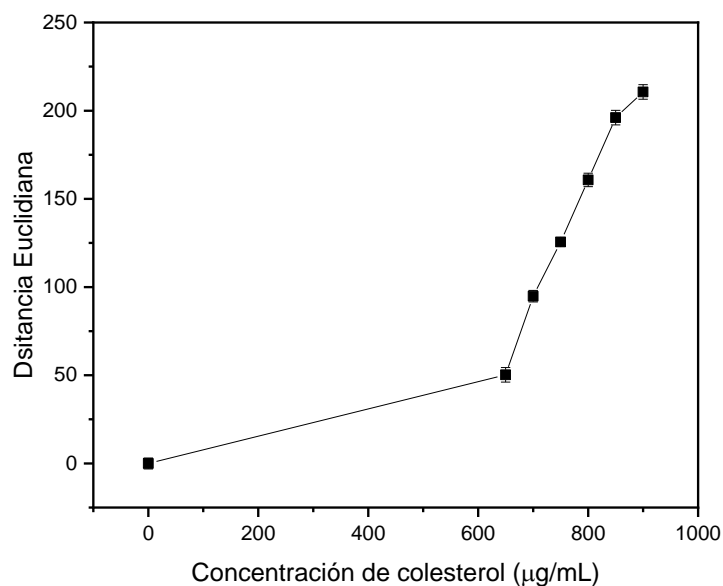


Figura 23. Curva de calibración para la determinación de la concentración de colesterol a partir de los valores RGB por el método de distancias Euclidianas.

La **Figura 24** muestra un modelo de regresión creado a partir de los resultados de la curva de calibración en la **Figura 23** y nos permite explicar la relación lineal existente entre la distancia euclidiana calculada y la concentración del colesterol.

Para verificar la eficiencia del modelo evaluando la calidad de ajuste con el coeficiente de determinación R^2 , cuyo valor está acotado entre 0 y 1. En el modelo propuesto, arroja un valor de 0.98563, lo que sugiere que la relación entre las variables es predictiva. Aunado a esto, al observar el coeficiente de Pearson, que emite un valor de 0.99279 se puede afirmar que existe una correlación lineal positiva. Por último, el valor residual es de 17.11691, que es la diferencia entre cada valor de la variable respuesta del experimento y la predicha por el modelo. Al tener un residuo relativamente pequeño y positivo, podemos confirmar que la tendencia de los valores RGB conforme aumenta la concentración del colesterol de la prueba es de aumento y que tiene un margen de error relativamente pequeño, lo que confirma la fidelidad del modelo.

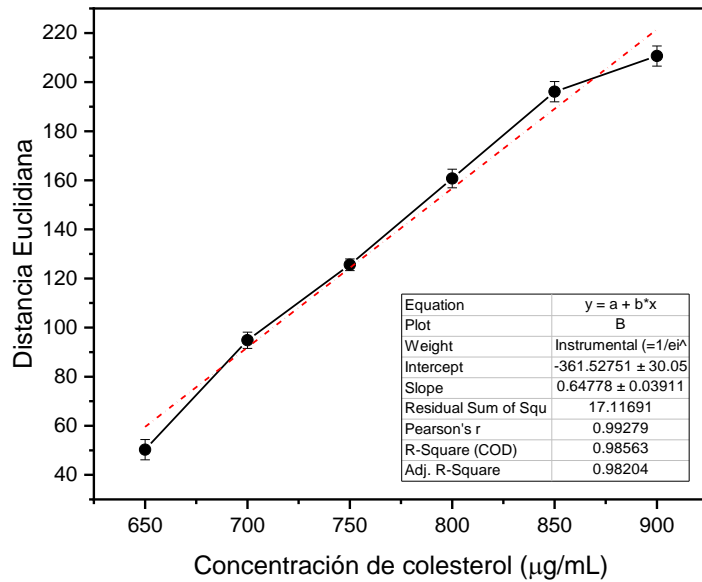


Figura 24. Regresión lineal para la curva de calibración para la determinación de concentración de colesterol.

Una vez obtenidos los valores positivos se creó un mapa de colores en el espacio RGB para distinguir fácilmente los cambios de color que se produjeron durante la prueba de la enzima colesterol oxidasa. Como se puede observar, a medida que aumenta la concentración en un rango determinado, el color que emitimos se vuelve cada vez más oscuro **Figura 25**. El propósito de este mapa de colores es representar el valor RGB de manera visual.

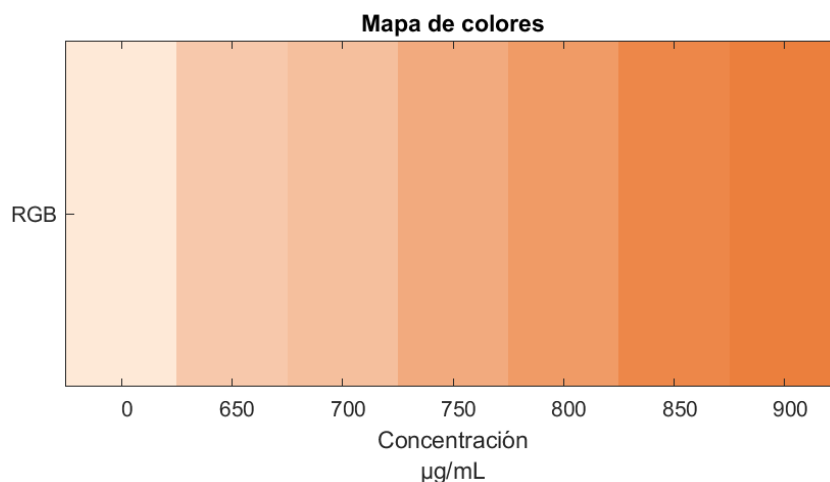


Figura 25. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de colesterol en la prueba colorimétrica de la enzima colesterol oxidasa.

En la figura **Figura 26** se muestra el perfil de color CIE 1931 como respuestas colorimétricas de las pruebas para la detección de colesterol con el sistema de colesterol oxidasa y o-Dianisidina.

La Comisión Internacional de iluminación (CIE) desarrolló este espacio de color en 1931, creando una conexión numérica entre las longitudes de onda del espectro visible y los colores que percibe el ojo humano (Ravi et al., 2015). El espacio de color CIE 1931 es útil para la detección colorimétrica porque tiene una definición matemática clara y puede representar con precisión los colores utilizando valores X, Y, y Z, lo que permite realizar mediciones y comparaciones precisas del color (Agoston, 1979).

La especificación del estímulo de color necesita de tres parámetros; la distribución de la radiación del iluminante, el grado de reflexión del objeto, y de la función colorimétrica del observador estándar. En un diagrama de este tipo, el borde representa una saturación máxima, mientras que en el centro existe un punto acromático (Chrisment, 1997).

El diagrama de cromaticidad obtenido muestra que los valores de la prueba colorimétrica del colesterol oxidasa están en los colores rosa a anaranjado.

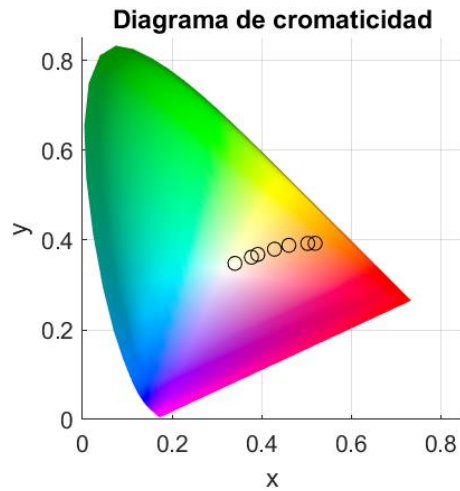


Figura 26. Distribución de colores obtenidos para la prueba colorimétrica de la enzima colesterol oxidasa en el diagrama de cromaticidad CTE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de colesterol.

Se puede observar en la **Figura 27** de una manera más cercana la distribución de los colores resultado de las concentraciones de colesterol, observando una tendencia en aumento, lo que implica un oscurecimiento del color.

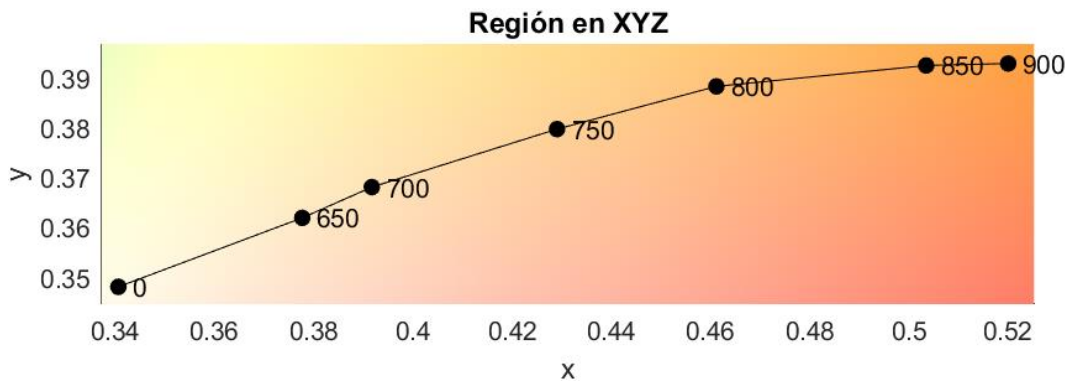
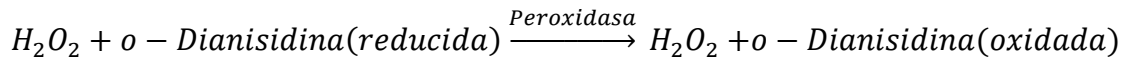
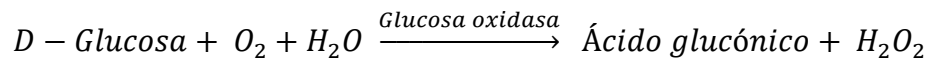
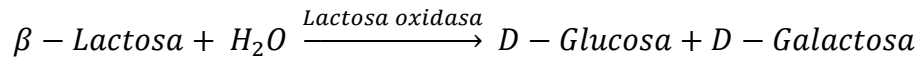


Figura 27. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CTE 1931 para la prueba colorimétrica de la enzima colesterol oxidasa.

9.3 Biosensor de lactosa

9.3.1 Pruebas colorimétricas para la detección enzimática de colesterol con colesterol oxidasa

El biosensor de lactosa aprovechará el mecanismo de formación de peróxido de hidrógeno a partir de la lactosa, en una secuencia de reacción como se observa a continuación:



Al reaccionar el peróxido con la enzima peroxidasa, cuantificamos colorimétricamente mediante una oxidación del agente cromogénico o-Dianisidina, lo que produce el color resultante observados en los resultados.

En la **Figura 28** se puede observar los componentes R, G y B, para las concentraciones de lactosa para las pruebas colorimétricas. Se observa una correlación negativa entre la concentración de lactosa y la presencia de los tres componentes. La componente R, al ser la más abundante, influye significativamente en la coloración resultante, esperándose tonos cercanos al naranja.

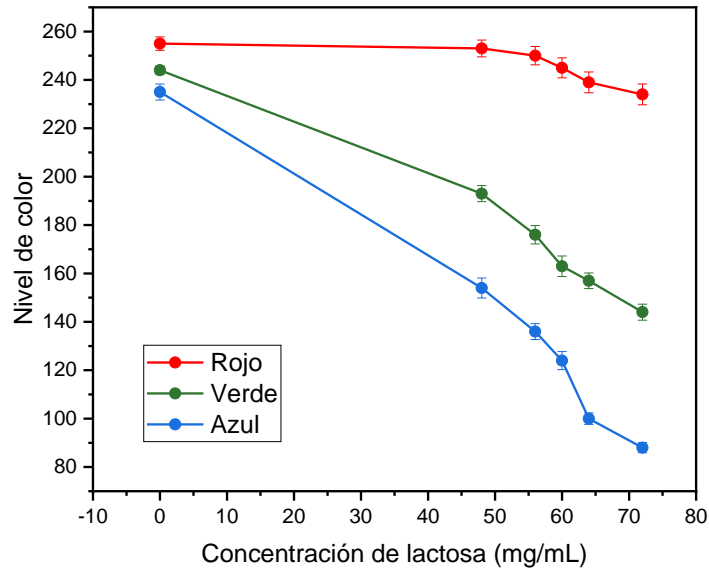


Figura 28. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de la enzima lactasa.

Después de la obtención de los componentes RGB para las concentraciones continuamos con el análisis cuantitativo, usando la ecuación de distancias euclidianas. Como se puede ver en la **Figura 29** se relaciona la distancia euclidiana con la concentración de lactosa, obteniendo una curva de calibración y realizando un ajuste lineal para su evaluación. En el análisis podemos apreciar una respuesta lineal relevante con un coeficiente de determinación R^2 de 0.9798, relacionándolo con su valor de cuadrados residual RSS de 72.57, el cual nos indica que el ajuste del modelo es bueno, se puede decir que la relación es predictiva. Además, al observar el coeficiente de Pearson, que nos arroja un valor de 0.98985 afirmamos que existe una correlación lineal positiva.

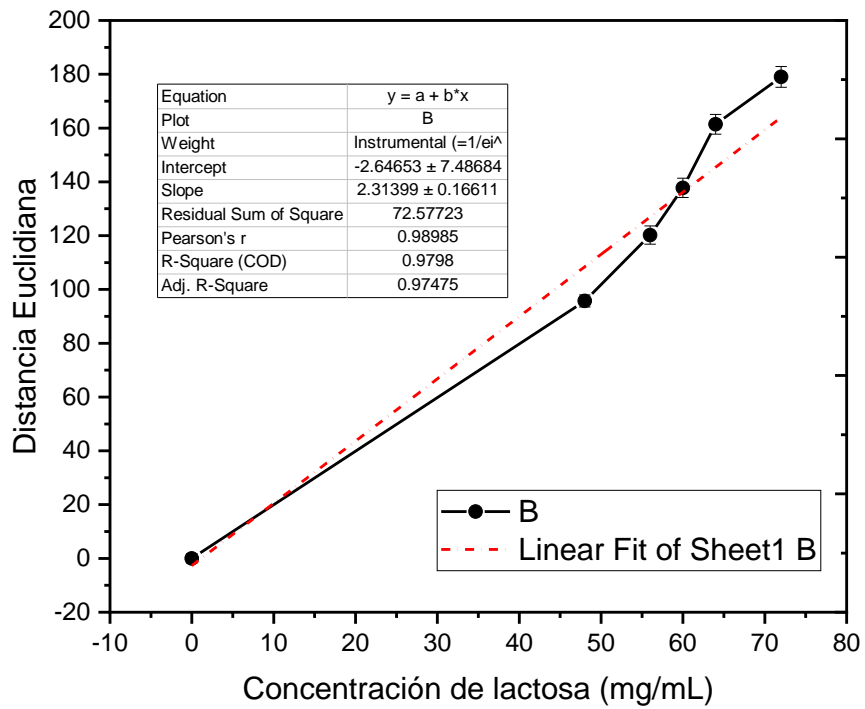


Figura 29. Regresión lineal para la curva de calibración para la determinación de concentración de lactosa.

En la **Figura 30** se creó un mapa de colores en el espacio de color RGB a partir de las pruebas colorimétricas de la enzima lactasa. Esto permite observar cómo los colores se comparan con la concentración de lactosa en la muestra.

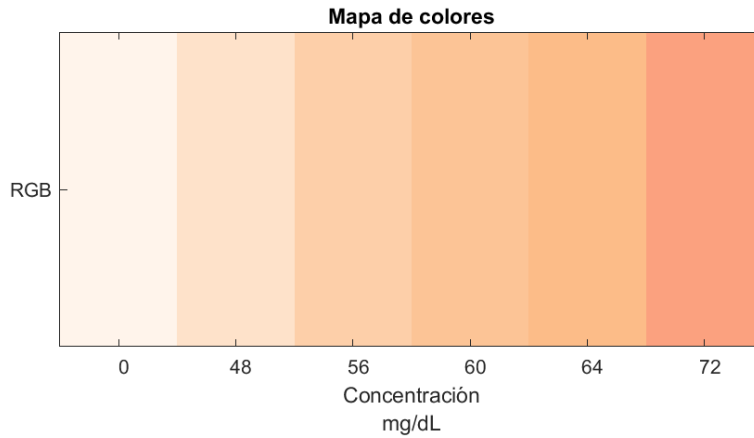


Figura 30. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de lactosa en la prueba colorimétrica de la enzima lactasa

Se extrajo un diagrama de cromaticidad CIE 1931, en la **Figura 31** donde se ilustra en que región se encuentran los valores de las pruebas colorimétricas, en este caso podemos decir que se localizan en la región del blanco al rosa-naranja, mismos que podemos ver plasmados en el mapa de colores.

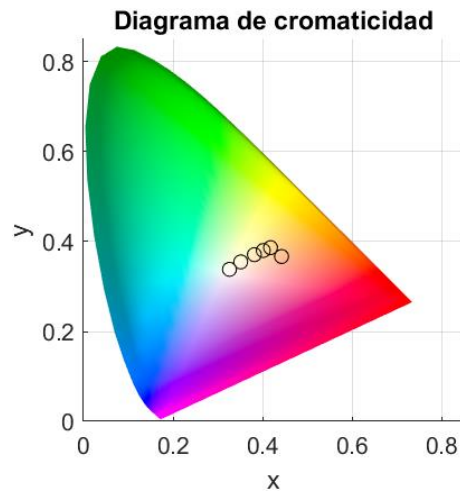


Figura 31. Distribución de colores obtenidos para la prueba colorimétrica de la enzima lactasa en el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de lactosa.

Para ver la distribución de las concentraciones del analito en el diagrama de cromaticidad, se acercó a la región XYZ, en la **Figura 32**. Donde podemos observar que hay cierta tendencia visual, excepto por el valor final, debido a la forma general del diagrama de cromaticidad, que proporciona una buena relación de concentración con los colores más saturados. No se pueden observar puntos donde la tendencia cambie, la saturación va en aumento casi constante, incluyendo el último valor, aunque se satura con otra tonalidad,

pasando de naranja a una tonalidad más rosácea-roja. Se puede inferir que el modelo refleja con la saturación directamente la concentración de la lactosa presente en el analito.

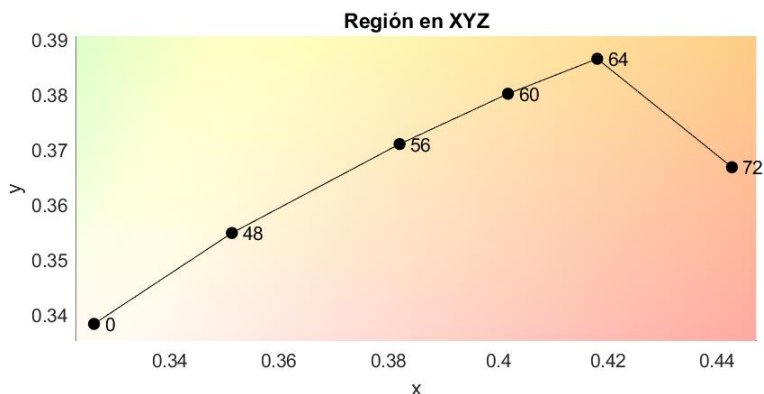


Figura 32. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de la enzima lactasa.

9.4 Biosensor de ácido láctico

9.4.1 Pruebas colorimétricas para la detección enzimática de ácido láctico con lactato oxidasa

De igual manera, se calcularon las distancias euclidianas de los componentes RGB de los resultados de las pruebas colorimétricas de colesterol oxidasa, en la **Figura 33** se pudo observar las tendencias de las diferentes componentes. En el caso del componente R, podemos decir que no existe mucho cambio, sin embargo, para los componentes G y B el caso es diferente, su tendencia es decreciente conforme la concentración de ácido láctico aumenta, con un ritmo diferente entre sí. En esta gráfica visualizamos que el color predominante es el rojo.

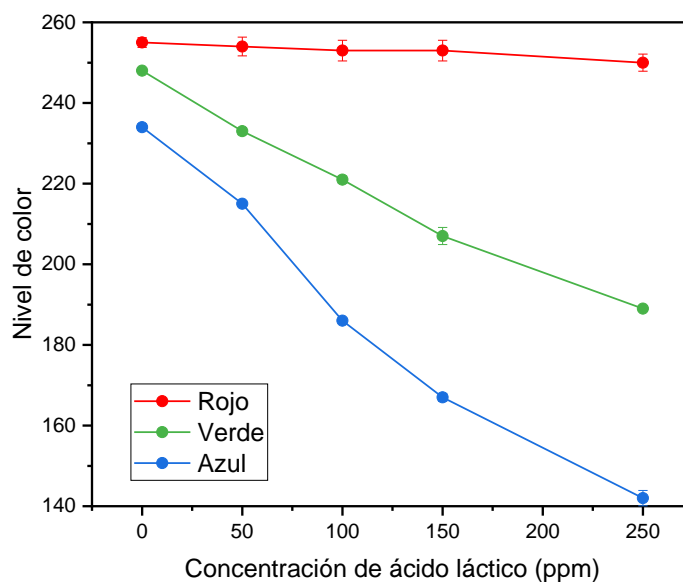


Figura 33. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de la enzima lactato oxidasa.

Después de obtener los componentes RGB para las diversas concentraciones del analito, pasamos al análisis cuantitativo. La curva de calibración, que se presenta en la **Figura 34** existe una relación directamente proporcional entre las dos variables, mostrando una tendencia a aumentar en relación con las distancias euclidianas y la concentración de ácido láctico.

La curva de calibración a partir de la regresión lineal nos indica la relación lineal, el valor de R^2 ajustado es de 0.97889, confirmando que el modelo es predictivo; así mismo, el coeficiente de correlación de Pearson tiene un valor de 0.98939, con lo que se confirma la relación lineal, como se puede comprobar visualmente. Igualmente, la suma residual tiene un valor de 157.80635 lo cual puede parecer alto, pero por los valores de concentración utilizados, se puede encontrar como adecuado.

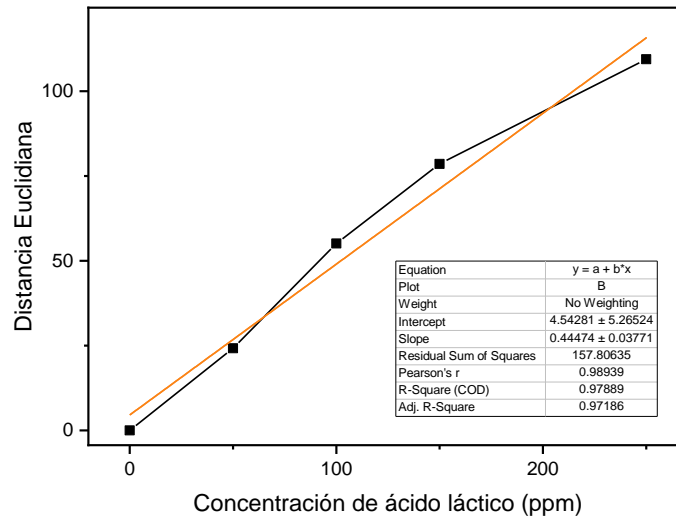


Figura 34. Regresión lineal para la curva de calibración para la determinación de concentración de ácido láctico.

A continuación, en la **Figura 35**, se tomaron a partir de los colores que arrojaron las pruebas colorimétricas, se creó un mapa en el espacio de color RGB que correspondía a cada una de las concentraciones del rango establecido para las pruebas, lo que nos muestra los colores obtenidos de esta prueba colorimétrica de manera precisa.

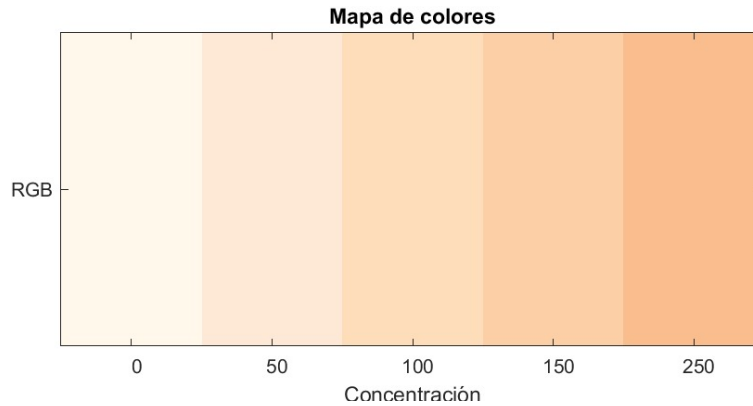


Figura 35. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de ácido láctico en la prueba colorimétrica de la enzima lactato oxidasa.

Finalmente se representan las intensidades RGB en el diagrama de cromaticidad CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas, en la **Figura 36** donde se puede observar que los valores resultantes de las pruebas se encuentran en dos regiones; partiendo desde la región blanco hacia la región rosa-naranja, notándose una saturación partiendo desde el blanco. Lo cual es satisfactorio, considerando que la saturación va de menor a mayor conforme la concentración del analito aumenta.

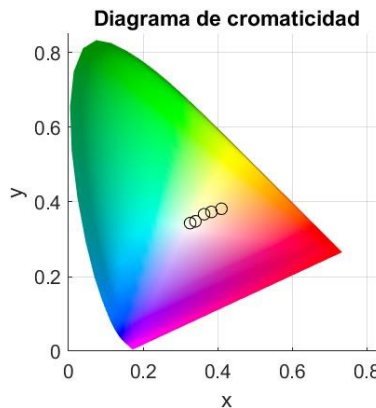


Figura 36. Distribución de colores obtenidos para la prueba colorimétrica de la enzima lactato oxidasa en el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de ácido láctico.

Los valores obtenidos de estas concentraciones se pueden observar de manera más evidente la tendencia de colores que se están discutiendo para esta prueba colorimétrica.

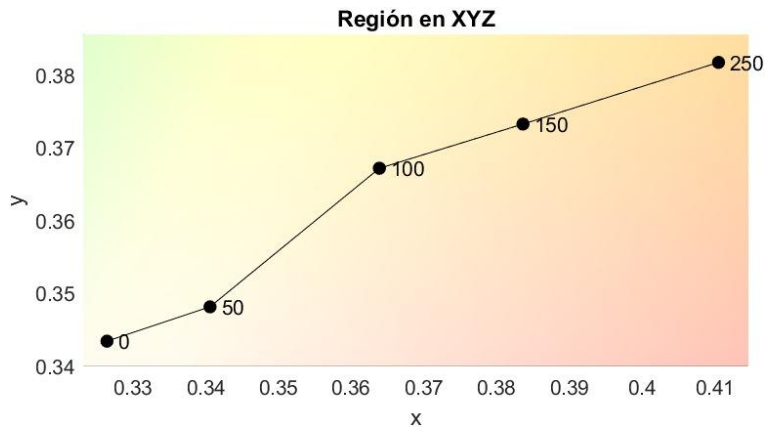


Figura 37. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CTE 1931 para la prueba colorimétrica de la enzima lactato oxidasa.

Las coordenadas XYZ representan los puntos resultantes del ensayo del lactato oxidasa, se emplean para investigar la relación del cambio colorimétrico y la concentración del analito. Se puede observar que la coloración del ensayo se intensifica proporcionalmente con el aumento de la concentración de lactato.

10 Conclusiones

El desarrollo de métodos de detección de analitos que sean sensibles, fiables, rápidas, portátiles y rentables es crucial para la seguridad alimentaria, ya que aborda problemas de contaminación por bacterias, contaminantes o toxinas.

Los biosensores colorimétricos son atractivos porque son fáciles de usar, tienen buena sensibilidad y son pequeños. El envasado de alimentos, la seguridad alimentaria y el control de calidad de los productos y materias primas están utilizando nanotecnología: creando métodos más efectivos para controlar la calidad de la materia prima mientras se reducen los desechos. Sin embargo, la industria alimentaria es más conservadora y se requieren más estudios para asegurarse de que los consumidores están seguros.

En este trabajo se propuso el uso de nanopartículas de quitosano para inmovilizar enzimas que ayudarán a detectar los analitos de interés. Al poder conocer de manera rápida in situ los parámetros de la leche, se podrá controlar de mejor manera la calidad de esta, como materia prima y como algún producto.

Los biosensores expuestos en este trabajo; lactosa, colesterol y ácido láctico, han mostrado una excelente correlación entre la concentración del analito y la distancia euclidiana calculada a partir de los valores RGB, lo que indica una alta precisión y reproducibilidad de los métodos. La representación de los resultados en el espacio CIE 1931 permite visualizar de manera clara los cambios de color asociados a las diferentes concentraciones, lo que facilita la interpretación de los datos.

Al comparar los biosensores, se observa que, a través de las reacciones enzimáticas con el cromóforo, se aprovecha para su posterior cuantificación colorimétrica. Sin embargo, cada reacción de los diferentes biosensores es distinguibles entre sí, lo que resulta en patrones de color y relaciones cuantitativas específicas para cada analito discutido.

Esta investigación ha demostrado el potencial de los sensores colorimétricos para la detección rápida y sencilla de diferentes analitos de interés. Los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas para el desarrollo de plataformas de detección multianalítica, con aplicaciones en diversos campos, uno de los cuales es la industria alimentaria.

Anexos

Referencias

- Agoston, G. A. (1979). *Color Theory and its Application in Art and Design*. Springer-Verlag.
- Akkaya, B., Şahin, F., Demirel, G., & Tümtürk, H. (2009). Functional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.003>
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera* (4ta ed.). Editorial Reverté.
- Alaya, M. A., Tóth, Z., & Géczy, A. (2019). Applied color sensor based solution for sorting in food industry processing. *Periodica polytechnica Electrical engineering and computer science*, 63(1), 16–22. <https://doi.org/10.3311/PPee.13058>

0WAd%2BnpHayWM6mdcpKyvb%2BsEWYpX6K%2B%2F4ikyR7xbmFzg2YGXi5IBm9WOI7x
oO5Z96wZtdFpND%2F18NwGq5K5PI4z9J56EKobkveL2Kjf9M1avvvi3faY6t23Hivp169gbna6
3cAu%2FsOEWM9xcm8yfFHKuTeWjjHJvzHaDisY9J6DzNQWtCYszMKlxqZs7dNZ8HOaMIK6o
MRRj0%2Fh5tPpXJqKdb12kYyHnkR%2FefjUfFIT2iNveakwBjH%2FwmdknfYdUpoqWaD9up
%2FuF2KJkJSUHLtQ0MRn402UFvHZd6Yq5fN8qVMj2tfeGgFcx9H%2FzTgdEVpxS9UHaTo76t
vX4uxP0H6hFHfKHVURH85UJ0jYh%2FPcbQleWSAWTJwuV3ailjrEqHDp5TxHOvB7bCwGzN
n0%2Fb6C8YP4NLfwLSEJIRKiLAv3A7vUXNf6XEj%2B1Qmb5a%2Bz7q7XwSmAtrsyQILefqHm
ueSu4szgjudcbf%2BcJ9ectPYGh75HGvAjm6wo51yjwxq%2BWcy2pVifiQ%2FG8EknXsZYG6
woVn%2Baac0EEigCQHUM0aEAsXgWijnaNIrd%2B1Gs%2BTfQbPTurMzZ14CpdAR5MjQjBV
TtBlaxlnsCgCAIwflcu%2F85kDuQJFPIW5EzZtk79KcdCu0MwrWXNcNA4UwZMRgT815eHp
RDzfdajRMVijOHneqdZBaJkFWp9XaxCMwkkUrVVx9zwdnH%2B7QtixUQogs6m3WniaTz6
p%2FBfIRlyrAPGmy5kolk19u1ITXhZfCzP3bDQ1DYPSSipXJvOBEIId3%2FcxypgZxVSoATpuouE
ovEgAgCIW4HwR7131mw6Jf1Www0Rjf75RpeWc8QcyriWgoO4w%2BeCRqQY6sQEjPLyPw
VlzWpQpwRIjeXXwNY5VbmRYmPEzvQ4TfyUdeoun2TxINSa3Gj4%2FbZsMswH0uOlo%2B3
sdueN7g%2B18%2FD5%2BJjG4cjDqTmicToWMXLAHI08ZnFHvBitOtY1WC77u3dc5EjXwAa
fsKXcWEo%2FjcUhszCA%2FmKeL6HMshGuCOsjRG3eNCKkNGzx7142aXJ85s9wneWmDzP
DH42ONC4xeYwndo61HNKrk5QYKaRqxiGQtg%3D&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-
SHA256&X-Amz-Date=20231009T223649Z&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-
Expires=300&X-Amz-Credential=ASIAQ3PHCVTY4ADK4D4L%2F20231009%2Fus-east-
1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-
Signature=8fe4bc36630f991e11263e18deb0805df71ae3290119f553262b75f4ae4c5829&
hash=cb4e3e5b9438e72f4efe5b68b293daa27e5fec87bb69d7db17852a4d775c3d38&host
=68042c943591013ac2b2430a89b270f6af2c76d8dfd086a07176afe7c76c2c61&pii=S1631
06910500065X&tid=spdf-e7ef8201-3774-4f5b-9d3d-
d74be1831277&sid=5efa2f535d05234bc94a0a65703b0e2a5576gxrqa&type=client&tsoh
=d3d3LnNjaWVuY2VkaXJlY3QuY29t&ua=171e5a555603530e060c53&rr=813a1acb6ab2b6
e1&cc=mx

Bülbül, G., Hayat, A., & Andreescu, S. (2015). Portable nanoparticle-based sensors for food safety assessment. En *Sensors (Switzerland)* (Vol. 15, Número 12, pp. 30736–30758). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s151229826>

Bumrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. En *Egyptian Journal of Forensic Sciences* (Vol. 6, Número 3, pp. 209–215). Egyptian Forensic Medicine Authority. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>

Burdallo-Bautista, I. (2014). *Integración de microsensores y estructuras microfluídicas para la medida de parámetros químicos en sistemas biológicos.*

Calderon Perea, N. E. (2015). *Obtención y caracterización de nanopartículas de quitosano por el método de gelación iónica.*

- Caro-León, F. J., López-Martínez, L. M., Lizardi-Mendoza, J., Argüelles-Monal, W., Goycoolea-Valencia, F. M., Carvajal-Millán, E., & López-Franco, Y. L. (2018). *Preparation methods of chitosan nanoparticles: a review*. <http://biotecnia.unison.mx>
- Carolina Rafanhin Sousa, A., Nascimento Makara, C., Canniatti Brazaca, L., & Carrilho, E. (2021). A colorimetric microfluidic paper-based analytical device for sulfonamides in cow milk using enzymatic inhibition. *Food Chemistry*, 356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129692>
- Cazzaniga, D., Fabro, M., Giordano, G., Ramos, E., Junges, O., Trossero, V., & Porcel, P. (2013). *Nuevo estudio de la variabilidad del contenido de colesterol en productos lácteos*.
- Chacón Villalobos, A. (2006). Comparación de la titulación de la acidez de la leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agronomía Mesoamericana*, 2–4.
- Chagunda, M. G. G., Larsen, T., Bjerring, M., & Ingvarsten, K. L. (2006). L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research*, 73(4), 431–440. <https://doi.org/10.1017/S0022029906001956>
- Chaves-Chavarría, A., Vargas-Umaña, M., & Schosinsky-Nervermann, K. (1997). Evaluación de un método enzimático colorimétrico para la cuantificación de colesterol sérico. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 30–43. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29481997000100003&lng=en&tlng=es.
- Chen, M., Zeng, G., Xu, P., Lai, C., & Tang, L. (2017). How Do Enzymes ‘Meet’ Nanoparticles and Nanomaterials? En *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 42, Número 11, pp. 914–930). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.08.008>
- Chen, Y., Fu, G., Zilberman, Y., Ruan, W., Kabiri, S., Miller, E., & Sonkusale, S. (2017). *Disposable Colorimetric Geometric Barcode Sensor for Food Quality Monitoring*.
- Chrisment, A. (1997). *Color y colorimetría*.
- Clavijo, J. (2013). *Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM)*.
- Colina, M., Ayala, A., Rincón, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., Vargas, J., & Montilla, B. (2014). EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN QUÍMICA DE QUITINA Y QUITOSANO A PARTIR DE DESECHOS DE CANGEJOS. ESCALA PILOTO E INDUSTRIAL. En *Rev. Iberoam. Polim* (Vol. 15, Número 1).

- Conocimiento, E., & Kleeberg Hidalgo, F. (2007). *INTRODUCCIÓN El HACCP y la ISO 22000: Herramienta esencial para la inocuidad y calidad de los alimentos* (Vol. 25).
- del Castillo Shelly, R., & Mestres Lagarriga, J. (2013). *Productos lácteos*. EDICIONS UPC.
- Díaz-García, V., Contreras-Trigo, B., Rodríguez, C., Coelho, P., & Oyarzún, P. (2022). A Simple Yet Effective Preanalytical Strategy Enabling the Application of Aptamer-Conjugated Gold Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Antibiotic Residues in Raw Milk. *Sensors*, 22(3). <https://doi.org/10.3390/s22031281>
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. En *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 16, Número 1, pp. 101–112). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>
- Domínguez, V., Flores-Merino, M. V., Morales-Romero, J., Bedolla-Pulido, A., Mariscal-Castro, J., & Bedolla-Barajas, M. (2019). Allergy to cow's milk protein, or lactose intolerance: A cross-sectional study in university students. *Revista Alergia Mexico*, 67(4), 394–402. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i4.640>
- Dutta, P., Kumari, A., & Mahanta, M. (2022). *Chitosan Nanoparticle: Synthesis, Characterization, and Use as Plant Health Materials*. www.intechopen.com
- En Tuxtepec, C., & México Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios, O. (2015). *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2(6), 327–337. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=358640694008>
- Escobar Sierra, D. M., Ossa Orozco, C. P., Quintana Rodríguez, M. A., & Ospina Villa, W. A. (2003). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. En *Sciencia Et Technica*. <https://doi.org/https://doi.org/10.22517/23447214.7555>
- Esther Mejía Díaz, Z. (2016). *Desarrollo de un biosensor electroquímico para detectar lactato en productos lácteos*.
- Fajardo Ochoa, R., Osuna-Castro, J. A., Villavelazquez, C., & Escalante-Minakata, P. (2011). *Inmovilización de células y enzimas*. <https://www.researchgate.net/publication/220007839>
- Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L., & Zhang, G. (2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 171. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>

- Farré, M., Kantiani, L., & Barceló, D. (2012). Microfluidic Devices: Biosensors. En *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* (pp. 177–217). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00007-8>
- Fernández, E. F., Hernández, J. A. M., Suárez, V. M., Villares, J. M. M., Yurrita, L. R. C., Cabria, M. H., & Rey, F. J. M. (2015). Documento de Consenso: Importancia nutricional y metabólica de la leche. En *Nutricion Hospitalaria* (Vol. 31, Número 1, pp. 92–101). Grupo Aula Medica S.A. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.8253>
- Fernández Martínez, L. M. (2020). ELECTRODOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO Y SU APLICACIÓN EN BIOSENSORES ELECTRIQUÍMICOS QUE UTILIZAN “HORSE RADISH PEROXIDASE” COMO SISTEMA DE BIORECONOSIMIENTO BIOLÓGICO: DETECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. *infoANALÍTICA*, 102–133.
<https://doi.org/10.26807/ia.vi.179>
- Gacén, J., & Gacén, I. (1996). *Quitina y Quitosano. Nuevos Materiales Textiles*.
- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). *Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution*.
- Gao, H., Yan, C., Wu, W., & Li, J. (2020a). Application of microfluidic chip technology in food safety sensing. En *Sensors (Switzerland)* (Vol. 20, Número 6). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/s20061792>
- Gao, H., Yan, C., Wu, W., & Li, J. (2020b). Application of microfluidic chip technology in food safety sensing. En *Sensors (Switzerland)* (Vol. 20, Número 6). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/s20061792>
- Ghosh, S., Ahmad, R., & Khare, S. K. (2018). Immobilization of Cholesterol Oxidase: An Overview. *The Open Biotechnology Journal*, 12(1), 176–188.
<https://doi.org/10.2174/1874070701812010176>
- Goycoolea, F. M., Remuñán-López, C., & Alonso, M. J. (2009). *Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano*.
- Guauque Torres, M., & Liliana Gómez RESUMEN, S. (2019). *Ácido láctico: Una revisión sobre los métodos de determinación y purificación* (Vol. 14, Número 2).
- Guzmán, E. R. (2006). Mitos y Verdades del Colesterol. *Acta Universitaria*, 8–12.
- Hernández Cocolletzi, H., Águila Almanza, E., Flores Agustín, O., Viveros Nava, E., & Ramos Cassellis, E. (2009). *Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón*.

- Hernández, M., Galán, C. A., Álvarez, G. A., & Páez, M. E. (2011). Desarrollo de un biosensor amperométrico en configuración plana para la cuantificación de colesterol. *Informacion Tecnologica*, 22(6), 25–32. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600004>
- Höldrich, M., Sievers-Engler, A., & Lämmerhofer, M. (2016). Gold nanoparticle-conjugated pepsin for efficient solution-like heterogeneous biocatalysis in analytical sample preparation protocols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(20), 5415–5427. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9657-y>
- Hossain, S. M. Z., Luckham, R. E., McFadden, M. J., & Brennan, J. D. (2009). Reagentless bidirectional lateral flow bioactive paper sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. *Analytical Chemistry*, 81(21), 9055–9064. <https://doi.org/10.1021/ac901714h>
- Ignacio Domínguez Álvarez, R. (2017). *Desarrollo de un Biosensor Óptico Enzimático para la Determinación de Colesterol en Muestras*.
- Jiménez, C. C., & León P, D. E. (2008). BIOSENSORES: APLICACIONES Y PERSPECTIVAS EN EL CONTROL Y CALIDAD DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTICIOS BIOSENSORS: IMPLEMENTATION AND OUTLOOK IN THE CONTROL AND PRO-CESS QUALITY AND FOODSTUFFS. *Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica*.
- Jiménez, C. C., & León P, D. E. (2009). BIOSENSORES: APLICACIONES Y PERSPECTIVAS EN EL CONTROL Y CALIDAD DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTICIOS BIOSENSORS: IMPLEMENTATION AND OUTLOOK IN THE CONTROL AND PRO-CESS QUALITY AND FOODSTUFFS. *Vitae Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 144–154.
- Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Valinger, D., Jurina, T., Benković, M., Kljusurić, J. G., & Zelić, B. (2021). The power of microsystem technology in the food industry – Going small makes it better. En *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 68). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102613>
- Karunakaran, C., Madasamy, T., & Sethy, N. K. (2015). Enzymatic Biosensors. En *Biosensors and Bioelectronics* (p. 133204). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00003-7>
- Khanmohammadi, M., Elmizadeh, H., & Ghasemi, K. (2015). Investigation of Size and Morphology of Chitosan Nanoparticles Used in Drug Delivery System Employing Chemometric Technique. En *Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (Vol. 14, Número 3).
- Khatami, S. H., Vakili, O., Ahmadi, N., Soltani Fard, E., Mousavi, P., Khalvati, B., Maleksabet, A., Savardashtaki, A., Taheri-Anganeh, M., & Movahedpour, A. (2022). Glucose oxidase:

- Applications, sources, and recombinant production. En *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 69, Número 3, pp. 939–950). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1002/bab.2165>
- Kreit, J., & Sampson, N. S. (2009). Cholesterol oxidase: Physiological functions. En *FEBS Journal* (Vol. 276, Número 23, pp. 6844–6856). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07378.x>
- Kretchmer, N. (1972). *LACTOSE AND LACTASE*. 227(4), 70–79.
<https://doi.org/10.2307/24922892>
- Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104(12), 6017–6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>
- Laochai, T., Mooltongchun, M., & Teepoo, S. (2016). Design and Construction of Magnetic Nanoparticles Incorporated with a Chitosan and Poly (vinyl) Alcohol Cryogel and its Application for Immobilization of Horseradish Peroxidase. *Energy Procedia*, 89, 248–254.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.05.032>
- Lara, G., & Alvarado, D. (2021). *Dairy and Products Annual*.
- Lárez Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. En *Avances en Química* (Vol. 1, Número 2). www.saber.ula.ve/avancesenquimica
- Li, L., Zhang, M., & Chen, W. (2020). Gold nanoparticle-based colorimetric and electrochemical sensors for the detection of illegal food additives. En *Journal of Food and Drug Analysis* (Vol. 28, Número 4, pp. 641–653). Taiwan Food and Drug Administration.
<https://doi.org/10.38212/2224-6614.3114>
- Liu, G., Lu, M., Huang, X., Li, T., & Xu, D. (2018). Application of gold-nanoparticle colorimetric sensing to rapid food safety screening. En *Sensors (Switzerland)* (Vol. 18, Número 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s18124166>
- Liu, G., Yang, X., Li, T., Yu, H., Du, X., She, Y., Wang, J., Wang, S., Jin, F., Jin, M., Shao, H., Zheng, L., Zhang, Y., & Zhou, P. (2015). Spectrophotometric and visual detection of the herbicide atrazine by exploiting hydrogen bond-induced aggregation of melamine-modified gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, 182(11–12), 1983–1989.
<https://doi.org/10.1007/s00604-015-1531-7>
- Maclachlan, J., Wotherspoon, A. T. L., Ansell, R. O., & Brooks, C. J. W. (1999). Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 169–195. www.elsevier.com/locate/jsbmb

- Maclachlan, J., Wotherspoon, A. T. L., Ansell, R. O., & Brooks, C. J. W. (2020). *Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications*. www.elsevier.com/locate/jsbmb
- Mammarella, E. J. (2001). *Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa*.
- Marrakchi, M., Dzyadevych, S. V., Lagarde, F., Martelet, C., & Jaffrezic-Renault, N. (2008). Conductometric biosensor based on glucose oxidase and beta-galactosidase for specific lactose determination in milk. *Materials Science and Engineering C*, 28(5–6), 872–875. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.046>
- Maza Pastrana, M., Pérez Lizaur, M., Legorreta Cao, P., Moncada Jiménez, A., & Pelayo Consuegra, B. (2011). *El libro blanco de la leche y los productos lácteos* (Vol. 1). CANILEC.
- Mikušová, V., Mikuš, P., & Piozzi, A. (2021). *Molecular Sciences Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery*. <https://doi.org/10.3390/ijms2217>
- Montañez, J. L., Ramos, E. G., Alegret, S., & Delgado, R. J. (2011). Biosensor de Glucosa basado en un Biocompósito disperso de Grafito-Epoxi-Platino-Glucosa Oxidasa. *Información tecnológica*, 22(1), 29–40. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642011000100005>
- Monter Miranda, J. G., Tirado Gallegos, J. M., Zamudio Flores, P. B., Rios Velasco, C., Ornelas Paz, J. de J., Salgado Delgado, R., Espinosa Solis, V., & Hernández Centeno, F. (2016). Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.
- Morales Castaño, D. F., Cano Quintero, J. B., & Londoño Ospina, N. de J. (2019). Red inalámbrica de biosensores enzimáticos para la detección de contaminantes en aguas. *Revista Politécnica*, 15(29), 9–22. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v15n29a1>
- Moreno Aznar, L. A., Cervera Ral, P., Ortega Anta, R. M. A., Díaz Martín, J. J., Baladia, E., Basulto, J., Bel Serrat, S., Iglesia Altaba, I., López-Sobaler, A. M. A., Manera, M., Rodríguez, E. R., Santaliestra Pasías, A. M., Babio, N., & Salas-Salvadó, J. (2013). Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2039–2089. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6856>
- Nandeshwar, R., Mandal, P., & Tallur, S. (2023). Portable and Low-Cost Colorimetric Sensor for Detection of Urea in Milk Samples. *IEEE Sensors Journal*, 23(14), 16287–16292. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2023.3282810>

- Neethirajan, S., & Lin, F. (2010). *CONVERGENCE-BIG POTENTIAL: MICROFLUIDICS FOR FOOD, AGRICULTURE AND BIOSYSTEMS INDUSTRIES CSBE100304-Presented at Symposium on Nanotechnologies Applied to Biosystems Engineering and the Environment*. CIGR.
- Negri, L. M. (2005). *El pH y la acidez de la leche*.
- Nehra, M., Lettieri, M., Dilbaghi, N., Kumar, S., & Marrazza, G. (2020). Nano-biosensing platforms for detection of cow's milk allergens: An overview. En *Sensors (Switzerland)* (Vol. 20, Número 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s20010032>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Principios de bioquímica* (5a ed.). Omega.
- Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163. <https://doi.org/10.5757/asct.2017.26.6.157>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, NORMA Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. (2012).
- Ojeda, L., Zogghi, N., Noguera-Machado, N., Lucero, L., Meléndez, G., & Triana, J. (2020). *Extracción y purificación parcial de peroxidasa de rabano (Raphanus sativus)*. www.reibci.org
- Olivarez Orozco, F. G. (2011). *Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo*.
- Omidi, M., Fatehinya, A., Farahani, M., Akbari, Z., Shahmoradi, S., Yazdian, F., Tahriri, M., Moharamzadeh, K., Tayebi, L., & Vashaei, D. (2017). Characterization of biomaterials. En *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering* (pp. 97–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100961-1.00007-4>
- Osuna, Y., Sandoval, J., Saade, H., López, R. G., Martínez, J. L., Colunga, E. M., de la Cruz, G., Segura, E. P., Arévalo, F. J., Zon, M. A., Fernández, H., & Ilyina, A. (2015). Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(8). <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1385-8>
- Panadero, M. P. (2017). *Nanomateriales Híbridos Basados en Complejos de Metales de Transición Anclados Sobre óxido de Grafeno. Aplicaciones Catalíticas*.

- Parra, A., Casero, E., Vázquez, L., Pariente, F., & Lorenzo, E. (2006). Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. *Analytica Chimica Acta*, 555(2), 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.025>
- Peña García, Nuria. (2005). *Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa : aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos : memoria presentada para optar al grado de Doctor*. [Universidad Complutense], Servicio de Publicaciones.
- Piri-Gharaghie, T., Doosti, A., & Mirzaei, S. A. (2022). Fabrication and Characterization of pcDNA3.1(+) Location within Chitosan/Nanoparticles Complexes for Enhanced Gene Delivery. *Iranian Journal of Biotechnology*, 20(3), 88–100. <https://doi.org/10.30498/ijb.2022.297534.3110>
- Poghossian, A., Geissler, H., & Schöning, M. J. (2019). Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. En *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 140). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.040>
- Raba, J., & Mottola, H. A. (1995). Glucose Oxidase as an Analytical Reagent. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25(1), 1–42. <https://doi.org/10.1080/10408349508050556>
- Ramírez Ramírez, J. (2014). *ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN?* <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Ravi, S., Srividya, R., kurian, C., Srinivasan, C., & Velickovic, D. (2015). Implementation of a tunable RGB LED light source. En *IJCTA* (Vol. 8, Número 3). <https://www.researchgate.net/publication/298640877>
- Ren, X. D., Liu, Q. S., Feng, H., & Yin, X. Y. (2014). The characterization of chitosan nanoparticles by raman spectroscopy. *Applied Mechanics and Materials*, 665, 367–370. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.665.367>
- Rosyada, A., Sunarharum, W. B., & Waziroh, E. (2019). Characterization of chitosan nanoparticles as an edible coating material. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012043>
- Rozycki, S., Colombatti, F., Spotti, M., Freire Costa, F., Lazzaroni, S., & Pavón, Y. (2013). Obtención de leche entera sin colesterol mediante el uso de β -ciclodextrina. En *Pág. 32 Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes* (Vol. 394).
- Sakharov, I. Y., Bautista Ardila, G., Sakharova, I. V., Rojas, A., & Pletjuschina, O. Y. (1999). *Peroxidasa de plantas tropicales* (Vol. 28).

- Salazar-Leyva, J. A., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suárez, J. C., García-Sánchez, G., & Ezquerra-Brauer, J. M. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 129–150. www.rmiq.org
- Salazar-Leyva, J. A., Lizardi-Mendoza, J., Ramirez-Suarez, J. C., García-Sánchez, G., Ezquerra-Brauer, J. M., Valenzuela-Soto, E. M., Carvallo-Ruiz, M. G., Lugo-Sanchez, M. E., & Pacheco-Aguilar, R. (2013). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. www.rmiq.org
- Sánchez, M. A., Murray, R. S., Montero, J., Marchini, M., Iglesias, R., & Saad, G. (2020). IMPORTANCE OF MILK AND ITS POTENTIAL EFFECTS ON HUMAN HEALTH Grupo de Trabajo Alimentos de la Sociedad Argentina de Nutrición. En *Actualización en Nutrición* (Vol. 21).
- Sánchez Zamorano, L. (2009). *Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma real una enzima con elevada estabilidad*.
- Santiago Vazquez, M. E., Carrera Rodriguez, A. M., & Sainz Picos, J. L. (2007). *Manual de normas de control de calidad de leche cruda*.
- Saucedo-Plascencia, M. D., Guevara Martínez, S. J., Zamudio-Ojeda, A., & Castillo-Romero, A. (2023). Nanopartículas de quitosano: una prometedora estrategia para combatir la resistencia a antimicrobianos. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 9562–9575. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.5078
- Sharma, S. K., Kumar, A., Chaudhary, R., Pundir, S., Pundir, C. S., & Sehgal, N. (2007). Lactose biosensor based on lactase and galactose oxidase immobilized in polyvinyl formal. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 35(4), 421–430. <https://doi.org/10.1080/10731190701460309>
- Sharma, S. K., Sehgal, N., & Kumar, A. (2007). Lactase from *Clarias Gariepinus* and its Application in Development of Lactose Sensor. *Sensors & Transducers Journal*, 82, 1458–1469. <http://www.sensorsportal.com>
- Silva-Pereira, M. C., Teixeira, J. A., Pereira-Júnior, V. A., & Stefani, R. (2015). Chitosan/corn starch blend films with extract from *Brassica oleraceae* (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. *LWT*, 61(1), 258–262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.041>
- Singh, A., Mittal, A., & Benjakul, S. (2021). Chitosan nanoparticles: preparation, food applications and health benefits. *ScienceAsia*, 47(1), 1–10. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2021.020>

- Souza, C. J. F., Garcia-Rojas, E. E., & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, 83, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.044>
- Spahn, C., & Minteer, S. D. (2008). Enzyme Immobilization in Biotechnology. En *Recent Patents on Engineering* (Vol. 2).
- Suelter, C. H., & Kricka, L. J. (1992a). *Bioanalytical applications of enzymes*. Wiley.
- Suelter, C. H., & Kricka, L. J. (1992b). *Bioanalytical applications of enzymes*. Wiley.
- Suslick, K. S., Rakow, N. A., & Sen, A. (2004). Colorimetric sensor arrays for molecular recognition. *Tetrahedron*, 60(49), 11133–11138. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.09.007>
- Thangaraj, B., & Solomon, P. R. (2019). Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. En *ChemBioEng Reviews* (Vol. 6, Número 5, pp. 157–166). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/cben.201900016>
- Thiruvengadam, M., Venkidasamy, B., Selvaraj, D., Samynathan, R., & Subramanian, U. (2020). Sensitive screen-printed electrodes with the colorimetric zone for simultaneous determination of mastitis and ketosis in bovine milk samples. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111746>
- Tudela, Victoria. (1996). *El colesterol : lo bueno y lo malo*. SEP.
- Vantasin, S., Pienpinijtham, P., Wongravee, K., Thammacharoen, C., & Ekgasit, S. (2013). Naked eye colorimetric quantification of protein content in milk using starch-stabilized gold nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 177, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.104>
- Vargas Ramírez, J. A. (2016). *Desarrollo de un biosensor amperométrico para la detección de peróxido de hidrógeno utilizando electrodos serigrafados de oro modificados con peroxidasa de palma real y nanotubos de péptidos*.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Veitch, N. C., & Smith, A. T. (2000). Horseradish peroxidase. En *ADVANCES IN INORGANIC CHEMISTRY* (Vol. 14).
- Verma, M. L., Barrow, C. J., & Puri, M. (2013). Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel

- production. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 97, Número 1, pp. 23–39). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4535-9>
- Verma, M. L., Kumar, S., Das, A., Randhawa, J. S., & Chamundeeswari, M. (2020). Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. En *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 18, Número 2, pp. 315–323). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00942-5>
- Voskoboinikova, O., Sukhanov, A., & Duerkop, A. (2021). Optical ph sensing in milk: A small puzzle of indicator concentrations and the best detection method. *Chemosensors*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/chemosensors9070177>
- Vrieling, A., & Ghisla, S. (2009). Cholesterol oxidase: Biochemistry and structural features. En *FEBS Journal* (Vol. 276, Número 23, pp. 6826–6843). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07377.x>
- Warsito, M. F., & Agustiani, F. (2021). A review on factors affecting chitosan nanoparticles formation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1011(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1011/1/012027>
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. En *Nature* (Vol. 442, Número 7101, pp. 368–373). <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Wiedmann, M., Belias, A., Sullivan, G., & David, J. (2019). Manual de monitoreo ambiental para las industrias de alimentos y bebidas. En *Manual de monitoreo ambiental para las industrias de alimentos y bebidas* (1a ed., pp. 2–8).
- Wilson, R., & Turner, A. P. F. (1992). Glucose oxidase: an ideal enzyme. En *Biosensors & Bioelectronics* (Vol. 7).
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 78, Número 6, pp. 927–938). <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>
- Xia, T. T., Liu, C. Z., Hu, J. H., & Guo, C. (2016). Improved performance of immobilized laccase on amine-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles modified with polyethylenimine. *Chemical Engineering Journal*, 295, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.044>
- Xiao-wei, H., Xiao-bo, Z., Ji-yong, S., Zhi-hua, L., & Jie-wen, Z. (2018). Colorimetric sensor arrays based on chemo-responsive dyes for food odor visualization. En *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 81, pp. 90–107). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.001>

- Xu, Z., He, Z., Song, Y., Fu, X., Rommel, M., Luo, X., Hartmaier, A., Zhang, J., & Fang, F. (2018). Topic review: Application of raman spectroscopy characterization in micro/nano-machining. En *Micromachines* (Vol. 9, Número 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi9070361>
- Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.071>
- Zhou, W., Apkarian, R. P., Lin Wang, Z., & Joy, D. (2007). *Fundamentals of Scanning Electron Microscopy*.
- Ziyaina, M., Rasco, B., Coffey, T., Ünlü, G., & Sablani, S. S. (2019). Colorimetric detection of volatile organic compounds for shelf-life monitoring of milk. *Food Control*, 100, 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.018>