



Universidad Autónoma de Querétaro

*Facultad de Ingeniería
Ingeniería en nanotecnología*

INMOVILIZACIÓN DE PEROXIDASA DEL RÁBANO PICANTE SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA DETECCIÓN DE OXITETRACICLINA EN MIEL DE ABEJA.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Cítlali Araceli Rosales García

Dirigido por:

Dra. Alejandra Álvarez López



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Inmovilización de peroxidasa del rábano picante sobre
nanopartículas de plata para detección de
oxitetraciclina en miel de abeja

por

Citlali Araceli Rosales García

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGLIN-243024



Universidad Autónoma de Querétaro



*Facultad de Ingeniería
Ingeniería en nanotecnología*

INMOVILIZACIÓN DE PEROXIDASA DEL RÁBANO PICANTE SOBRE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA DETECCIÓN DE OXITETRACICLINA EN MIEL DE ABEJA.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Citlali Araceli Rosales García

Dra. Alejandra Álvarez López

Presidente

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Secretario

Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Vocal

Dra. Sandra Rivas Gándara

Suplente

Campus aeropuerto
Querétaro, Qro.
Marzo 2023

DEDICATORIA

Porque sin su apoyo este trabajo y trayectoria no hubiera sido posible...

Quiero agradecer a mis sinodales por sus valiosas aportaciones al presente trabajo, así como a mis asesores que me acompañaron durante todo el transcurso de su realización y me aportaron mucho en el aspecto académico y en mi desarrollo personal. Gracias a mis amigas y amigos de laboratorio Kendra, Mariely, Cinthia y Cristian, que ya sea con algún experimento o volviendo el rato más ameno hicieron más llevadera mi estancia en el laboratorio.

También quiero agradecer a los amigos que conocí a lo largo de la carrera, con los que pasé lindos momentos que siempre atesoraré, Irasema, Giovanni, Yessenia, Mariana, Karina, Marisol, Edgard, Fernando, David, André, Iván, Johan y Santiago, gracias por su apoyo y motivación.

A pesar de estar separadas por la distancia, su presencia siempre me acompañó y motivo para sobrellevar los problemas que se presentaban, gracias mis queridas amigas América, Ari, Viri, Lupita, Mari y Dani por mantenerse siempre presentes en mi vida.

De igual manera agradezco enormemente a las personas que aportaron sus enseñanzas y consejos en otras etapas de mi vida, su granito de arena ha ayudado a formar la persona que soy ahora.

Especialmente quiero agradecer a mi familia, porque sin ellos no estaría en donde estoy ahora; a mis abuelos que siempre me acompañaran, aunque no estén presentes; a mis tías y tíos que me aconsejan y acompañan incondicionalmente; así como a mis primas y primos. Gracias a mis hermanas y hermanos por su cariño y apoyo, a mis mascotas que, aunque no se den cuenta me motivan a seguir adelante y muchas gracias a mi papá y mamá, todo su esfuerzo y sacrificio han formado a la profesionalista que espero pueda enorgullecerlos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	7
1.1 Planteamiento del problema	8
1.2 Hipótesis	10
1.3 Justificación	10
1.4 Objetivo	11
1.4.1 Objetivos específicos	11
MARCO TEÓRICO	12
2.1 Producción de miel	13
2.2 Características de la miel	14
2.3 Enfermedades en las abejas	14
2.3.1 Loque americana.....	15
2.3.2 Loque europea	16
2.3.3 Control de enfermedades.....	16
2.4 Oxitetraciclina.....	17
2.5 Peroxidasa del rábano picante (HPR)	18
2.5.1 Síntesis y purificación.....	20
2.5.2 Estabilidad enzimática	22
2.6 Inmovilización enzimática	22
2.6.1 Adsorción.....	24
2.6.2 Unión covalente	25
2.6.3 Atrapamiento	26
2.6.4 Reticulación	28
2.6.5 Inmovilización por afinidad.....	29
2.7 Materiales de soporte.....	29
2.7.1 Polímeros	30
2.7.2 Hidrogeles.....	31
2.7.3 Soportes inorgánicos.....	31
2.8 Biosensores	31
2.8.1 Bioreceptores	32
2.8.2 Transductores.....	34

2.8.3 Aplicaciones	36
2.9 Nanomateriales	39
2.9.1 Nanomateriales de carbono.....	39
2.9.2 Nanomateriales metálicos	40
2.9.3 Nanomateriales de óxidos metálicos	40
2.9.4 Hidróxidos metálicos	41
2.9.5 Otros nanomateriales	41
2.10 Ventajas de los nanomateriales como matrices de inmovilización	41
2.10.1 Nanopartículas	42
2.11 Propiedades de la plata	43
ANTECEDENTES.....	45
3.1 Métodos de detección	45
3.1.1 Microbiológico	45
3.1.2 Cromatografía de alta resolución	45
3.1.3 Cromatografía líquida con espectrometría de masas	46
3.1.4 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Elisa)	46
3.1.5 Sonda fluorescente.....	46
3.1.6 Electroforesis capilar (EC)	46
3.2 Límites de cuantificación.....	47
3.3 Función de las nanopartículas en sensores electroquímicos	48
3.4 Nanopartículas de plata.....	49
3.4.1 Síntesis de nanopartículas	50
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
4.1 Síntesis de nanopartículas de plata.	52
4.2 Ensayo de actividad enzimática.....	52
4.3 Inmovilización de peroxidasa en nanopartículas de plata y fabricación de electrodos.	55
4.4 Caracterización de electrodos.	56
4.4.1 Prueba de acoplamiento	56
4.4.2 Electroquímica	57
4.5 Ensayo de actividad enzimática.....	57
4.6 Optimización de H ₂ O ₂	58
4.7 Detección de oxitetraciclina en Buffer fosfato	58
4.8 Estabilidad y Reúso	60

4.9 Actividad con la reutilización del electrodo	60
4.10 Prueba de interferentes	60
4.11 Detección de oxitetraciclina en solución de miel de abeja.	61
RESULTADOS	63
4.1 Cálculo eficiencia de la síntesis de nanopartículas.	63
4.2 Caracterización de nanopartículas de plata.....	63
4.3 Pruebas de actividad enzimática	65
4.3.1 Efecto del pH.....	65
4.3.2 Efecto de la temperatura	66
4.4 Prueba de acoplamiento	67
4.5 Caracterización del electrodo	68
4.9 Ciclos de reúso.....	70
4.9.1 Prueba bioquímica	70
4.7.1 Pruebas electroquímicas	71
4.6 Optimización de H ₂ O ₂	72
4.7 Detección de oxitetraciclina en Buffer fosfato.....	73
4.8 Estabilidad	76
4.10 Prueba de Interferentes	78
4.11 Detección de oxitetraciclina en solución de miel de abeja	79
CONCLUSIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	83
APÉNDICE	94
A.1 MÉTODOS EMPLEADOS.....	94
A.1.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	94
A.1.1 Uv-vis (luz ultravioleta-visible).....	94
A.1.3 Voltametría	95
A.2 Ecuaciones ensayo enzimático.....	96
A.3 AGRADECIMIENTOS	97
A.4 LOGROS DEL PROYECTO.....	97

INTRODUCCIÓN

Comúnmente se le atribuye a la miel ser un alimento saludable y natural, por lo que algunos países tienen normas estrictas relacionadas a la presencia de agentes externos que puedan afectar la calidad de este producto y, por ende, la salud de los consumidores. La unión europea cuenta con los más altos estándares de seguridad alimentaria en el mundo, los cuales prohíben el uso de antibióticos para el tratamiento de abejas. Por el contrario, en otros países se autoriza el uso de algunos antibióticos como tetraciclinas, sulfonamidas, estreptomicina y cloranfenicol para el control de enfermedades (González et al., 2011).

Dentro del subsector pecuario en México, la apicultura es una actividad relevante por la cantidad de empleos que genera y, en consecuencia, el ingreso económico que provee (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016). México es también un gran exportador a nivel mundial, en los últimos 10 años se ha posicionado en los primeros 10 lugares de exportadores, siendo Alemania y el Reino Unido de Gran Bretaña los principales clientes (Secretaría rural, 2019).

A pesar de que las regulaciones sanitarias nacionales para la comercialización de este producto no son altamente estrictas, para la exportación se deben cumplir los requisitos exigidos por el mercado internacional, que dependiendo del país pueden ser más estrictos. El *CODEX ALIMENTARIUS* opera a nivel mundial a través de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS); sus normas establecen que el límite máximo permisivo de residuos (LMR) en la miel es 0, lo que significa que para su comercialización no se debe contener ningún ingrediente alimentario, o agregado, que no corresponda a la propia composición de la miel (Codex Alimentarius Commission, 1981). La contaminación en el producto final podría darse por un mal manejo en el sector primario durante el proceso de cosecha y extracción, o por el uso de antibióticos y acaricidas para el control de plagas y enfermedades en las colmenas (González et al., 2011).

Para salvaguardar la salud de la población mexicana en el país se cuenta con una norma específica, la NMXF-036-2006-NORMEX, y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA); éste último establece anualmente un programa de control y monitoreo de residuos tóxicos para supervisar el cumplimiento de las normas de sanidad y buenas prácticas con el fin de corregir y/o prevenir la presencia de contaminantes.

La oxitetraciclina es un antibiótico con un amplio espectro eficaz en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, comúnmente es usado para prevenir y combatir la loque americana y la loque europea ya que actúa efectivamente contra la forma vegetativa de la bacteria. La forma de utilizar oxitetraciclina para este propósito es disolverlo en jarabe de azúcar frío o mezclarlo con azúcar pulverizada y depositar la mezcla en un alimentador al interior de la colmena (SAGARPA, 2021b).

La desventaja usar antibióticos para combatir enfermedades es la presencia de concentraciones residuales en los productos apícolas; los residuos generalmente se encuentran durante la primera semana después de su exposición al antibiótico. A pesar de que estos niveles de residuos disminuyen por la degradación del fármaco, no siempre son metabolizados por las abejas y se pueden encontrar trazas hasta un año posterior a su aplicación. Estos contaminantes resultan difíciles de detectar al requerir la combinación de dos o más métodos analíticos bastante sofisticados para cantidades tan pequeñas que pueden llegar a las partes por billón (Reybroeck, 2018).

Los diferentes métodos analíticos actuales han resultado efectivos al realizar las pruebas necesarias en alimentos; dichas pruebas incluyen: técnicas biológicas, cromatografía, espectrometría, electroforesis, entre otras. Sin embargo, todos presentan desventajas que complican la obtención de análisis adecuados, como límites de detección no tan bajos e interferencias por la falta de especificidad.

Otro problema se presenta en el largo y costoso procedimiento de análisis que requiere personal especializado en el procedimiento y equipos analíticos específicos (con su respectivo mantenimiento). Ya que, al ser la miel una matriz compleja, regularmente debe llevarse a cabo el análisis en al menos dos etapas: una para extraer el analito de la matriz y otra para la cuantificación. Ejemplo de esto es la combinación de distintos tipos de cromatografías con espectrometría de masas, sonda fluorescente o electroforesis.

En el presente trabajo, se plantea el uso de un electrodo modificado con enzima peroxidasa del rábano picante (HRP) y nanopartículas de plata (Ag NPs) como alternativa de cuantificación. Un biosensor es una herramienta de detección biomolecular con características únicas, cuyas ventajas consisten en su simplicidad, bajo costo relativo, respuesta rápida, practicidad de tamaño y monitoreo continuo. Se compone de un bioreceptor el cual es un elemento biológico inmovilizado (enzima, ADN, anticuerpo, etc.) que reconoce el analito, y un transductor que convierte la señal bioquímica (interacción del bioreceptor con el analito) en una señal electrónica (Sassolas et al., 2012). Los biosensores basados en el uso de enzimas como bioreceptores presentan ventajas de detección y sensibilidad frente a otros; con un control adecuado del ambiente de detección es posible la detección de diferentes analitos.

1.1 Planteamiento del problema

La oxitetraciclina (OTC) es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas que ha sido usado frecuentemente para tratar y prevenir la Loque americana y europea, enfermedades bacterianas altamente contagiosas que afectan seriamente las colmenas de las abejas productoras de miel (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016).

Sin embargo, con el uso de antibióticos se suelen presentar concentraciones residuales en varios productos apícolas, como la jalea real, propóleo, polen e incluso miel, que generalmente se encuentran durante la semana después de su exposición. En el caso de la oxitetraciclina estos niveles de residuos disminuyen por la degradación del fármaco, pero no siempre es metabolizado por las abejas, por lo que aún se pueden detectar residuos hasta un año posterior a la aplicación (Reybroeck, 2018). Estos

residuos son difíciles de detectar, ya que se requieren métodos analíticos bastante sofisticados para cantidades tan pequeñas que pueden ser del orden de partes por billón (ppb) o partes por millón (ppm) (González et al., 2011).

Se ha encontrado que la presencia de tetraciclinas en alimentos puede tener efectos nocivos en los consumidores, como posibles reacciones alérgicas a personas hipersensibles, daño hepático, coloración amarillenta de los dientes, alteraciones gastrointestinales debido a la presión selectiva de los antibióticos sobre la microflora del intestino humano (Shaif Mohammed Kasem Saleh et al., 2016); cambios en la composición de la sangre con la exposición crónica, manifestando toxicidad aguda por hepatotoxicidad (Boonsaner & Hawker, 2013); además, al igual que otras tetraciclinas, puede provocar reacciones fototóxicas en la piel relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). (Rok et al., 2018) Otros estudios han investigado la toxicidad potencial de la OTC como efectos teratogénicos durante el embarazo y efectos inflamatorios en humanos (Gallo et al., 2017).

La demanda de productos actual está orientada a aquellos que no dañen la salud de los consumidores, la miel es considerada como un alimento natural que no puede estar exento de esta exigencia. Por ello, la unión europea ha recomendado cero tolerancias a residuos de oxitetraciclina en la miel. Pese a ello, algunos países tienen establecidos límites permitidos para este medicamento; algunos de ellos se presentan en la **tabla 1.1** (Shaif Mohammed Kasem Saleh et al., 2016).

Tabla 1.1

Límites máximos permisivos de residuos en diferentes países

País	Límite máximo permitido
Bélgica	20 µg/kg
Francia	15 µg/kg
Gran Bretaña	50 µg/kg
Suiza	20 µg/kg
Japón	0.1 mg/kg
Australia/India/EUA/USFDA	300 ppb

Nota. Fuente: Shaif Mohammed Kasem Saleh et al., 2016

En la actualidad existen métodos para la cuantificación de oxitetraciclina, como los microbiológicos, ensayos con inmunoabsorbentes ligados a una enzima (método ELISA), sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entre otros. Sin embargo, muchos de ellos conllevan largos periodos de tiempo para su realización, generación de reacciones cruzadas, técnicas costosas y complejas o resultados con falsos positivos; el uso de mediciones electroquímicas ha sido poco reportado, al igual que el uso de sensores electroquímicos.

1.2 Hipótesis

El uso de la enzima peroxidasa del rábano picante inmovilizada sobre nanopartículas de plata podrá llevar a cabo una reacción de oxidación del grupo funcional fenólico, perteneciente a la oxitetraciclina; mediante un electrodo modificado con estos elementos se permitirá la detección de oxitetraciclina en miel de abeja.

1.3 Justificación

Considerando los posibles efectos negativos en la salud de los consumidores dada la presencia de oxitetraciclina en miel y las desventajas que presentan los métodos actuales para su detección, el desarrollo de un electrodo para cuantificación del antibiótico, que brinde alta especificidad, repetitividad y fácil manejo, le brindaría a los productores, empresas e instituciones gubernamentales una herramienta de control en la calidad de este producto en un menor tiempo de análisis.

La peroxidasa de rábano picante (HRP) es una enzima hemo que cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustratos (Kang et al., 2012). Se han reportado biosensores basados en la actividad de la peroxidasa del rábano picante para determinación de compuestos fenólicos, ya que los fenoles pueden actuar como donantes de electrones para la peroxidasa (Zdarta et al., 2018).

Para el desarrollo de los electrodos, es recomendable: mejorar el microambiente alrededor de la enzima, proporcionar una orientación adecuada y acelerar la transferencia de electrones entre la enzima y la superficie del electrodo (Kang et al., 2012). Esto puede lograrse mediante la inmovilización enzimática del sistema, permitiendo repetitividad del proceso, mejora de la estabilidad, y control de la reacción al confinar la enzima en una matriz o soporte (Nguyen & Kim, 2017).

Para ello, los materiales nanoestructurados se han identificado como matrices de inmovilización deseables por sus estructuras regulares, buena estabilidad mecánica, térmica y química; entre este tipo de materiales, las nanopartículas de plata poseen ventajas como su alta conductividad y área superficial que permiten mayor rendimiento de inmovilización a comparación de otros soportes (Kang et al., 2012).

Buscando lograr electrodos eficaces, el método electroquímico del presente trabajo, tal como se ilustra en la **figura 1.1**, se basa en la molécula de oxitetraciclina que tiene un hidroxilo fenólico que se puede oxidar en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2); dicha oxidación está linealmente relacionada con la concentración del fármaco presente en la solución (Yang et al., 2006).

La enzima peroxidasa actúa como electrocatalizador que se activa inicialmente por el H_2O_2 presente en la solución de analito (al oxidar el borde de la enzima), posteriormente, la enzima activada puede fácilmente oxidar a la oxitetraciclina; después de este paso, la enzima reducida se volverá a oxidar en la superficie del electrodo provocando un pico de corriente oxidativo; esto sucederá siempre y cuando la concentración de H_2O_2 no sea limitante (Ghodsi et al., 2016).

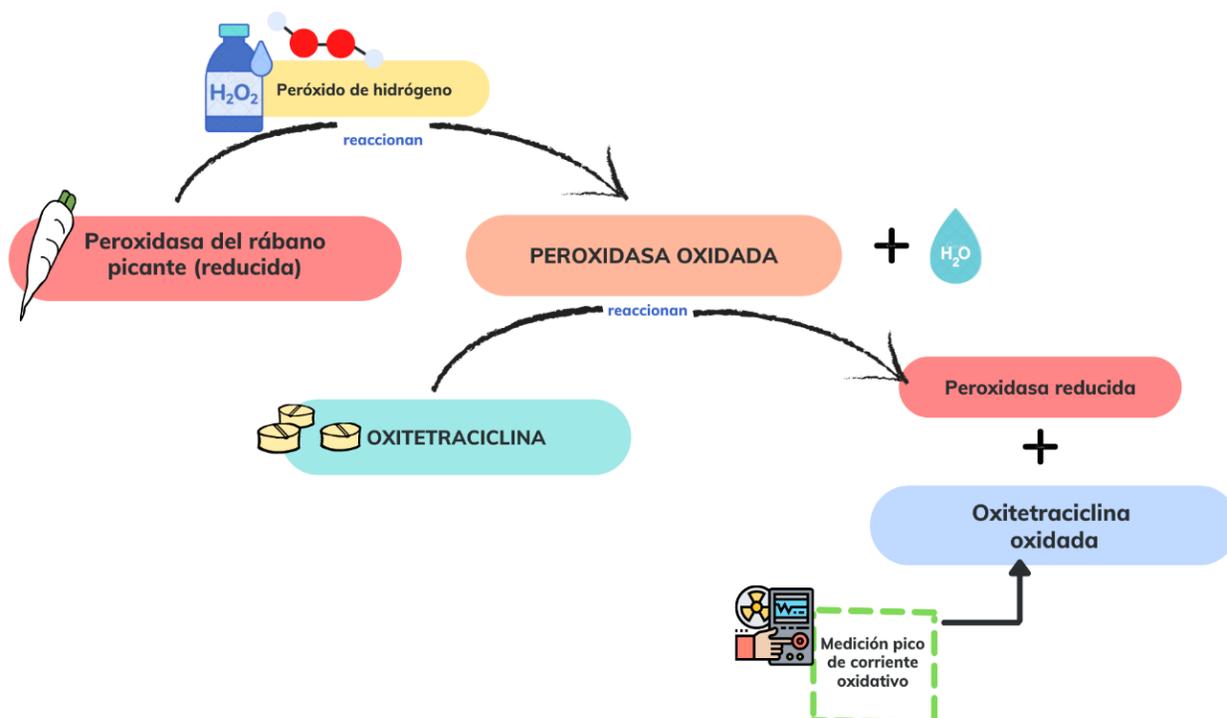


Figura 1.1: Proceso electroquímico para la cuantificación de oxitetraciclina.

El pico de corriente que resulte de esta reacción puede ser analizado por medio de Voltamperometría para obtener la dependencia de corriente de oxidación respecto a la concentración de OTC de la muestra y con ello lograr su cuantificación basándonos en la linealidad de esta dependencia (Yang et al., 2006).

1.4 Objetivo

Desarrollar un electrodo inmovilizando la enzima peroxidasa del rábano picante sobre nanopartículas de plata para cuantificación de oxitetraciclina en muestras de miel.

1.4.1 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de plata mediante método químico y caracterizarlas mediante métodos fisicoquímicos.
- Inmovilizar la enzima peroxidasa del rábano picante sobre nanopartículas de plata para construcción de electrodo enzimático.
- Caracterizar mediante pruebas bioquímicas el electrodo desarrollado.
- Realizar la caracterización electroquímica.
- Evaluar el electrodo para detección de oxitetraciclina en soluciones sintéticas y soluciones de miel.

MARCO TEÓRICO

Las abejas son insectos voladores que se organizan en rangos sociales (abeja reina, zánganos y abejas obreras) y viven en colmenas, también llamadas panales. En el mundo existen más de 20 mil especies, siendo la *Apis melífera* la más usada para la producción apícola (SIAP, 2021).

La apicultura se ha realizado en México desde la época precolonial; la primera especie de abejas fueron las *Meliponas*, especie nativa de México de vital importancia en la polinización de plantas de interés como el café, el chile, variedades de granos, semillas y frutos (Secretaría rural, 2020). A mediados del siglo XVI se introdujo la especie *Apis melífera* que, como se mencionó antes, es la más usada en la actualidad; desde entonces se ha extendido en todo el territorio mexicano, fomentando esta actividad en la cultura mexicana (**Fig. 2.1**) (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016).



Fig. 2.1: Actividad apícola en México.

Representa además un proceso fundamental para la supervivencia de los ecosistemas. Estos insectos basan su alimentación en el néctar y polen de las plantas, actuando como importantes agentes polinizadores de más del 75 % de las especies vegetales, contribuyendo con ello a la conservación, restauración del ambiente, producción agrícola y conservación de la biodiversidad (Secretaría rural, 2020).

Económicamente, la fabricación y distribución de miel es una actividad fundamental. En nuestro país existen 2 millones de colonias de abejas que son propiedad de aproximadamente 43,000 apicultores, de los que aproximadamente el 70 % son pequeños productores, y la venta de miel y cera representa una parte importante de sus ingresos. Se estima que el 60 %

de las colonias que existen en México son propiedad de apicultores independientes, quienes tienen un bajo grado de tecnificación y manejan 40 colmenas en promedio; el resto de las colonias son propiedad de unidades de producción apícola de diversos tamaños y grados de tecnificación (Arechavaleta-Velasco et al., 2021).

Desafortunadamente el consumo de miel en México es de apenas 207 g per cápita anual, por lo que para ser una actividad rentable se requiere la exportación de los productos apícolas. Jalisco, Yucatán, Chiapas, Campeche, Veracruz y Oaxaca son los mayores exportadores del país.

Históricamente, la producción de miel de nuestro país goza de gran aceptación mundial por su aroma, sabor, calidad y precio competitivo, participando con el 6.3% de las exportaciones mundiales. En el año 2020 se produjeron 54,165 ton de miel en el país, de las cuales se exportaron 27,725; colocándonos en el 10° lugar de producción en el ranking mundial, las exportaciones mexicanas del mismo año llegaron a 33 países, el mayor número de la historia hasta ahora. Alemania, nación que se caracteriza por condicionar su compra bajo altos estándares de calidad, es el cliente más importante de este servicio con la compra de 12,689 toneladas durante el 2021. Otros clientes de alta demanda son: Estados Unidos, Reino Unido, Arabia Saudita, Suiza, Bélgica, España, Japón, Países Bajos, Francia y Colombia (SIAP, 2021).

2.1 Producción de miel

El proceso de producción se divide en tres etapas: precosecha, cosecha y postcosecha. La precosecha inicia con la ubicación del apiario, en donde se llevará a cabo el ciclo de recolección de las abejas. Éste inicia con la floración de las plantas, después el néctar de las flores es recogido por las abejas pecoreadoras y ellas pasan dicho néctar a las abejas receptoras que se encuentran en el panal. En el interior de las abejas receptoras ocurre la primera transformación del néctar (desdoblamiento del azúcar), para posteriormente ser depositado y transferido entre celdas. Con la ayuda del batido de sus alas, se reduce la humedad hasta formar miel madura, y por último las abejas cubren con cera la celda llena de miel (operculado) (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016).

Cuando el 90% de las celdas es cubierta, se considera que la miel está madura. Es aquí cuando el apicultor inicia la cosecha al recolecta las alzas con los bastidores llenos de miel para después depositarlo en máquinas centrifugadoras que separan la miel de la cera (extracción) y finalmente envasar para su comercialización (SIAP, 2021).

Durante todo este proceso el uso de agroquímicos es altamente regulado por las normatividades mexicanas e internacionales; ya que la miel es un producto que se consume prácticamente directa de los apiarios sin modificaciones adicionales. Por ello, si se llegara a contaminar en el proceso, los tóxicos serían transferidos casi directamente a los consumidores.

Cuando las colmenas son colocadas dentro o cerca de una parcela de cultivo, los agroquímicos utilizados deben tener bajo efecto residual en las abejas y su aplicación debe hacerse en las últimas horas de día, cuando las abejas han terminado el pecoreo. Las colmenas

deben ser protegidas de la contaminación, resguardándolas con mantas limpias y húmedas antes de la aplicación, esto reduce la contaminación por contacto directo, sin embargo, muchos agroquímicos aplicados pueden ser transmitidos al néctar (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016).

2.2 Características de la miel

La miel es una sustancia que se compone principalmente de azúcares simples (predominantemente fructuosa y glucosa), ácidos orgánicos, agua, enzimas, aminoácidos, minerales, pigmentos, cera, polen y otras partículas derivadas de su recolección (Codex Alimentarius Commission, 1981).

Su calidad varía de acuerdo al origen geográfico y los procesos de recolección, manipulación y almacenado. Las características sensoriales (olor, sabor, color, textura) son dependientes del origen floral y maduración. La consistencia puede ser líquida, cremosa o sólida, puede estar parcial o totalmente cristalizada dependiendo de su envejecimiento. El color varía entre blanco, ámbar y oscura, el oscurecimiento ocurre por la exposición a altas temperaturas y envejecimiento (SAGARPA, 2018).

Para su evaluación se toman en cuenta sus características sensoriales y fisicoquímicas, las cuales están ampliamente relacionadas entre sí en cuanto a sabor y textura, las principales son: contenido de azúcares, humedad, pH, viscosidad y componentes como vitaminas, minerales, polifenoles y flavonoides.

El pH influye en la textura, estabilidad y vida útil de la miel, y suele ser de carácter ácido que varía entre 3.6 a 4.6 unidades. La viscosidad va de 6.65 a 0.19 Pa a 25°C, pero, al incrementar la temperatura disminuye la viscosidad de la miel alcanzando su límite de disminución a 40°C. El contenido de humedad también afecta la viscosidad, cristalización, color, sabor, solubilidad y conservación; el valor normal se encuentra entre 19 y 20% en miel de *Apis mellifera* (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016).

El *Codex alimentario* establece valores normativos de las características en miel, entre ellos, el límite de conductividad eléctrica en mieles maduras tiene un máximo general de 0.8 mS/cm; la acidez libre no debe ser de más de 50 miliequivalentes de ácido por kg de miel; y, en cuanto a azúcares reductores se establece un mínimo del 65%. Los valores establecidos se deben a que la variación de este contenido representa adulteraciones en el producto, al tipo de alimentación de la colmena, o a una cosecha prematura.

2.3 Enfermedades en las abejas

Los fenómenos meteorológicos, el uso de agroquímicos en cultivos cercanos a los apiarios y las enfermedades son algunos de los múltiples problemas sanitarios que afectan las colmenas de abejas productoras de miel y que representan importantes pérdidas parciales o totales. Las enfermedades y parásitos más comúnmente presentadas en las abejas del sureste de México son: varroasis, escarabajo de colmena, loque americana, loque europea, nosemosis y la cría de la cal.

Para solucionar dichos problemas es común el uso de antibióticos y plaguicidas que, a pesar de ser de uso legal en el territorio mexicano, pueden generar problemas al ser aplicados de forma indiscriminada o al contaminar indirectamente la miel, polen y cera en los apiarios (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016).

2.3.1 Loque americana

Es la segunda enfermedad de las abejas con más pérdidas económicas en el mundo ya que es infecciosa y altamente contagiosa, afecta a las larvas de las abejas melíferas (SAGARPA, 2021a). Es causada por una bacteria gram positiva flagelada llamada *Paenibacillus larvae*, cuya principal característica es que se presenta en dos formas de vida: 1) vegetativa, cumpliendo un ciclo de crecimiento y multiplicación y 2) esporas, las cuales son tan resistentes que pueden permanecer en el ambiente por más de 40 años y sobrevivir altas temperaturas (de Groot et al., 2018).

Puede presentarse todo el año y de no ser controladas pueden afectar más de 100 crías por panal hasta llegar a la muerte de la colonia. Las abejas adultas no son afectadas por esta enfermedad, las más susceptibles son las larvas durante las primeras 36 horas después de la eclosión del huevo (Genersch et al., 2010).



Figura 2.2: Larvas infectadas con loque americana. Fuente: Sanidad Apícola INTA.

La infección (**Fig. 2.2**) se produce cuando el alimento proporcionado por las nodrizas se encuentra contaminado con esporas y es consumido por las larvas. Las esporas germinan en el intestino de las larvas, debido a las óptimas condiciones de pH y falta de oxígeno, dando lugar a la forma vegetativa de la bacteria. Las células vegetativas atraviesan la membrana peritrófica e infectan la hemolinfa, multiplicándose así activamente hasta que la larva muere por septicemia. Finalmente, los cadáveres son digeridos por las células bacterianas vegetativas que esporulan y transforman las larvas en escamas que contienen millones de esporas de *P. larvae* (Pellegrini et al., 2017).

Los elementos a tener en cuenta para detectar la loque americana en colmenas son: 1) un patrón de cría irregular; 2) celdas oscuras y hundidas en el centro, en algunos casos de aspecto grasoso; 3) Presencia de agujeros, ya que las Abejas adultas rompen el opérculo al detectar incidencias; 4) Larvas con color amarillento o marrón oscuro, con consistencia viscosa y elástica.

Es una enfermedad altamente contagiosa, ya que, al intentar limpiar las celdas, las Abejas contaminan sus cuerpos de esporas que luego esparcen en la colmena. Al debilitarse la colonia infectada, puede ser atacada por una más fuerte y transmitir la bacteria a apiarios cercanos (de Groot et al., 2018). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) considera que la enfermedad es de importancia socioeconómica en el comercio internacional de abejas y productos apícolas, al estar presente en todo el mundo excepto la región central de África (Arribillaga, 2021).

2.3.2 Loque europea

Después de la Loque americana, es la segunda enfermedad más importante de la cría: a pesar de causar daños menores comparado a la primera sigue siendo bastante perjudicial. Se presenta comúnmente en los cambios estacionales, principalmente en primavera o principios de verano. Normalmente las colonias no presentan síntomas en una temporada si no hasta la siguiente (González et al., 2011).

Se ha reportado en casi todos los países donde existe apicultura y es causada por un complejo número de bacterias entre las cuales se ha identificado principalmente a la bacteria grampositiva *Melissococcus plutonius* y a invasores secundarios *Achromobacter eurydice*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus dendritiformis*. También puede transmitirse a larvas criadas artificialmente mediante el uso de una dieta larvaria inoculada con células de *M. plutonius* (Lewkowski & Erler, 2019).



Figura 2.3: Larvas infectadas con loque europea. Fuente: FAO 2015.

Las larvas enfermas generalmente no alcanzan o completan la etapa de pupación (**Fig. 2.3**) y se caracterizan por un cambio de color, de blanco a negro grisáceo, pasando por amarillo, naranja y marrón; acompañado de un olor fétido o agrio (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016).

2.3.3 Control de enfermedades

Aun aplicando las medidas preventivas recomendadas en los manuales oficiales, las

colonias pueden quedar infectadas por ambos tipos de loques (dependiendo la región y temporada). En caso de ocurrir, se debe llevar a cabo rápidamente un tratamiento para frenarlo y aislar los colmenares necesarios.

En México, los medicamentos veterinarios legales pueden usarse de acuerdo a los protocolos registrados ante las autoridades correspondientes. Para ello deben declararse ante la Secretaría, organismo de certificación aprobado o por el departamento competente, llevando un registro de los fármacos empleados, método de administración y la duración del tratamiento (SAGARPA, 2018).

Internacionalmente, la legislación actual de la mayoría de la unión europea ha prohibido el uso de antibióticos para tratar la loque americana, ya que tienen el potencial de dejar residuos en los productos apícolas. Sin embargo, en Estados Unidos y otros países se ha autorizado el uso de antibióticos de la clase de las tetraciclinas, que incluyen tetraciclina y clorhidrato de oxitetraciclina. Entre todos los antibióticos la oxitetraciclina es el más utilizado para el tratamiento de esta enfermedad (Arribillaga, 2021).

Los problemas más comunes asociados con el uso de antibióticos, además de los residuos que presentan un riesgo para la salud humana, incluyen su ineficacia contra las esporas infecciosas, incremento en la tasa de resistencia de varias cepas de *P. larvae*, efectos adversos sobre la vitalidad de la cría y la disminución de longevidad de las Abejas (Ansari et al., 2016).

2.4 Oxitetraciclina

Las tetraciclinas, son un grupo de poliacétidos aromáticos naturales producidos por bacterias del suelo (Wang et al., 2013); se han usado desde los 40's, siendo la primera clase importante de agentes farmacéuticos en obtener la distinción de "antibióticos de amplio espectro" (Petković et al., 2017).

Su espectro es eficaz en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, algunos protozoos (*Plasmodium* y *Entameba*), *Rickettsiae*, *Ehrlichiae*, clamidia, espiroquetas, micoplasmas y bacterias en forma de L (Papich, 2016). Su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad ribosómica 30S e interferir en la síntesis de proteínas. Es bacteriostático a concentraciones terapéuticas habituales pero bactericida a concentraciones superiores y es más activa a un pH ácido (Davis, 2018).

La oxitetraciclina (también llamada terramicina) fue uno de los primeros miembros de este grupo, descubierto por Alexander Finlay (en Pfizer, EUA) a principios de la década de 1950 y aislada por Terre Haute. Es producida por la especie *Streptomyces rimosus* y con la comprensión más profunda de su biosíntesis se ha buscado mejorar el proceso desde entonces (Petković et al., 2017).

Todas las tetraciclinas se caracterizan por una única amida funcional C2 y una estructura tetracíclica linealmente fusionada. Incluye grupos hidroxilo en C10 y C12a que son importantes para la interacción con la subunidad ribosómica 30 S. Como se puede observar en la **figura 2.4**, posee 4 anillos de los cuales en el cuarto tiene un grupo fenólico (Pickens & Tang, 2010).

Su peso molecular es de 460.4 g/mol, visualmente consiste en un polvo cristalino de color amarillo claro y tiene un pKa de 3.27 a 25°C (National Center for Biotechnology Information, 2021).

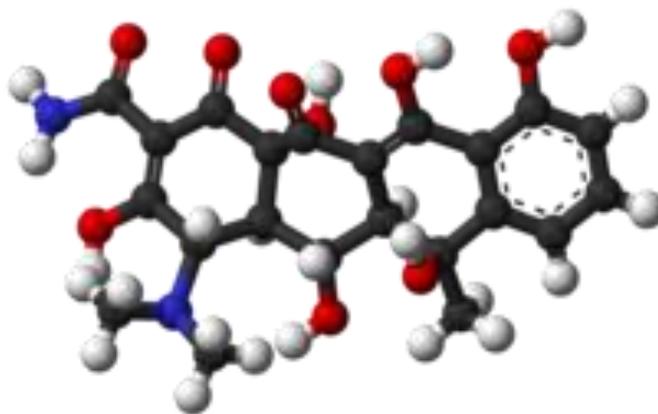


Figura 2.4: Estructura química de la oxitetraciclina.

Al actuar efectivamente contra la forma vegetativa de la bacteria han sido ampliamente utilizadas como bactericidas, específicamente por apicultores, para el control de cepas de la bacteria causal de la Loque americana (SAGARPA, 2021a).

En la actualidad, la OTC es el único antimicrobiano aprobado para el tratamiento contra la loque europea en Canadá y se aplica a colmenas individuales en una concentración de 200 mg por 20 g de azúcar glas, en tres dosis consecutivas, cada 4 o 5 días (Masood et al., 2022).

La forma de utilizar oxitetraciclina para este propósito es disolver el medicamento en jarabe de azúcar frío o mezclarlo con azúcar pulverizada. Esta mezcla se deposita en el interior de la colmena en un alimentador, lata, bote o bolsa de plástico perforados (SAGARPA, 2021a).

2.5 Peroxidasa del rábano picante (HRP)

Las peroxidasas son un tipo de enzimas oxidorreductasas, encontradas en casi todos los organismos anaeróbicos. Ayudan a la prevención del daño oxidativo celular causado por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y sus productos de descomposición altamente reactivos.

La HRP ha aparecido en la literatura desde hace más de 200 años, siendo bastante utilizada en un gran número de aplicaciones hasta la actualidad. Se obtiene de la raíz del rábano y debido a su común uso comercial se produce y comercializa a gran escala. Una aplicación bastante común es su uso como componente de kits de diagnóstico e inmunoensayos (Veitch, 2004).

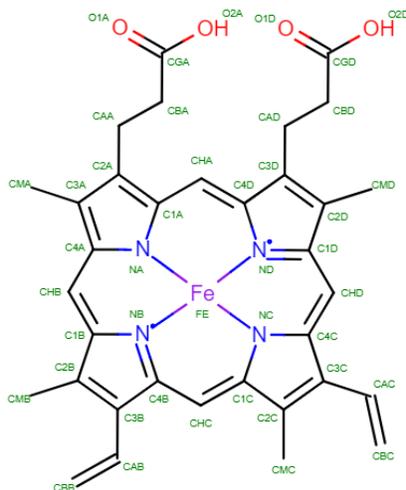


Figura 2.5: Estructura del grupo hemo en la enzima peroxidasa del rábano picante. Fuente: Chemistry LibreTexts, 2020.

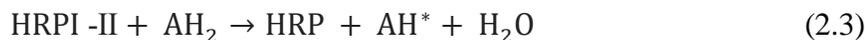
Existen una gran cantidad de isoenzimas de la HPR, pero la más común y más estudiada es la de tipo C, cuya estructura 2D se muestra en la **figura 2.5**. Esta isoenzima tiene un centro metálico del grupo hemo, el átomo de hierro se ubica en el medio de un anillo de porfirina (compuesto de dos moléculas de pirrol) y otro centro metálico con dos átomos de calcio.

El grupo hemo tiene una enzima (histidina) unida al residuo de histidina proximal. El segundo residuo de histidina está vacío en estado de reposo; este sitio se encuentra abierto para que un átomo de oxígeno del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se adhiera durante las reacciones redox. Durante la reacción se crea una configuración octaédrica alrededor del átomo de hierro (Chemistry LibreTexts, 2020).

Tradicionalmente se ha usado a la HRP como enzima informadora, en tinciones histoquímicas y ensayos microbiológicos de diagnóstico. Su actividad puede manifestarse con la formación de un producto cromogénico o fluorogénico, o mediante una señal electroquímica dada su naturaleza redox de catalización. Este tipo de enzimas catalizan reacciones oxidativas en las que se transfieren electrones a especies de peróxido y se oxida el sustrato (Krainer & Glieder, 2015).

El mecanismo de la HRP es el más utilizado y mejor descrito entre las proteínas de esta clase, considerándose como modelo de reacción. El ciclo catalítico (Guzik et al., 2014) se da en 3 pasos: 1) interacción entre el estado de reposo del Hierro(III) de la enzima y el H_2O_2 (se libera una molécula de agua con la oxidación simultánea de 2 electrones del hierro hemo al compuesto I); 2) dos transferencias de un solo electrón (conversión del compuesto I al estado de reposo de la enzima): la primer reducción requiere la presencia del sustrato reductor y genera el compuesto II, el segundo paso de esta reducción de electrón devuelve el compuesto II al estado de reposo de la enzima.





Las ecuaciones 1, 2 y 3 describen la catálisis de la peroxidasa. En ellas, HRP representa el estado de reposo de la enzima, HRP-I el compuesto 1 (primer estado intermedio) y HRP-II el compuesto 2 (segundo estado intermedio). AH₂ y AH* son un sustrato reductor y sus especies radicales oxidadas, respectivamente.

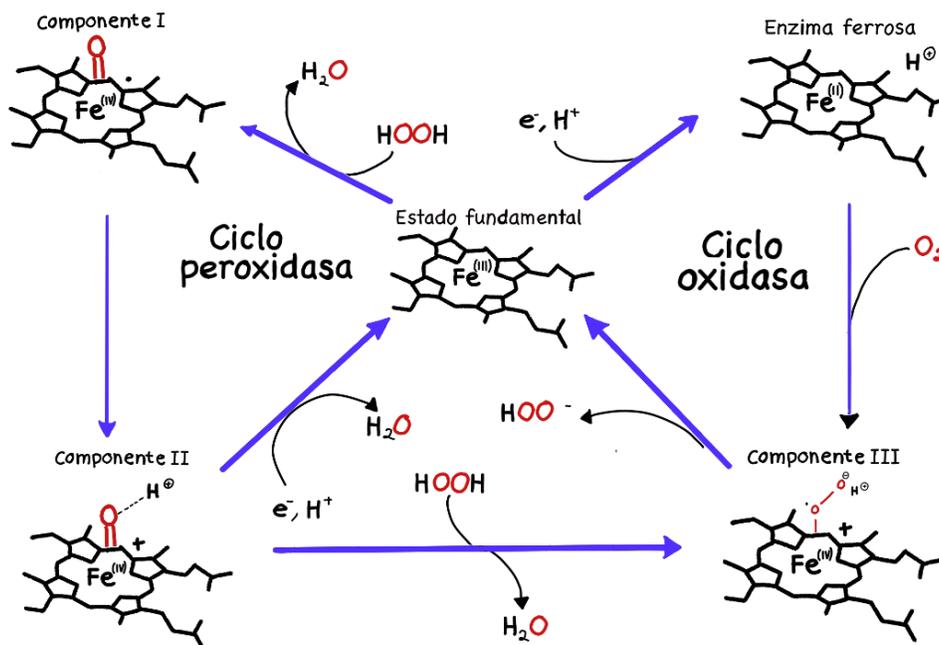


Figura 2.6: Ciclo de la reacción de oxidación-reducción de la peroxidasa del rábano picante.

Su proceso de reacción se ilustra en la **figura 2.6** que muestra los cinco estados de oxidación de la enzima (Chemistry LibreTexts, 2020). Esta reacción inicia cuando el peróxido de hidrógeno se une a la posición octaédrica vacante en el átomo de hierro. Los tres compuestos intermedios de la peroxidasa de rábano picante se forman durante la reacción, ya sea reaccionando con peróxido de hidrógeno o con la adición de un electrón. La reducción del compuesto I al compuesto II y del compuesto II al estado de reposo se lleva a cabo mediante sustratos de reducción, los cuales tienden a ser fenoles o aminas aromáticas (Chemistry LibreTexts, 2020) (Krainer & Glieder, 2015).

2.5.1 Síntesis y purificación

Dado el gran número de aplicaciones médicas, científicas e industriales, se ha generado una demanda creciente de HRP de alta pureza y bajo costo. Un problema en la obtención de HRP es su purificación, ya que la enzima existe en diferentes isoformas que son difíciles de separar unas de otras. Por lo tanto, sería ventajoso producir de forma recombinante solo la isoenzima HRP deseada y purificarla de una manera sencilla y rentable. La **tabla 2.2** presenta distintos métodos de obtención de la enzima, así como la comparación de ventajas y desventajas entre ellas. (Spadiut & Herwig, 2013)

Tabla 2.2*Comparación de formas de obtención de HRP.*

Método	Ventajas	Desventajas
Aislado directo de la planta.	Fácil proceso de purificación.	Largos tiempos de cultivo (una vez al año) y dependencia de las condiciones ambientales en el rendimiento del producto y patrón de glicosilación en la superficie.
Producción recombinante (huésped: <i>Escherichia coli</i>)	Alta productividad volumétrica, fácil proceso de purificación.	Formación de cuerpos de inclusión y bajos rendimientos de replegado
Producción recombinante (huésped: <i>células de mamíferos</i>)	Costoso y complejo proceso de purificación de virus, bajo rendimiento de producto.	Cadenas de glucano en la superficie de la enzima ya humanizadas

Una forma de obtener esta enzima oxidasa es a partir de su fuente natural, la raíz de rábano picante; las ventajas de este método son el poder cultivarla fácilmente en grandes cantidades y que la enzima vegetal glicosilada se puede purificar fácilmente mediante un simple método de cromatografía de afinidad de un solo paso. Sin embargo, las resinas para su purificación son caras y experimentan una pérdida en la capacidad de unión con el tiempo; además de que la raíz de rábano piante puede cosecharse únicamente una vez al año y la cantidad de HRP en la raíz (que suele ser muy baja), así como su patrón de glicosilación en la superficie, dependen en gran medida de las condiciones ambientales.

Un método alternativo es la producción recombinante, con el cual es posible evitar los largos tiempos de cultivo de la planta. La bacteria *E. coli* es un huésped muy importante para la producción de proteínas recombinantes, ya que se obtiene una alta productividad volumétrica al poder cultivarse en medios económicos a altas densidades celulares. Sin embargo, la enzima obtenida estará hiperglicosilada y con cuerpos de inclusión, resultando difícil de purificar con métodos de menos simples.

Otro método consiste en el uso de células de mamífero, siendo ventajoso para la producción de HRP con cadenas de glucano humanizadas en la superficie de la enzima. Las desventajas que presenta son la baja producción y el uso de medios aros y complejos para su cultivo. En la producción de biofarmacéuticos también presenta la desventaja de la necesidad de un extenso procesamiento posterior para la eliminación de impurezas y partículas similares a

virus (Spadiut & Herwig, 2013).

2.5.2 Estabilidad enzimática

Para el uso de enzimas en el ámbito industrial, es indispensable lograr su estabilidad. Ya que su rendimiento depende de parámetros externos como el disolvente, pH y temperatura.

La estabilidad estructural de las enzimas depende en gran medida de sus interacciones moleculares como las interacciones electrostáticas o enlaces de hidrógeno que posibilitan los mecanismos de reacción. La temperatura afecta la viscosidad del medio de reacción enzimático, las interacciones de integridad estructural, solubilidad de sustrato y/o producto de la reacción. Conforme se aumenta la temperatura incrementa la velocidad de reacción también, sin embargo, valores muy altos pueden conducir a la pérdida de actividad o desnaturalización de la enzima (esto debido a la pérdida de fuerzas de interacción). Por su parte, el pH del medio de reacción tiene una gran influencia en las interacciones moleculares, por lo que el desempeño de las enzimas está íntimamente relacionado a éste.

En cuanto a la peroxidasa del rábano picante, la desnaturalización parece estar relacionada a la disociación del grupo hemo, ésta puede ocurrir más rápidamente a valores de pH inferiores a 5. Algunos estudios han demostrado que el pH de actividad máxima es 8 y la temperatura es de 45°C para la HRP en estado libre (Lopes et al., 2014).

La HRP es utilizada siempre como aceptor de electrones por lo que ha sido una de las enzimas más estudiadas en el desarrollo de biosensores. especialmente para determinar peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos (actúan como donantes de electrones) (Yang et al., 2006), iones metálicos o aminos biogénicas. (Guzik et al., 2014). El desafío en esta aplicación es obtener la electroquímica directa del HRP, ya que la incrustación profunda del sitio activo de la enzima se encuentra en una orientación desfavorable. Como lo indica la teoría de Marcus (Raghu et al., 2013), la distancia de transferencia de electrones es importante para la electroquímica directa de la enzima redox, depende de: la distancia total entre el sitio redox dentro de la enzima y la superficie del electrodo, y la orientación de la enzima en el electrodo. Para obtener un buen biosensor se requiere mejorar el ambiente de la enzima (acelerando la transferencia de electrones entre el electrodo y la enzima y mantener una orientación adecuada).

2.6 Inmovilización enzimática

Es el confinamiento de las moléculas de la enzima en una matriz o soporte sólido, que se logra uniendo las enzimas con un material adecuado; cuidando que los productos formados y las moléculas del sustrato entren y salgan libremente de la fase a la que están restringidas las enzimas. (Sirisha et al., 2016)

Como biocatalizadores con un alto potencial en el área industrial, se requiere mejorar ciertas características de su origen biológico: solubilidad en el medio de inmovilización (provoca desnaturalización enzimática y pérdida de actividad catalítica); inhibición por diversos

componentes (Garcia-Galan et al., 2011); disociación de subunidades por presión hidrostática y osmótica, temperatura o pH (Datta et al., 2013). Principalmente se espera obtener enzimas estables, reutilizables, resistentes a diferentes sistemas ambientales y proporcionar mediadores para sus actividades.

Se ha demostrado que las enzimas inmovilizadas exhiben mayor actividad que en solución libre, estabilización (la inmovilización covalente y adsorción física unen la cantidad máxima de subunidades enzimáticas con el área de soporte máxima), ayuda al control de reacción y presentan mayor selectividad y especificidad. Algunos de los factores a tener en cuenta son: el pH, el tiempo, el protocolo de inmovilización y la superficie, ya que las enzimas pueden desnaturalizarse y perder su actividad. (Guzik et al., 2014)

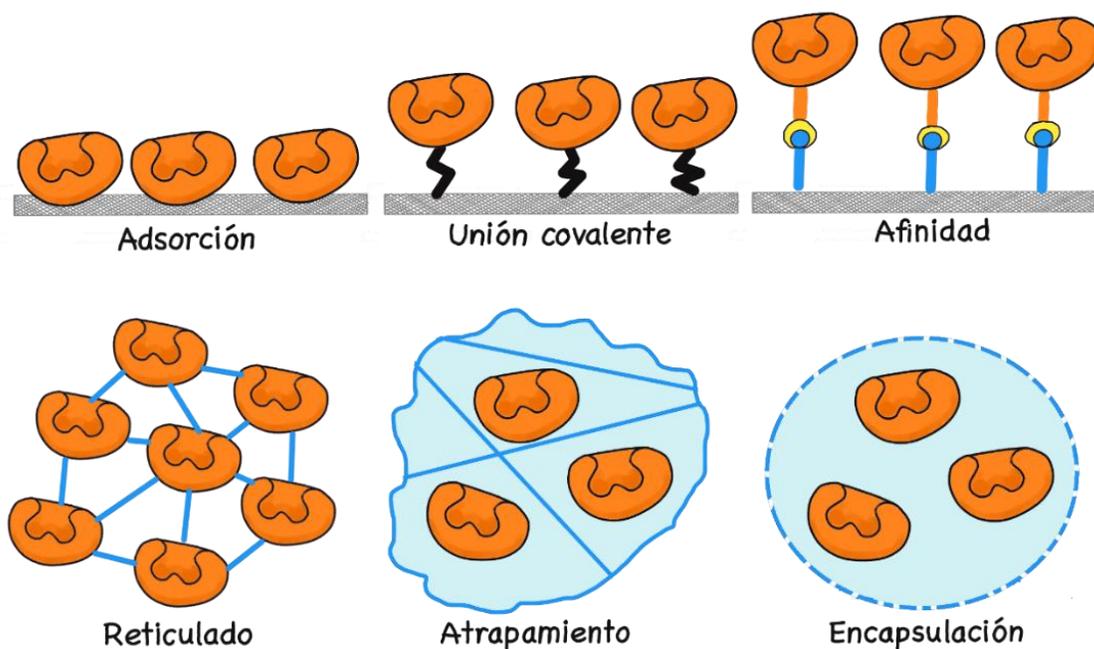


Figura 2.7: Representación gráfica de los diferentes tipos de inmovilización enzimática.

Una matriz adecuada debe tener: inercia, resistencia física, estabilidad, capacidad para aumentar la especificidad y reducir la inhibición del producto y contaminación, capacidad de regeneración y ser económica. (Zdarta et al., 2018) La selección de un método y material adecuados dependen de las condiciones del proceso de reacción y tipo de enzima, entre ellos, la selección del soporte es el mayor desafío por su posible impacto en el sistema. Se han reportado una amplia variedad de materiales, que pueden ser orgánicos, inorgánicos e híbridos o compuestos; lo importante del material es no tener efecto negativo en la estructura de la enzima y no alterar más de lo necesario la interacción de la enzima con el antibiótico, además de tener afinidad entre los grupos funcionales de ambos materiales para una unión estable y efectiva. Los materiales comúnmente usados son los polímeros inertes e inorgánicos. (Zdarta et al., 2018)

La inmovilización cuenta con una gran variedad de métodos físicos y químicos, a continuación, se detallan cada uno de los más importantes mencionados en diversas

bibliografías (ilustrados en la **Fig. 2.7**).

2.6.1 Adsorción

Es uno de los métodos más sencillos, consiste en la interacción hidrofóbica y enlaces salinos soporte-enzima. Representa un proceso simple y económico al no requerir reactivos extra ni implicar funcionalización del soporte. Con este método las enzimas adsorbidas estarán protegidas contra la agregación, proteólisis y la interacción la interfaz hidrofóbica.

La desventaja que presenta es la unión débil de las enzimas al soporte, por lo que los cambios de condiciones pueden provocar la lixiviación de la enzima (Nguyen & Kim, 2017). Una mejor inmovilización puede ser lograda con modificaciones químicas de los soportes utilizados.

Los materiales más utilizados son portadores solubles en agua como derivados de polisacáridos, vidrio y polímeros sintéticos (Sirisha et al., 2016). Se han investigado alternativas más amigables con el medio ambiente como: soportes de fibras de coco, que tienen buena capacidad de retención de agua y un alto intercambio catiónico; celulosa microcristalina, que cuenta con capacidad de unión irreversible y alta capacidad de retención enzimática; y materiales micro/mesoporosos de área superficial funcionalizada con tiol, que son idealmente adecuados para reacciones de reducción y oxidación (Datta et al., 2013).

2.6.1.1 Adsorción física

Consiste en poner en contacto la enzima disuelta con el soporte elegido, bajo condiciones adecuadas, durante un periodo de tiempo establecido para que ocurran las interacciones físicas. Las enzimas son absorbidas por la matriz del polímero a través de fuerzas no específicas como enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, o interacciones hidrofóbicas.

Al existir la posibilidad de revertir las interacciones entre la matriz y soporte debido a la influencia externa, es indispensable mantener ciertas condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica y polaridad del solvente. Una solución es el secado de solución enzimática sobre la superficie de los electrodos, para posteriormente enjuagar y retirar las enzimas no absorbidas.

2.6.1.2 Enlace electrostático

En este método se busca que la enzima quede inmovilizada en la superficie de carga opuesta, a través de interacciones fuertes iónicas y polares. Para ello, dos parámetros considerables son el pH de la solución de reacción y el punto isoeléctrico de la enzima; ya que dependiendo de sus valores la superficie de las moléculas de la enzima puede tener carga positiva o negativa.

Dos técnicas comunes, empleadas en el desarrollo de biosensores enzimáticos, son la deposición capa por capa y el dopaje electroquímico son la deposición capa por capa y el dopaje electroquímico.

2.6.1.3 *Deposición capa por capa*

Método de fabricación de película delgada, se sintetiza a partir de la intercalación de capas enzimáticas de carga opuesta y algún otro material sobre un soporte sólido.

La deposición se efectúa al sumergir un sustrato cargado iónicamente en una solución acuosa de polielectrolito aniónico/catiónico alternadamente. Para después enjuagar el sustrato y sumergir en una solución enzimática iónica. Estos pasos se repiten hasta obtener el número de capas deseado. La carga opuesta en las capas se forma gracias a interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, de coordinación, transferencia de carga, interacciones electrostáticas, reconocimiento molecular, hidrofobicidad o por combinaciones de ellos.

Las ventajas que presenta el método son: simpleza y alta biocompatibilidad, fácil control y rentabilidad del proceso al requerir condiciones medias y uso de poco material, además de tener una modificación del grosor y estructura de capa accesibles. La desventaja es la distorsión cinética que puede provocar la sobrecarga de superficie, sustrato o producto, que en consecuencia puede cambiar la estabilidad del pH de la enzima elegida (Homaei et al., 2013).

2.6.1.4 *Dopaje electroquímico*

Este método requiere el uso de un polímero conductor como soporte. Durante el proceso de oxidación o reducción que se produce, el polímero se carga positiva o negativamente, así las enzimas, también cargadas, pueden incorporarse en el polímero conductor durante su respectivo proceso de reducción u oxidación. Durante la oxidación el polímero se carga positivamente, permitiendo que las moléculas de enzima (cargadas negativamente) se incorporen a la superficie para formar el electrodo (Datta et al., 2013).

Al comparar biosensores fabricados con este método y el de absorción física, el procedimiento de dopaje exhibió proporciones de fondo de señal a señal más altas y tiempos de respuesta más cortos que las configuraciones anteriores de biosensores (Luo et al., 2006).

2.6.2 **Unión covalente**

Otro de los métodos más usados, en el que se forman complejos estables por enlaces covalentes de grupos funcionales de la enzima (no esenciales en actividad catalítica) y la matriz de soporte.

Los grupos pueden ser: grupos amino, carboxílico, fenólico, sulfhidrilo, tiol, imidazol, indol y grupo hidroxilo. En enlaces enzimáticos, el uso de superficies modificadas con péptidos ha demostrado mayor estabilidad con orientación controlada y mayor actividad específica. Otro ejemplo es la reticulación de enzimas con nanofibras electrohiladas, que ha mostrado una mayor actividad residual por el consecuente aumento de superficie y la porosidad (Datta et al., 2013).

La ventaja en general es la obtención de mayor estabilidad, sin embargo, se requieren grandes cantidades de biorreactivo, la reproducibilidad es generalmente pobre (Sassolas et al., 2012), y existe un riesgo constante de desnaturalización enzimática al hacer modificaciones

químicas de los grupos funcionales. (Nguyen & Kim, 2017) Una estrategia para prevenir la inactivación de residuos de aminoácidos del sitio activo, es la unión covalente de la enzima con la matriz en presencia de sustrato o un inhibidor competitivo (Sirisha et al., 2016).

2.6.2.1 Activación de grupos carboxílicos

El proceso se puede llevar a cabo mediante un grupo funcional carbodiimida ($RN=C=NR$) que permita la unión entre los grupos carboxilo ($-COOH$) del soporte y amino ($-NH_2$) de la enzima. Para mejorar la eficiencia de la inmovilización, la N-hidroxisuccinimida (NHS) puede asociarse a la carbodiimida en el acoplamiento covalente de la enzima

2.6.2.2 Activación de grupos amino

Al igual que otros procesos, éste se puede llevar a cabo con carbodiimidias que permitan la unión de un soporte funcionalizado con amina y una enzima con carboxilos. Por otra parte, se puede usar glutaraldehído como agente activador; la reacción de la base de Schiff ocurre entre el soporte funcionalizado con amina y un grupo aldehído de glutaraldehído, después, un segundo grupo aldehído se une covalentemente a una enzima funcionalizada con amina.

2.6.2.3 Quimisorción.

Esta técnica de inmovilización se basa en la fuerte afinidad, y un enlace covalente, entre el grupo tiol ($-SH$) (presente en algunas enzimas como las oxidorreductasas e isomerasas con residuos de cisteína) y los sustratos de oro.

Las principales ventajas son la simplicidad y la unión fuerte y estable de biomoléculas (McRipley & Linsenmeier, 1996). Las enzimas que se utilizan para este propósito se encuentran de forma nativa o se les proporcionan los grupos reactivos correspondientes mediante técnicas de modificación química o ingeniería genética (Homaei et al., 2013).

2.6.3 Atrapamiento

En esta inmovilización la enzima no se une a la superficie directamente, queda atrapada en una red polimérica que permite el cruce del sustrato y los productos mientras retiene la enzima, evitando su difusión. Como la enzima no interactúa químicamente es posible mejorar su estabilidad y minimizar la lixiviación y desnaturalización de ésta

Las estrategias para lograr el enjaulamiento puede ser cualquiera de las siguientes: 1) inclusión de la enzima dentro de una matriz polimérica altamente reticulada, 2) disolución de la enzima en una fase no acuosa o 3) separación de la enzima de una masa a granel. (Sirisha et al., 2016). Las enzimas se pueden inmovilizar en matrices tridimensionales como una película electropolimerizada, una red anfifílica compuesta de polidimetilsiloxano (PDMS), un fotopolímero, un gel de sílice, un polisacárido o una pasta de carbón.

Las ventajas que presenta esta técnica son: facilidad; que la enzima, mediadores y aditivos se pueden depositar simultáneamente en una misma capa de detección; la actividad de la enzima se conserva durante el proceso de inmovilización por ausencia de modificación del

elemento biológico; los biosensores basados en enzimas atrapadas físicamente a menudo se caracterizan por una mayor estabilidad operativa y de almacenamiento (Sassolas et al., 2012).

Las desventajas son: resistencia a la transferencia de masa, fuga de las enzimas si la matriz de soporte tiene poros demasiado grandes, baja capacidad de carga enzimática; y en biosensores enzimáticos las limitaciones, como la lixiviación de biocomponentes y posibles barreras de difusión, pueden restringir el rendimiento de los sistemas. (Datta et al., 2013).

2.6.3.1 Polimerización electroquímica

En este proceso, también llamado electropolimerización, se aplica un potencial o corriente apropiado en una solución que contenga moléculas de enzima y monómero. La inmovilización se basa en las reacciones de oxidación o reducción que ocurren en la superficie del electrodo al formar un polímero adherente cuando dichas reacciones generen radicales reactivos; las enzimas en solución que estén cerca de la superficie quedan atrapadas dentro de la red polimérica creciente a medida que se lleva a cabo el proceso de polimerización.

La polimerización sigue los siguientes pasos: 1) oxidación del monómero, este paso genera un catión radical que puede reaccionar con un monómero neutro u otro radical similar y formar un dímero. 2) Los dímeros formados se someten a un proceso de oxidación y a reacciones de acoplamiento, con esto generan oligómeros. 3) Con la formación de oligómeros se produce un polímero insoluble depositado en la superficie del electrodo.

La mayoría de los materiales usados en estas películas para inmovilización enzimática son polímeros conductores electrónicos como: polianilina, polipirrol, politiofeno, pirroles, tiofenos y poliindol; debido a su ventaja en cuanto a conductividad, que ayuda a impulsar electroquímicamente el potencial aplicado y el tiempo de propagación de la deposición, con ello, existe un mejor control del sitio de depósito y el grosor de las películas buscadas. Por otra parte, también pueden usarse otros conductores redox, como en el caso de los complejos metálicos de polipiridina, y los polímeros no conductores.

En general, la polimerización electroquímica debe llevarse a cabo en un ambiente libre de oxígeno, con una solución de polimerización adecuada. Debido a la liberación de protones que ocurre durante la reacción, existe un cambio de pH y carga del polímero que pueden afectar la actividad enzimática, sin embargo, esto puede resolverse con la incorporación de un electrolito con aniones. Otro inconveniente es la necesidad de usar altas concentraciones de monómero (entre 0,05-0,5 M) y de enzima (0,2-3,5 mg ml⁻¹), además del deterioro de la película por sobre oxidación que ocurre con el agotamiento de monómero en la solución que rodea el electrodo (Nguyen & Kim, 2017).

2.6.3.2 Proceso sol-gel

Su principio es la capacidad de formar matrices de óxidos metálicos, sílice y organosiloxanos de porosidad definida, mediante la reacción de precursores orgánicos a temperatura ambiente.

Existen dos métodos genéricos de la técnica sol-gel según los precursores utilizados: 1)

método coloidal y 2) vía polimérica (o alcóxido). En la inmovilización de enzimas se emplea comúnmente el segundo. Éste comienza con la disolución de los alcóxidos metálicos (tetrametoxisilano o metiltrimetoxisilano) en un líquido de pH ácido, en presencia de agua (para la hidrolización), dando como resultado la producción de grupos silanol (Si-OH); posteriormente, el precursor hidrolizado se activa mediante la adición de una base (como hidróxido de potasio), dicha activación iniciará la condensación entre los restos de silanol, para finalmente formar los polímeros de siloxano (SiO-Si). (Datta et al., 2013)

Las ventajas que presenta son inmovilización a temperatura ambiente y gran estabilidad, sin embargo, existen problemas con la obtención del sol-gel con tamaños de poro reproducibles y limitaciones de difusión dentro de la red porosa y fragilidad de la matriz vítrea (Collings & Caruso, 1997).

2.6.3.3 Fotopolimerización

Esta inmovilización se basa en la polimerización de crecimiento en cadena y requiere el uso de líquidos, resinas curables por radiación y solución enzimática. La reacción inicia cuando los fotopolímeros se exponen a la luz en la región ultravioleta o visible; después, los fotopolímeros experimentan entrecruzamiento de las moléculas que genera el endurecimiento del material. La ventaja de su uso es que el monómero puede recibir luz directamente y a través de una transferencia de energía de un fotosensibilizador.

El proceso consta de 4 etapas: 1) iniciación, 2) propagación, 3) terminación y 4) transferencia de cadena; en el segundo paso se requiere la irradiación de luz para desencadenar las reacciones de reticulación y generar el polímero insoluble (Nguyen & Kim, 2017). Por ejemplo, se ha utilizado estirilpiridinio, que contienen poli (alcohol vinílico), para atrapar enzimas (Ichimura & Watanabe, 1982).

2.6.4 Reticulación

Es un método irreversible en el que las moléculas de la enzima forman reticulaciones intermoleculares por medio de enlaces covalentes; para ello, se utilizan reactivos enlazadores bi/multifuncionales como glutaraldehído, bisdiazobencidina o diisocianato de hexametileno. Durante la síntesis la enzima está presente en la mezcla de reacción, en lugar de estar unida a algún soporte (Datta et al., 2013).

Entre los ejemplos basados en este método se han reportado biosensores conductimétricas de enzima Fosfatasa alcalina inmovilizada por reticulación para la detección de diferentes moléculas de metales pesados (Berezhetsky et al., 2008). Otro ejemplo, en el área de salud, es el de un biosensor con 3 enzimas, incluyendo glucosa, estabilizadas con glutaraldehído para la creación de un sensor multienzimático (López-Gallego et al., 2005).

El atractivo para su uso se debe a factores como simplicidad, la fuerte unión química que se logra entre las biomoléculas, fuga mínima de enzimas y su posibilidad de ajustar el microambiente con agentes estabilizadores. Sin embargo, la principal desventaja son las modificaciones severas que sufre durante el proceso, ya que existe la posibilidad de pérdidas de actividad debido a la distorsión de la conformación de la enzima activa y las alteraciones químicas del sitio activo. Para mitigar este efecto se suelen agregar proteínas inertes como

gelatina o albúmina de suero bovino (BSA). (Nguyen & Kim, 2017).

2.6.5 Inmovilización por afinidad

Esta inmovilización se logra mediante interacciones específicas entre la enzima y el soporte, apoyándose en la especificidad de la enzima. Esta unión se logra por dos métodos: 1) acoplamiento previo de la matriz a un ligando de afinidad por la enzima diana y 2) enzima conjugada con otra molécula que desarrolla afinidad hacia la matriz (Sirisha et al., 2016).

Los adsorbentes de afinidad también se han utilizado para la purificación simultánea de enzimas. Los soportes de afinidad complejos como las perlas de sílice porosa recubiertas de quitosano albergan mayores cantidades de enzimas que conducen a una mayor estabilidad y eficiencia. La fuerza de unión de las enzimas y la reutilización de las mismas es debido a la presencia de fuerzas no covalentes, como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc.(Sardar & Gupta, 2005)(Datta et al., 2013).

2.8.5.1 Inmovilización ligada a metales

Este método implica la precipitación de sales metálicas sobre la superficie de la matriz de soporte (puede ser lograda por calentamiento), se basa en la capacidad de los metales para unirse a los grupos nucleófilos del vehículo de soporte.

Las ventajas que presenta son: actividad enzimática relativamente más alta que otras (de 30 a 80%), sencillez del proceso, reversibilidad al disminuir el pH y regeneración de la enzima y matriz (Sirisha et al., 2016) (Homaei et al., 2013).

2.6.5.2 Afinidad Biotina-(estrepto)avidina

Esta estrategia para inmovilizar enzimas implica la fuerte afinidad entre la biotina y la (estrepto)avidina por su constante de disociación de 10–15M. Se logra mediante un acoplamiento covalente de biotina a la proteína, usando reactivos de éster de biotina que modifican los residuos de lisina (Nilsson et al., 1997). Otra forma es modificar genéticamente a las enzimas con secuencias peptídicasceptoras de biotina fusionadas con el extremo C de la enzima (Zhang y Cass, 2000).

2.6.5.3 Afinidad lectina-carbohidrato

Este método se basa en una molécula naturalmente presente en la enzima, por lo que no requiere ninguna modificación previa. La lectina es inmovilizada en un soporte, a la que se une la enzima glucosídica mediante lectinas específicas,

Esta afinidad proporciona inmovilización reversible, buena accesibilidad al sustrato estérico y protección de la enzima frente a la digestión proteolítica. Además, las soluciones de medición no contienen carbohidratos que puedan tener una mayor afinidad por la lectina que la cadena de carbohidratos de la enzima (Sassolas et al., 2012).

2.7 Materiales de soporte

Como ya se ha visto en subcapítulos anteriores, un sistema de enzima inmovilizada tiene propiedades químicas, biológicas y mecánicas específicas que están gobernadas por la

sinergia entre las propiedades de la enzima y el material de soporte.

Como se verá a continuación, existe una gran variedad de materiales que pueden ser utilizados como soporte enzimático, el uso que se requiera dar al sistema será un factor determinante en el tipo de soporte a emplear.

2.7.1 Polímeros

2.7.1.1 Sintéticos

Los polímeros sintéticos son el más común de los materiales de soporte para inmovilización enzimática. Su principal beneficio es la estabilidad mecánica y química dada por su alta hidrofobicidad y resistencia a cambios drásticos de pH. Pero, el inconveniente en su uso se debe a las limitaciones en cuanto a la difusión del material que se ven reflejadas en el proceso de control cinético (Homaei et al., 2013).

2.7.1.2 Biopolímeros

Los Biopolímeros son otro tipo de materiales usados para este propósito, entre ellos destacan los polisacáridos insolubles en agua como la celulosa, almidón, agarosa, y quitosano. Se caracterizan por formar geles acuosos altamente inertes. Su estructura química posibilita la inmovilización enzimática de forma reversible o irreversible; también, con el uso de reactivos bifuncionales es posible crear entrecruzamientos que fortalezcan su estructura y aumentar su resistencia térmica y mecánica (Homaei et al., 2013).

2.7.1.3 Inteligentes

Estos sistemas poliméricos son sensibles a estímulos externos que se dan por pequeños cambios en su entorno, como temperatura, pH, luz, agentes químicos, campos eléctricos o magnéticos, iones o moléculas biológicas (Homaei et al., 2013); como respuesta a este estímulo cambian su forma y módulo elástico. Algunos ejemplos son el poliuretano, copolímeros de polietileno y poliestireno, poliéster, entre otros (Serrano, n.d.).

Las ventajas al usar estos materiales son: posibilidad de exhibir cambios radicales y regresar a su forma original sin degradación del material; fácil manufactura, por lo que pueden ser una alternativa económica a las aleaciones metálicas; y baja densidad.

2.7.1.4 Conductores

Los polímeros conductores tienen un esqueleto de electrones conjugados “p”, que permite un movimiento libre de electrones en toda la red debido al alto grado de superposición del orbital molecular del polímero que permite la formación de una función de onda molecular deslocalizada y la ocupación parcial del orbital molecular (Ahuja et al., 2007).

Son usados principalmente por sus características electroquímicas inusuales, como alta conductividad eléctrica, bajo potencial de ionización, alta afinidad electrónica y por sus propiedades ópticas. Estas características permiten la inmovilización de biomoléculas en un entorno adecuado.

Se ha llevado a cabo la investigación de estos polímeros en las áreas de ciencias bioanalíticas por su compatibilidad con biosensores in vivo y para el monitoreo continuo de fármacos o metabolitos en fluidos biológicos (Harwood & Pouton, 1996).

2.7.2 Hidrogeles

Los geles son materiales que poseen las características comunes de sólidos, como estabilidad de forma, y también pueden absorber disolventes e incrementar su tamaño (Serrano, n.d.). Un hidrogel es una red tridimensional de polímeros hidrofílicos naturales o sintéticos. Sus propiedades físicas se pueden modular usando estímulos externos específicos, tales como pH, temperatura, fuerza iónica, luz y sonido.

Debido a estas características, el hidrogel es ampliamente usado en la biotecnología para administración de fármacos, ingeniería de tejidos o diagnóstico molecular. En cuanto a la biodetección, los estímulos bioquímicos actúan sobre la solución polimérica deformando la red. En conjunto a este tipo de soporte, se pueden usar enzimas, anticuerpos o aptámeros, los cuales actúan como entrecruzadores para generar estructuras de redes densas (Jung et al., 2017).

2.7.3 Soportes inorgánicos

En esta clasificación se encuentran aquellos materiales inorgánicos que pueden ser utilizados como soportes para la inmovilización enzimática, desde materiales con sílice, hasta aquellos que incluyen el desarrollo de nanomateriales.

La sílica mesoporosa presenta la capacidad de ajuste del tamaño de poro, una gran área superficial y alta estabilidad frente a estrés químico y físico. El silicón poroso, además de la capacidad de ajuste de poro, tiene la ventaja de ser biocompatible y tener poros con grupos hidrógeno que permiten la inmovilización de biomoléculas. Las zeolitas microporosas pueden tener enlaces de hidrógeno fuertes con las enzimas debido a los grupos hidroxilo.

Entre los nanomateriales, los nanotubos de carbono ofrecen reusabilidad de las biomoléculas al filtrar o usar campo magnético. Los nanomateriales porosos pueden estar compuestos de sílica, carbón, zeolitas y metales, los cuales son usados en el biosensado por su alta área superficial y estabilidad. Finalmente, también existen soportes de nanopartículas de Oro, plata, entre otros (Asal et al., 2019).

2.8 Biosensores

Los biosensores son dispositivos analíticos que usan materiales biológicos para reconocer otras moléculas (analito) y proveer información de ellas (identificar su presencia y/o cantidad). Dicho reconocimiento se obtiene partir de señales específicas, dependiendo del tipo de sensor, las cuales son captadas y procesadas posteriores a su detección.

Los componentes básicos de cualquier biosensor, representados en la **Fig. 2.8**, son: 1) elemento de reconocimiento, 2) transductor y 3) sistema electrónico para la amplificación de la señal, registro y representación de datos fácil de usar (Korotkaya, 2014).

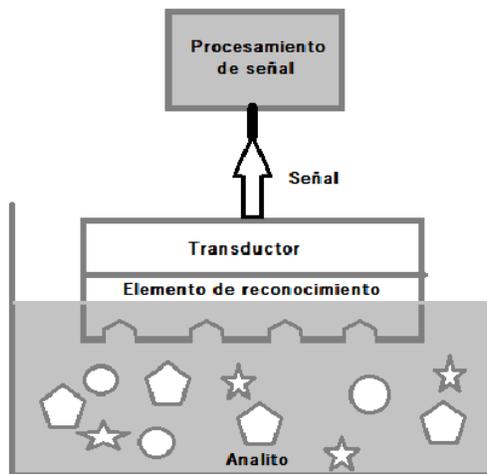


Fig. 2.8: Esquema ilustrativo de componentes de un biosensor.

2.8.1 Bioreceptores

El elemento de reconocimiento es un componente básico de cualquier sensor, ya que con él puede detectar una respuesta selectiva de uno o más analitos para su identificación (Korotkaya, 2014).

2.8.1.1 Células

Incluidos los microorganismos (bacterias, hongos, células eucariotas, levaduras), orgánulos de celular y cortes de tejido vegetal o animal. Son elementos vivos inmovilizados en electrodos, que después son regenerados por inmersión en una solución nutritiva.

Su uso se debe a la baja inhibición en presencia de otros componentes en las muestras; además de tener mayor tolerancia a los cambios de pH y temperatura y, generalmente, un largo tiempo de vida. Pero, el inconveniente de este receptor es la baja selectividad y su lenta respuesta comparada al de las enzimas aisladas debido a la gran variedad de procesos metabólicos que se desarrollan en una célula viva. Otra desventaja es la complejidad de su selección y el mantenimiento de las mismas (Monošik et al., 2012).

Las células Non-viable son un ejemplo de este tipo de elementos, se han utilizado como una alternativa más económica a las enzimas. Otro ejemplo son las células viables, al usar las funciones respiratorias y metabólicas de la célula, el analito puede monitorearse al fungir como un sustrato o un inhibidor de estas funciones (D'Souza, 2001).

2.8.1.2 Anticuerpos

Son biomoléculas complejas hechas de cientos de amino ácidos acopladas en una secuencia ordenada. Como receptores son altamente específicos y útiles como inmunosensores.

Su principal ventaja es la sensibilidad y selectividad con la que cuentan; sin embargo,

presentan limitaciones para la detección de contaminantes ambientales y alimenticios. A pesar de que algunos anticuerpos son relativamente baratos, los animales deben estar inmunizados para obtenerlos, de otra forma los anticuerpos específicos requieren aislamiento y purificación. Otras desventajas son los problemas éticos que conlleva el uso de animales, la dificultad de generar compuestos que no provoquen toxicidad o respuesta inmune, unión no específica y la necesidad de controlar las condiciones ambientales por la pérdida de propiedades (van Dorst et al., 2010).

2.8.1.3 Ácidos nucleicos

Los biosensores basados en el uso de DNA, RNA y péptidos como bioreceptores son altamente específicos y selectivos gracias a la afinidad entre pares de bases de secciones complementarias de cadenas nucleótidas alineadas. Comúnmente se utilizan sondas de oligodesoxirribonucleótidos (ODN) sintéticos en los sensores de hibridación de ADN, junto con etiquetas finales, como tioles, disulfuros, aminas o biotina, para inmovilizar el elemento en las superficies del transductor (Monošík et al., 2012).

El uso de ácidos nucleicos en biosensores aumenta su estabilidad y permite el uso de una mayor variedad de buffers o disolventes debido a su resistencia. La síntesis ofrece alta pureza y oportunidad de modificación química para mejorar la estabilidad y especificidad de las moléculas (facilitando la funcionalización de superficie) (van Dorst et al., 2010).

La principal desventaja del uso de ARN es la sensibilidad a las nucleasas, que puede evitarse con la modificación del anillo de ribosa y usando análogos de imagen especular (spiegelmers) (Famulok et al., 2000).

2.8.1.3 Enzimas

Son proteínas globulares que catalizan reacciones bioquímicas, corresponden al elemento de bioreconocimiento más usado en biosensores. Además de aumentar significativamente la velocidad de una reacción en relación con una no catalizada, la interacción con el sustrato se puede caracterizar mediante estudios cinéticos.

Las enzimas son selectivas para un tipo de molécula de sustrato debido a la disposición de los aminoácidos en el sitio activo de la enzima, que a menudo se encuentra en el centroide de la proteína, el cual une al sustrato específico. La selectividad posibilita la detección de sustancias individuales en una mezcla compleja, como la orina o la sangre. sin usar pretratamientos o separando los analitos de la muestra, lo que implica una ventaja en cuanto ahorro de tiempo y mano de obra y disminución de interferencias (Hammond et al., 2016).

Para el desarrollo del dispositivo enzimático se deben tener en cuenta ciertos parámetros, como el origen y la disponibilidad del componente biológico, su estabilidad operativa y de almacenamiento, preservación prolongada de bioactividad, así como el procedimiento adecuado de inmovilización que mantenga al mínimo la variación entre las mediciones (Hammond et al., 2016). Otro punto importante a considerar es la comunicación rápida a través de la interfaz enzima-electrodo, ya que permitirá alta sensibilidad y rapidez en la respuesta de salida de la señal en tiempo real (S. Xu et al., 2019).

2.8.1.4 MIPs

Los MIP son materiales sintéticos reticulados con sitios de reconocimiento generados artificialmente. Imitan la actividad biológica de receptores naturales, como los anticuerpos, al unirse específicamente a una molécula diana. Su síntesis mediante impresión molecular implica la preparación de un “molde” hecho de monómeros funcionales polimerizables alrededor de un objetivo; después se copolimerizan los complejos resultantes con reticuladores en presencia de un iniciador; luego de la polimerización se realizan lavados para eliminar la molécula plantilla y dejar los sitios de reconocimiento específicos, los cuales son complementarios, en tamaño, forma y posición de los grupos funcionales, a la plantilla original.

Los MIPS obtenidos son una alternativa atractiva para los anticuerpos al ofrecer una selectividad y reactividad cruzada similares. En comparación a los anticuerpos, estos materiales presentan alta estabilidad por sus propiedades típicas de los polímeros, como alta tolerancia térmica, química, mecánica y ante valores extremos de pH; además, su preparación es relativamente fácil y barata para la mayoría de analitos objetivo (Owens, 1999) y tiene una vida útil extremadamente larga (8 años) sin pérdida de afinidad por la plantilla (van Dorst et al., 2010).

2.8.2 Transductores

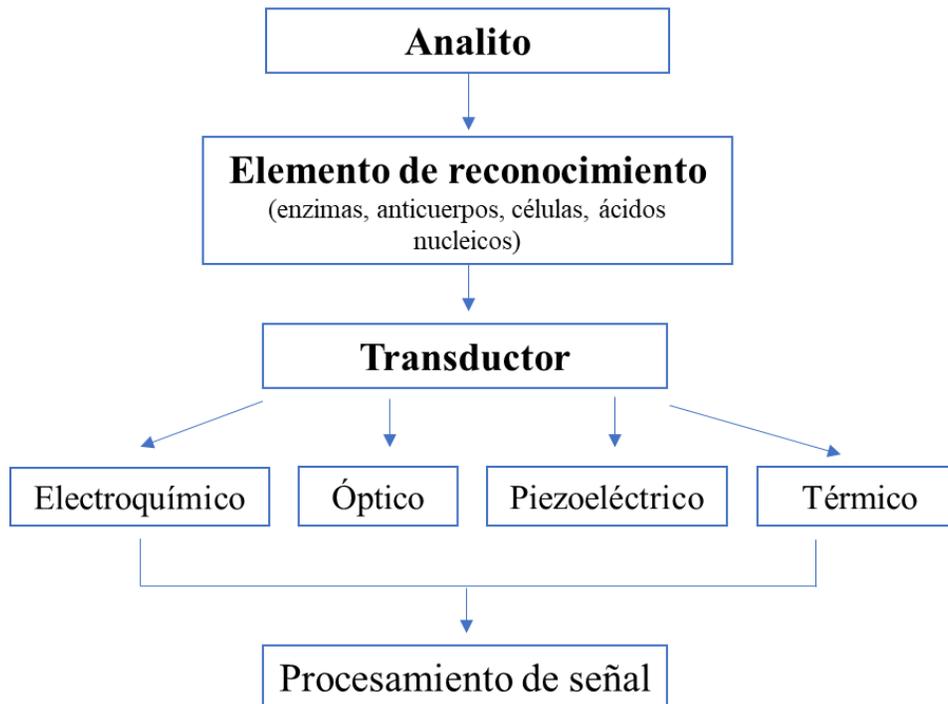


Fig. 2.9: Esquema de variedad de elementos empleados en un biosensor.

Este componente convierte los cambios de la reacción entre el elemento biológico de reconocimiento y el analito en una señal que puede ser medida usando un dispositivo sensible a la luz y/o uno electrónico (Korotkaya, 2014). La **Fig. 2.9** esquematiza la posición y tipos

de transductores empleados en la construcción de biosensores (Dornelles Mello & Tatsuo Kubota, 2002).

2.8.2.1 *Electroquímicos.*

La mayoría de los biosensores se encuentran en esta clasificación por su bajo costo, facilidad al usuario, portabilidad y simplicidad de construcción (Ronkainen et al., 2010).

- **Potenciométricos:** En un tipo de biosensor electroquímico cuya señal analítica es la caída de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia, o entre dos electrodos de referencia separados por una membrana semipermeable a corriente cero a través de una celda electroquímica. Generalmente se usan electrolitos selectivos de iones (ISE por sus siglas en inglés) como transductor. Los ejemplos más utilizados son los sensores que emplean electrodos de pH.
 - Los transductores basados en el efecto de campo de silicio sensibles a iones son como los sistemas potenciométricos convencionales, pero se implementa un transistor de entrada del circuito electrónico del voltímetro de alta resistencia que se transpone a la solución que se analiza, esto aumenta la sensibilidad del biosensor (A. Kumar, 2000).
- **Voltamétricos:** En este sensor se mide la corriente de oxidación o reducción, inducida con la caída de potencial preestablecida en los electrodos, de especies electroactivas. Generalmente se aplica potencial constante al electrodo de trabajo frente al electrodo de referencia. Los valores de concentración o velocidad de formación (o desaparición) son proporcionales a la corriente observada (A. Kumar, 2000).
- **Conductométricos:** Aquí se mide la conductividad eléctrica de la solución durante una reacción bioquímica. Cuando el elemento de reconocimiento es una enzima es menos frecuente el uso de estos dispositivos (A. Kumar, 2000).
- **Amperométricos:** Este tipo de transductor mide la corriente producida por la reacción química (conversión catalítica o absorción de proteínas) de los materiales electroactivos encontrados en la superficie del electrodo al aplicar una corriente constante; el cambio en la corriente será equivalente a la concentración del analito. Los electrodos de trabajo de este transductor suelen ser un metal noble, óxido de indio y estaño (ITO), o carbono recubierto por un bioreceptor (Malhotra & Ali, 2018).

2.8.2.3 *Ópticos*

Estos transductores pueden basarse en absorción, fluorescencia, luminiscencia, reflexión interna, resonancia de plasmón superficial o espectroscopia de dispersión de luz. De los cuales, por su selectividad y sensibilidad, la más usada es la fluorescencia.

En el caso de la fluorescencia, los dispositivos detectan el cambio en la frecuencia de emisión de la radiación electromagnética que es causado por una absorción de radiación o generación momentánea de un estado de excitación. La generación repetida del estado de excitación

genera una señal brillante que puede ser medida (Velasco-Garcia, 2009).

Por otro lado, los dispositivos basados en difracción óptica utilizan una oblea de silicio que es expuesta a luz ultravioleta; esta oblea se encuentra unida mediante enlaces covalentes a una proteína, con la luz el bioreceptor se inactiva en las regiones expuestas dejando activas aquellas en donde se encuentran los enlaces antígeno-anticuerpo. Estas zonas activas e inactivas crean rejillas de difracción que producen una señal al iluminar con una fuente de luz, dicha señal puede ser amplificada o medida directamente (Mohanty & Kougianos, 2006).

2.8.2.4 *Piezoeléctricos*

Los sensores piezoeléctricos emplean cristales que sufren deformación elástica bajo la acción de un potencial eléctrico. Un potencial alterno a cierta frecuencia genera una onda estacionaria en el cristal. Los inmunosensores piezoeléctricos se consideran entre los sensores más sensibles desarrollados hasta la fecha, al ser capaces de detectar antígenos en el rango de picogramos. (A. Kumar, 2000)

Su característica principal es la detección de moléculas sin utilizar etiquetas. La detección se basa en la adsorción del analito en la superficie del cristal, que está cubierta con un elemento de reconocimiento biológico, que altera la frecuencia de resonancia al aumentar la masa, lo cual es un indicativo de unión. Dicho cambio puede ser medido eléctricamente y usarse para determinar la masa adicional al cristal (para técnicas sensibles a la masa) (Vo-Dinh et al., 2001).

2.8.2.5 *Térmicos*

Este es un método poco común para uso en biosensores, su principio se basa en determinar la concentración del analito mediante la cantidad de calor medido por un termopar sensible (Korotkaya, 2014).

Las aplicaciones que se le han dado son: análisis clínicos de glucosa o colesterol, control de procesos industriales (un ejemplo es la producción de penicilina V por fermentación) (Rank et al., 1992), uso en análisis ambientales (metales pesados o pesticidas), o en la industria alimenticia.

Las ventajas que presenta frente a otros métodos son la falta de etiquetas biológicas, estabilidad, fácil miniaturización por su alta sensibilidad, reproducibilidad, posible automatización, medición continua, no sensibilidad a la luz, falta de interferencias electroquímicas u ópticas y que es compatible con solventes orgánicos. Sin embargo, presenta dificultad con el uso de células y de implementación, altos costos y algunas muestras requieren un tratamiento previo (Gaudin, 2017).

2.8.3 Aplicaciones

A continuación, se presentan algunas de las áreas de aplicación de biosensores.

2.10.3.1 *Diagnóstico clínico*

El diagnóstico y monitoreo de enfermedades requiere el uso de diversas técnicas de

toma de sangre, orina y otras pruebas relacionadas, lo que requiere tiempo, dinero, personal especializado y grandes cantidades de muestra. Los biosensores representan una alternativa a algunos de estos análisis, mejorando el costo, rapidez, facilidad y sensibilidad (Bahadır & Sezgintürk, 2015).

Sin embargo, a excepción de los biosensores de glucosa, el mercado de los biosensores en el análisis clínico no ha sido explotado; posiblemente por cuestiones de interferencia de moléculas en mediciones simples, selectividad y precisión (Monošík et al., 2012). Los biosensores de glucosa comerciales ayudan a la medición casera de glucosa en sangre para el control de la diabetes y trastornos endocrinos; este es un campo ampliamente explotado por su importancia y mercado. La mayoría de estos dispositivos se basan en técnicas amperométricas y enzimas (glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa), pero también se han desarrollado dispositivos implantables, uso materiales orgánicos conductores y nanomateriales (Yoo & Lee, 2010).

Otro análisis clínico común es la prueba de la *gonadotropina coriónica humana* (hCG, por sus siglas en inglés), la cual busca detectar la hormona hCG en la sangre o la orina, ya que esta hormona es secretada durante el embarazo. En este análisis se basa la prueba de embarazo que es un biosensor de uso doméstico bastante común. Dicha prueba es fabricada con una membrana de nitrocelulosa y almohadillas de aplicación e integración; una de las almohadillas contenidas en el dispositivo incorpora un anticuerpo monoclonal anti-hCG inmovilizado, que a su vez se encuentra conjugado con una etiqueta de colorante (Bahadır & Sezgintürk, 2015).

2.8.3.2 Medioambiental

El monitoreo de efluentes de aguas residuales industriales y urbanas, contaminantes del aire y del suelo es fundamental para gestionar los riesgos para la salud humana y ambiental. Los análisis químicos por sí solos no suelen proporcionar información suficiente y rápida para la evaluación de riesgos, por ello, en los últimos años se han desarrollado alternativas basadas en bioensayos y biosensores que ofrezcan métodos más simples, rápidos, rentables y portátiles (Rogers, 2006).

Por ejemplo, para la detección de insecticidas organofosforados se han propuesto biosensores desechables usando la enzima acetilcolinesterasa con transductor amperométrico utilizando una monocapa auto ensamblada de cisteamina sobre electrodos serigrafados en oro. Para la detección de *acetamiprid* en muestras de suelo de superficie fresca se propuso un aptasensor colorimétrico, usando nanopartículas de oro, nanotubos de carbono de pared múltiple y nanocintas de óxido de grafeno reducido como matriz de soporte del aptámero (para mejorar la transferencia de electrones) (Fei et al., 2015). Otro pesticida analizado, en agua de mar o río y en cultivos, fue la atrazina; utilizando un inmunosensor voltamétrico basado en nanopartículas de oro y nanotubos de carbono de pared simple (Justino et al., 2017).

La presencia de patógenos en agua se considera un grave peligro para la salud, por ello se propusieron biosensores ópticos específicos basados en la resonancia plasmónica superficial para la detección de *Legionella pneumophila* (Enrico et al., 2013). Las brevetoxinas y las microcistinas son toxinas que se producen a partir de algas; para su detección se aplicó un

sensor electroquímico sensible a una toxina marina (brevetoxina -2), usando electrodos de oro funcionalizados con una monocapa auto ensamblada de cisteamina (Eissa et al., 2015).

2.8.3.3 Análisis de alimentos

Este es un campo menos común que el de aplicaciones clínicas, principalmente por la gran variedad de matrices con diferentes composiciones que pueden existir (alimentos, bebidas y empaques), esto dificulta el diseño de dispositivos que se adapten a ellos o que puedan detectar más de un analito (Monošík et al., 2012). Ejemplos de la variedad de aplicaciones encontradas en la bibliografía se encuentran recopiladas en la **tabla 2.3**.

Existen 3 categorías principales para el análisis de alimentos: 1) para el control de seguridad alimentaria, 2) calidad de los alimentos y 3) precisión de análisis. El monitoreo de contaminación de alimentos es de los principales objetivos de los biosensores debido a la importancia sobre la salud humana en general. La rapidez en los análisis es una característica predominante, ya que, la acumulación de toxinas a menudo se correlaciona con el tiempo; la rapidez y facilidad de los biosensores podría representar una solución en comparación a los análisis convencionales (Mishra et al., 2018).

Como materiales de soporte, aquellos a base de grafeno y sus derivados presentan propiedades ópticas, eléctricas, térmicas, mecánicas y químicas deseables en la industria de alimentos al ser funcionalizados con antibacterias y anticuerpos.

Tabla 2.3

Biosensores en análisis de alimentos

Matriz de análisis	Analito	Método de detección	Transductor	Soporte	Referencia
Sudor (piel)	Alcohol	Alcohol oxidasa	Amperométrico	Quitosano-agarosa	(Kim et al., 2016)
Cerveza	Ocratoxina (OTA)	Nanopartículas de oro (Au NPs)	Amperométrico	Poliacrilamida	(R. Liu et al., 2015)
Leche	Ácido láctico	Lactato oxidasa, HRP y ferroceno	Potenciométrico	Pasta de carbono	(Zaydan et al., 2004)
Carne congelada	Sulfadimetoxina (SDM)	Aptámero	Amperométrico	Au NPs y óxido de grafeno	(Mohammad-Razdari et al., 2019)
Café	Cafeína	<i>Pseudomonas Alcaligenes</i>	Amperométrico	Membrana de celofán	(Babu et al., 2007)
Salsa de soya	L-glutamato	L-Glutaminasa oxidasa	Amperométrico	Hidrogel de poliacrilamida-sulfonato	(Kwong et al., 2000)

Bolsas de té	Polifenoles	Tirosinasa	Amperométrico	Glutaraldehído	(Dall’Orto§ et al., 2005)
Vino	Sulfito	Sulfito oxidasa	Amperométrico	Politiramina	(Situmorang et al., 1999)
Pollo y huevos con cáscara	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Anti-Salmonela anticuerpo	Óptico	Interacciones biotina-avidina	(Valadez et al., 2009)

Un ejemplo es la detección de glutamato en los alimentos, Esta sustancia es un aditivo alimentario muy popular que potencializa el sabor umami y reduce el uso de sal, sin embargo, se ha encontrado que es dañino para el cuerpo humano al inducir daños en altas concentraciones. La deshidrogenasa o glutamato oxidasa es usada como bioreceptor para el desarrollo de los biosensores.

En cuanto a patógenos bacterianos, la *Salmonella sp.* es uno de los patógenos con más altas tasas de contaminación, los biosensores que la detectan son principalmente de naturaleza electroquímica utilizando ADN o anticuerpos como bioreceptores.

También en la producción primaria de alimentos existen fuentes de contaminación, sobre todo las relacionadas a antibióticos, como cloranfenicol, la tetraciclina, la eritromicina, la tetraciclina, las penicilinas, la ampicilina, las quinolonas y las cefalosporinas; al usarse más allá de los niveles permitidos como promotores de crecimiento o masa muscular, dejan residuos en los alimentos que llegan a los consumidores provocando enfermedades, o resistencia a antibióticos. El problema surge con el funcionamiento de los biosensores actuales que no pueden realizar tareas complejas de medición de contaminantes en los alimentos. Ante esta problemática la alternativa consiste en la combinación de biosensores microbianos, de ADN y activación metabólica de toxinas, pero estas técnicas aún no han sido llevadas a su aplicación industrial (Neethirajan et al., 2018).

2.9 Nanomateriales

Los materiales nanométricos han sido ampliamente estudiados y utilizados en los biosensores, principalmente se usan en conjunto como soportes de inmovilización que aportan sus propiedades individuales al Sistema, pero también se usan como amplificadores de señales catalíticas o de conductividad. Sin embargo, no todos son candidatos adecuados.

2.9.1 Nanomateriales de carbono

Este tipo de materiales son usados por su conductividad electrónica, gran área superficial, biocompatibilidad y fácil manipulación. Principalmente son usados como soportes para dispersar otros materiales metálicos o semiconductores y expandir la sinergia electrocatalítica y propiedades optoelectrónicas (L. Liu et al., 2018).

2.9.1.1 Nanotubos de carbono

Presentan cualidades adecuadas para la inmovilización enzimática. Son sintetizados mediante ablación láser, deposición química de vapor y desproporción de monóxido de carbono a alta presión (D.-M. Liu & Dong, 2020).

Existen nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) y de pared múltiple (MWCNTs). Para incrementar sus propiedades típicamente son funcionalizados con otros materiales, como nanopartículas, moléculas orgánicas o polímeros conductores, sin necesidad de utilizar bioreceptores. Un ejemplo es el desarrollo de un biosensor electroquímico no enzimático para la detección de PSA, usando NiCoBP y nanotubos de pared múltiple (Zhang et al., 2014).

2.9.1.2 Grafeno

El grafeno es un material 2D de un solo átomo de carbono de espesor. Su enorme área superficial incrementa la carga de enzimas en la matriz, la resistencia mecánica que posee lo ayuda a aumentar la reutilización de las enzimas y presenta versatilidad en la modificación superficial, características complementadas con su excepcional conductividad eléctrica (D.-M. Liu & Dong, 2020).

Un ejemplo de su uso es el dispositivo desarrollado para imitar la enzima peroxidasa, a partir de óxido de grafeno y nanopartículas de platino; éste posee una capacidad de electrocatálisis y catálisis similar a la enzima (L. Liu et al., 2018).

2.9.2 Nanomateriales metálicos

Las nanopartículas metálicas son de los materiales metálicos más utilizados, principalmente los metales nobles como el oro, plata, paladio, platino y sus aleaciones. Desempeñan varias funciones en el diseño de biosensores electroquímicos, catálisis electroquímica y proceso de transferencia de electrones. Además, son fáciles de sintetizar y funcionalizar (Maduraiveeran & Jin, 2017).

2.9.3 Nanomateriales de óxidos metálicos

Esta clasificación abarca una gran variedad de materiales con diversas aplicaciones. El TiO_2 es un potente fotocatalizador que presenta alta biocompatibilidad y gran área de superficie, haciéndolo adecuado en la inmovilización de enzimas, estudio de actividad catalítica y tratamiento de aguas residuales. Los materiales de ZnO también son biocompatibles, no tóxicos, presentan estabilidad química y son de bajo costo (D.-M. Liu & Dong, 2020). El Fe_3O_4 es un material magnético biocompatible útil en la separación y administración de fármacos.

Su aplicación en biosensores resulta útil para la transducción de señales en dispositivos ópticos, magnéticos y eléctricos, y como elemento de reconocimiento de analitos (B. Liu & Liu, 2019). Por ejemplo, se han desarrollado sensores de gas conductimétricos basados en SnO_2 , In_2O_3 , ZnO , TiO_2 , WO_3 y NiO , para el control ambiental de gases explosivos/tóxicos y compuestos orgánicos volátiles (Maduraiveeran & Jin, 2017).

2.9.4 Hidróxidos metálicos

También llamadas arcillas aniónicas o hidróxidos dobles en capas (LDH) son de fácil preparación y formas variables en las que se pueden combinar sus componentes. Cuentan con porosidad, entorno biocompatible para las enzimas atrapadas por su alto contenido de agua, movilidad del analito, bajo costo y estabilidad química e hidrolítica. Los LDH que contienen materiales de transición (Cobre, Níquel o manganeso) se han propuesto como materiales de recubrimiento de electrodos (Y. Xu et al., 2011).

En los biosensores electroquímicos se usan muy comúnmente como inmovilizadores de enzimas, sobre todo por sus cualidades del entorno de la matriz. Encuentran aplicaciones en la química clínica, diagnóstico médico y análisis de metabolitos de moléculas pequeñas que sirven para dispositivos de biomarcadores moleculares (Asif et al., 2018).

2.9.5 Otros nanomateriales

Otros materiales nanométricos como la polianilina (PANI) son usados en la industria de biosensores. Este material consiste en nanofibras modificadas con bentonita y se han empleado en sensores de gas de sustancias tóxicas como benceno, etanol y tolueno; la detección es posible gracias al efecto de presión de vapor de los analitos y a la formación de interacciones dipolares y deslocalización de electrones π entre el PANI y los gases.

Otro material son los polímeros de impresión molecular (MIP), son materiales poliméricos con alta selectividad de reconocimiento artificial. La selectividad se logra con la síntesis a partir de una plantilla específica a través de sitios de unión no covalentes complementarios basados en interacciones iónicas, hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno. Este material se usa para el reconocimiento de fármacos, pesticidas, péptidos, azúcares, compuestos orgánicos, virus, eritrocitos e inmunoglobinas.

Esta es una estrategia directa para permitir que los químicos analíticos produzcan polímeros sintéticos, que son selectivos hacia una plantilla específica a través de sitios de unión no covalentes complementarios. Esto se basa principalmente en interacciones iónicas, hidrofóbicas o de enlaces de hidrógeno [89]. Los sensores electroquímicos basados en MIP se pueden emplear para la detección de una amplia gama de analitos, incluidos fármacos, pesticidas, péptidos, azúcares, compuestos orgánicos, virus, eritrocitos e inmunoglobulinas (Maduraiveeran & Jin, 2017).

2.10 Ventajas de los nanomateriales como matrices de inmovilización

El principal interés en de la participación de nanomateriales en esta área está en su uso como soportes con matrices biocompatibles y entornos inertes que ayuden a la inmovilización enzimática. Las estrategias descritas anteriormente (absorción, acoplamiento covalente, atrapamiento y encapsulación) también sirven con materiales a escalas nanométricas. A comparación de los materiales macro, los nanomateriales aportan características únicas a este propósito, pero, estas características dependen también del tipo de nanomaterial usado.

Algunos materiales tienen una mayor área superficial que mejora la relación volumétrica; por ejemplo, las nanofibras tienen dos tercios de la relación superficie: volumen sobre las nanopartículas casi esféricas. Al contrario, las nanopartículas son más fáciles de manejar y ofrecen mayor flexibilidad en el diseño de dispositivos (Gupta et al., 2011).

El inconveniente del uso de materiales nanométricos es el efecto que ejercen sobre la estabilidad enzimática; algunos estudios han demostrado que el uso incorrecto de ellos puede provocar inestabilidad y actividad reducida de las enzimas (Sharifi et al., 2020).

2.10.1 Nanopartículas

Se han estudiado a las nanopartículas de origen orgánico e inorgánico como soportes para la inmovilización de enzimas. La principal ventaja que presentan frente a otros materiales es su capacidad para minimizar las limitaciones de difusión; además de proporcionar una alta retención de la actividad catalítica al exponer más ampliamente los sitios activos de la enzima con los sustratos, de manera que las moléculas de enzima se adhieran a la superficie de las partículas no porosas. (Zdarta et al., 2018)

En general se pueden vincular nanopartículas a enzimas mediante 4 enfoques principales: unión covalente del ligando de la nanopartícula, absorción electrostática, conjugación usando la afinidad de proteínas y conjugación directa a la superficie de la nanopartícula (Sharifi et al., 2020).

Las características de las nanopartículas ayudan a generar movimiento Browniano cuando se encuentran en dispersión acuosa, ayudan a reducir el despliegue de proteínas y mejoran la estabilidad y rendimiento (Khoobi et al., 2015).

2.10.1.1 Efecto del Tamaño de partícula

Los efectos específicos de usar una matriz nano son el aumento de relación superficie-volumen, menor resistencia a la transferencia de masa, menor difusión y resistencia. Una posible desventaja es el efecto en la estabilidad de las enzimas cargadas, ya que las enzimas pueden deformarse para lograr el máximo contacto con la superficie de nanopartícula y cambiar su actividad negativamente (Sharifi et al., 2020).

Este efecto se demostró con algunos estudios, por ejemplo, el uso de nanopartículas de TiO₂ (60 nm de tamaño) alteró la estructura de lisozimas por la acidez y fuerza iónica del medio (Z. Xu et al., 2010). En otra investigación se encontró que la quimotripsina mostró un cambio del 40% en su estructura secundaria y una reducción del 86% en la actividad enzimática al aumentar la cantidad de Au NPs en la matriz (Gagner et al., 2011).

2.10.1.2 Efecto de la Morfología

Las propiedades morfológicas de las NPs son determinantes en la estabilidad enzimática. Un estudio demostró que al cambiar nanocristales de ZNO de nanoesferas a pods y discos se obtuvo una mejora en la capacidad de carga y estabilidad de la peroxidasa empleada. Lo mismo pasó con nanopartículas de oro, que contenían lisozimas, al cambiar su

morfología de esfera a bastón (Gagner et al., 2011).

En otro estudio, al cambiar el portador magnético de un sistema no mesoporoso a mesoporoso, se aumentó 30 veces la carga de la enzima uroquinasa y su estabilidad (Lata et al., 2015).

2.10.1.3 Comportamiento de agregación

Una característica muy común de estos elementos es su tendencia a la aglomeración, este comportamiento se produce tanto en las nanopartículas orgánicas como las no inorgánicas. La agregación en entornos de consumo o reactores de fermentación afecta fuertemente la estabilidad y actividad de las enzimas; es por esta razón que algunas investigaciones han encontrado que a pesar de obtener una mayor estabilidad enzimática la actividad se ve reducida en comparación de la enzima en su estado libre (Sharifi et al., 2020).

2.10.1.4 Efecto de otras características físicas

Además de la agregación, las características físicas mejoradas, como difusión y movilidad, pueden afectar la actividad catalítica enzimática. Otras características físicas que ayudan a la aplicación de biosensores son la estabilidad térmica y resistencia a la radiación (García et al., 2016).

2.11 Propiedades de la plata

La plata metálica (Ag) es un elemento de transición duradero; a nivel macro se ha utilizado durante mucho tiempo para joyería y como elemento antimicrobiano.

- **Conductividad:** La plata pura tiene una gran conductividad térmica y eléctrica, siendo una opción popular en el campo de la electrónica. A nivel nano conserva estas propiedades que se han utilizado para fabricar electrodos de transistores de película delgada, pastas y tintas para placas de circuitos impresos, como dispositivos de almacenamiento de datos, materiales de intercalación a base de baterías y en la optoelectrónica (Yu et al., 2013).
- **Área superficial:** Poseen una gran superficie en virtud de su tamaño, lo que les ofrece más sitios reactivos, característica que hace a las nanopartículas un material deseable en la catálisis. Son capaces de catalizar reacciones como la oxidación de CO y benceno, reducción de nitrofenol en presencia de NaBH₄, reducción de rodamina B y reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol (Yu et al., 2013).
- **Óptico:** A diferencia de la plata a nivel macro, las nanopartículas de plata presentan una interacción fuerte y específica con la radiación electromagnética. Al estar dispersos son coloreados intensamente, este color depende del tamaño de las partículas y difiere en luz dispersada y transmitida. Sus espectros de absorción y dispersión (de partículas superiores a 2nm) presentan una banda ancha e intensa en el rango visible o en los rangos adyacentes de IR cercano y UV, dicha banda es

denominada banda de plasmones superficiales, y específicamente en la plata tiene una mayor intensidad de banda (Krutyakov et al., 2008).

- **Antibacteriano:** Estas propiedades son conocidas desde hace mucho tiempo. Pueden ser seguras para las células pequeñas concentraciones de plata que para la mayoría de bacterias y virus son letales. Por ello, se usan ampliamente en la desinfección del agua y alimentos o para control de infecciones médicas. El tamaño de las nanopartículas amplifica esta característica al proporcionar un mayor contacto con el medio ambiente y ser capaces de penetrar las membranas celulares (Krutyakov et al., 2008).

ANTECEDENTES

3.1 Métodos de detección

Existen diversos métodos para la detección de residuos de antibióticos en alimentos, los primeros fueron biológicos, que se siguen utilizando en la actualidad. Sin embargo, los microorganismos usados en esta técnica pueden ser sensibles a más de un antibiótico, característica que conlleva a baja selectividad y la consecuente búsqueda de nuevas técnicas más específicas que permitan realizar cuantificaciones selectivas y precisas.

En general, al representar una matriz altamente compleja, el procedimiento de análisis de residuos en miel debe hacerse en varias etapas: 1) acondicionamiento de la muestra (filtración y preparación); 2) extracción de los analitos; 3) purificación del extracto; 4) identificación y cuantificación de los analitos y 5) confirmación del análisis (Dieguez et al., 2002).

3.1.1 Microbiológico

Su funcionamiento se basa en la inhibición del crecimiento microbiano, usando una cepa indicadora, en presencia del antibiótico objetivo en las muestras analizadas; esto a niveles superiores al umbral de sensibilidad del test. La cuantificación resulta del diámetro del halo de inhibición formado. Se ha demostrado en diversas referencias que los mejores resultados se dan con el uso de la cepa *B. cereus*.

La desventaja que presenta este tipo de ensayo es su falta de selectividad debido a que los microorganismos utilizados son sensibles a más de un antibiótico. También existe un efecto inhibitorio natural de la miel (varía según el tipo) que impide la confianza en los resultados a concentraciones relativamente bajas, lo que eleva los límites de cuantificación (Dieguez et al., 2002).

3.1.2 Cromatografía de alta resolución

Es el método más utilizado para la detección de OTC, ya que ofrece selectividad adecuada y un bajo límite de cuantificación (Z. Xu et al., 2016). La desventaja de esta técnica es que se requieren una serie de pasos previos para la extracción de la molécula de interés a partir de su matriz biológica (Dieguez et al., 2002). También presenta dificultades asociadas a la interferencia de silanoles y metales traza presentes en el material de envase (Casado-Terrones et al., 2007), y requiere personal e instrumentación especializados (Z. Xu et al., 2016).

El proceso para la detección es el siguiente: 1) se prepararan soluciones de oxitetraciclina, cantidades estándar de trabajo, a partir de la solución estándar madre con la fase móvil, 2) se

inyectan alícuotas de cada solución en la columna por triplicado, 3) la fase móvil se bombardea desde el depósito de disolvente hasta la columna, registrando picos a cierta longitud de onda; la curva de linealidad se construye graficando el área del pico frente a concentración de oxitetraciclina, 4) a partir de la curva, la concentración incógnita se lee del gráfico de calibración o se calcula a partir de la ecuación de regresión derivada, utilizando los datos de concentración del área del pico medio (Chilumuru Rama et al., 2015)..

Este proceso es combinado con otros métodos como el ultravioleta-visible o espectrometría para la cuantificación del antibiótico.

3.1.3 Cromatografía líquida con espectrometría de masas

Sigue el mismo proceso descrito anteriormente: se hace la extracción de la oxitetraciclina y posteriormente se usan las técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas para la cuantificación. Esta combinación ha mostrado una buena precisión y robustez (Gunes et al., 2009).

La técnica funciona a partir de la llegada de los iones al detector, generando una señal eléctrica que es ampliada, procesada y registrada en un computador; después, la espectrometría de masas representa gráficamente los iones detectados en su relación masa-carga (Brajovic, 2020).

3.1.4 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Elisa)

Esta prueba se basa en anticuerpos de tetraciclina a los que se añade tetraciclina marcada con peroxidasa de rábano picante y oxitetraciclina. Después la oxitetraciclina y el conjugado competirán por los sitios de unión de los anticuerpos específicos.

Existen kits que incluye el procedimiento exacto descrito por el fabricante; la presencia de antibióticos y reactivos específicos, que incluye el kit, provoca un cambio de coloración que puede analizarse con espectrofotometría (Mahmoudi, Moosavy, et al., 2014).

3.1.5 Sonda fluorescente

Consta de una sonda fluorescente basada en colorante BODIPY (boro-dipirrometano) para carboxilo hidrófilo. La fluorescencia presente en el material se apaga con oxitetraciclina, por lo que es cuantificable.

Los estudios de este método de detección son recientes (Z. Xu et al., 2016) pero se ha mostraron que en condiciones óptimas tiene un amplio rango lineal, bajo límite de detección y buena precisión. La desventaja que presenta es que se ve afectado fácilmente por el pH, por lo que no es propicio para cuantificar OTC en alimentos, un aptámero modificado para evitar esta interferencia podría resultar efectivo, pero a la vez muy costoso.

3.1.6 Electroforesis capilar (EC)

Es una técnica que permite la separación y cuantificación de una amplia gama de analitos, como las proteínas, iones, péptidos, carbohidratos, esteroides, ácidos nucleicos, vitaminas, fármacos, células, entre otras.

Al combinar diversos elementos de otras técnicas analíticas presenta ventajas tales como alta eficiencia y resolución, automatización completa, variedad de compatibilidad y bajo consumo de muestra y solvente en comparación con HPLC (Casado-Terrones et al., 2007).

Utiliza detectores de alta sensibilidad y capilares de sílice fundida SiO₂. Ha ganado importancia en el análisis analítico, pero no hay muchos estudios de detección de OTC en miel (Chopin, 2012).

3.2 Límites de cuantificación

Un factor determinante para el buen funcionamiento de una técnica de detección es el valor mínimo de cuantificación de antibiótico capaz de detectar, este nos indica cuál es la concentración más baja de analito que puede detectar el método empleado. En la **tabla 3.1** se recolectaron valores de las diferentes técnicas descritas en esta sección.

Tabla 3.1

Métodos de detección de oxitetraciclina en miel de abeja.

Método de detección	Ventajas	Desventajas	Límite de detección	Referencia
Microbiológico	Ampliamente conocida	Falta de selectividad, efecto inhibitorio de la miel.	0.4 µg/ g miel	(Dieguez et al., 2002)
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector UV	Comúnmente usada, selectividad adecuada, bajo límite de cuantificación	Personal e instrumentación especializados que aumenta costo y complejidad.	0.05 µg/g miel	(Dieguez et al., 2002)
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Elisa)	Buena selectividad, existencia de kits especializados.	Requiere técnica de extracción y medición final en espectrofotómetro. Su alta sensibilidad puede arrojar falsos positivos.	5.3 ng/g miel	(Mahmou di, Moosavy, et al., 2014)

Cromatografía líquida con Espectrometría de masas	Precisión y robustez	Personal e instrumentación especializados que aumenta el costo y complejidad.	10 ng/g miel	(Gunes et al., 2009)
Sonda fluorescente	Amplio rango lineal, bajo límite de detección, buena precisión.	Aún no es de uso común, afectado fácilmente por el pH.	0.72 μ M	(Gunes et al., 2009)
Electroforesis Capilar	Alta eficiencia y resolución, automatización completa, variedad de compatibilidad y bajo consumo de muestra y solvente en comparación con HPLC.	Falta de estudios en detección de OTC en miel.	10–40 mg/L miel	(Casado-Terrones et al., 2007)

3.3 Función de las nanopartículas en sensores electroquímicos

Las características de las nanopartículas descritas en la subsección anterior han demostrado una de las principales aplicaciones de nanopartículas en biosensores: la inmovilización de biomoléculas. Pero también existen otras 4 aplicaciones de estos nanomateriales en el desarrollo de sensores electroquímicos (**tabla 3.2**) (Luo et al., 2006).

Tabla 3.2

Diferentes funciones de las nanopartículas en sensores electroquímicos.

Función	Propiedad usada	Nanopartículas comunes	Ejemplo	Referencia
Catálisis de reacciones	Gran superficie energética	Metálicas (Au, Ag)	Sensor de peróxido basado en NPs de azul de Prusia.	(Fiorito et al., 2005)
Transferencia de electrones	Conductividad y dimensiones pequeñas	Metálicas (Au, Ag) y Óxidos (SiO ₂ , ZrO ₂)	NPs de oro como “nanoenchufe eléctrico” de enzimas con soporte.	(Xiao et al., 2003)

Etiquetado de biomoléculas	Tamaño pequeño, funcionalización	Semiconductores (CdS, PbS) y metálicas (Au, Ag)	DNA sensor con etiquetas de Ag NPs.	(Cai et al., 2002)
Reactivo	Actividad química	Óxidos (MnO ₂)	Biosensor de lactato con MnO ₂ .	(J.-J. Xu et al., 2005)

- **Catálisis de reacciones electroquímicas:** Algunas nanopartículas, especialmente las metálicas, tienen excelentes propiedades catalíticas. Las ventajas de utilizarlas son la posible reducción de sobrepotenciales y reversibilidad de reacciones redox que son irreversibles en electrodos no modificados.
- **Mejora de la transferencia de electrones:** Para la construcción de electrodos enzimáticos de tercera generación es común el uso de materiales que permitan el contacto eléctrico de enzimas oxido reductoras con los electrodos; por sí mismas no es posible debido a que los centros activos de las enzimas están rodeados de capas gruesas de proteínas aislantes. Para mejorar la transferencia de electrones, las propiedades conductivas de las nanopartículas ayudan a actuar como mediadores o “cables eléctricos” que hagan esta transferencia.
- **Etiquetado de biomolécula:** Los sensores electroquímicos que usan biomoléculas (antígenos, ADN y anticuerpos) etiquetadas con nanopartículas pueden retener su bioactividad e interactuar en base a la detección electroquímica de las partículas; gracias a ello es posible medir la cantidad o concentración del analito. El material más comúnmente usado es el oro, pero también existe la posibilidad de usar plata u otras nanopartículas metálicas tipo core-shell.
- **Nanopartículas actuando como reactivo:** Debido a su alta energía superficial, a diferencia de los materiales a escala macro, las nanopartículas son normalmente más activas químicamente. La aplicación de esta reactividad no ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, puede ser muy útil para el desarrollo de sensores electroquímicos (Luo et al., 2006).

3.4 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de metales nobles se han estudiado en el diseño y construcción de biosensores enzimáticos por sus características distinguibles, como alta energía superficial y relación superficie/volumen, capacidad para disminuir la distancia entre proteínas y partículas metálicas y buena estabilidad mecánica, térmica y química. (Karim et al., 2016) Entre las nanopartículas de esta clasificación, las de plata han recibido atención, ya que no sólo poseen las características generales de nanopartículas de metales nobles, si no que tienen propiedades únicas: alta conductividad eléctrica, excelente actividad biocatalítica, baja toxicidad (Baghayeri et al., 2016), estructura resistente a contaminaciones microbianas,

versatilidad de métodos de síntesis y menor costo que las de oro.

Junto con las nanopartículas de oro, las de plata tienen una amplia gama de aplicaciones en la inmovilización de ácidos nucleicos, administración de fármacos, biosensores e inmunoensayos (Sanjana et al., 2019). Karim demostró que la baja concentración de Ag-NP mejora la actividad catalítica de la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (Karim et al., 2012). Generalmente se incorporan a otras matrices como óxidos metálicos, redes de silicatos, polímeros, grafeno, fibras, dendrímeros, etc., para mejorar la estabilidad y con ello extender su rendimiento (Maduraiveeran & Jin, 2017). Pero, el rendimiento de detección dependerá de la distribución, tamaño y forma de las nanopartículas en la superficie del electrodo.

En los últimos años se han realizado aplicaciones en el diseño de métodos analíticos para la seguridad alimentaria y el control ambiental en la detección de contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos (J. V. Kumar et al., 2016). En el área de alimentos y medioambiental, un sistema de biosensores electroquímicos para la detección de Hg_2^+ , la plataforma consistió en Ag NPs con ADN extendido con desoxinucleotidiltransferasa (Li et al., 2016). Otro desarrollo consistió en el uso de nanoplacas de Ag NPs para diseñar un sistema microfluídico basado en papel (μ PAD) acoplado con electroquímica dual y colorimétrica para la detección de iones de plomo, cadmio y cobre (Chaiyo et al., 2016).

Por otro lado, en el campo de análisis clínicos, el grupo Compton desarrolló una técnica electroquímica con etiquetas de nanopartículas de plata para la detección rápida del virus de influenza; este método se basó en la absorción de las nanopartículas en la superficie del virus y posterior registro de los picos de corriente de la correspondiente oxidación de las nanopartículas en el virus (Sepunaru et al., 2016). Otra vertiente es el uso de inmunosensores, estos son dispositivos combinan la electroquímica y los inmunoensayos para obtener una respuesta rápida, alta sensibilidad y especificidad. Zeng y su equipo desarrollaron un inmunosensor para la detección del virus de la influenza aviar H7 (AIV H7), utilizando nanopartículas de plata y grafeno como marcadores lograron un sensor con un límite de detección de 1,6 pg/ml que potencialmente puede emplearse para detectar otros organismos patógenos (Huang et al., 2016).

3.4.1 Síntesis de nanopartículas.

Como ya se ha mencionado antes, la forma, tamaño, estabilidad y propiedades (físicas y químicas) de las nanopartículas están ampliamente relacionadas al método de preparación, interacción con los estabilizadores e inductores que lo rodean, velocidad de reacción y en general a las condiciones experimentales (Khodashenas & Ghorbani, 2019).

Las nanopartículas pueden ser sintetizadas de dos formas: 1) “top-down”, cuando el punto de partida es una gran parte del material que se reduce; y 2) “bottom-up”, en este paso las nanopartículas crecen durante la síntesis de la solución y ocurre mediante 3 pasos: nucleación, siembra y crecimiento (Khodashenas & Ghorbani, 2019).

El método de reducción química es un método “bottom-up”, es ampliamente usado por su relativa facilidad y porque permite controlar el tamaño y forma de los productos. En esta

categoría, la síntesis más común consiste en la reducción de sales de plata con borohidruro de sodio. Esto se debe a la reactividad alta del borohidruro (en comparación de carbohidratos y citratos), manejabilidad y menor toxicidad a hidracina e hidroxilamina. El crecimiento de partículas se debe a la reducción de iones en la superficie de los grupos formados, por lo que la agregación de ellos es una manera de incrementar la formación de partículas coloidales (Krutuyakov et al., 2008).

En muchas aplicaciones, como los biosensores, las nanopartículas producidas deben estabilizarse, dado que la sensibilidad y estabilidad de los electrodos usados se relacionan con la dispersión y prevención de aglomeración de nanopartículas en las matrices. Esto se logra maximizando la repulsión electrostática entre partículas mediante agentes protectores (como aniones de borohidruro o citrato) y usando pequeñas concentraciones de precursores metálicos para reducir la colisión de las nanopartículas en crecimiento (Gakiya-Teruya et al., 2018). Por ejemplo, Maduraiveeran et al. desarrollaron biosensores amperométricos con nanopartículas tipo coreshell de coraza de silicato para su estabilización (Maduraiveeran & Ramaraj, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Síntesis de nanopartículas de plata.

La primera etapa consistió en la síntesis de las nanopartículas de plata utilizando el método de reducción química de nitrato de plata (AgNO_3) con borohidruro de sodio (NaBH_4) en presencia de iones citrato, los cuales actúan como recubrimiento de las nanopartículas y las estabiliza mediante repulsión electrostática. La preparación de las nanopartículas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Xu et al. con algunas modificaciones (**Fig. 3.1**) (S. Xu et al., 2019).

En un matraz aforado de 1 litro se disolvieron 0.68 g de AgNO_3 y 1 g de citrato de sodio en agua ultrapura, para posteriormente dejar reposar la solución en baño de hielo. La mezcla se mantuvo en agitación vigorosa y se añadieron, gota a gota, 15 mL de una solución de NaBH_4 sin detener la agitación. El color final del producto resultó café oscuro. Después de 2 horas de agitación constante en oscuridad se recolectó el precipitado por medio de centrifugación. Las nanopartículas sólidas se caracterizaron usando espectroscopía electrónica de barrido (SEM).

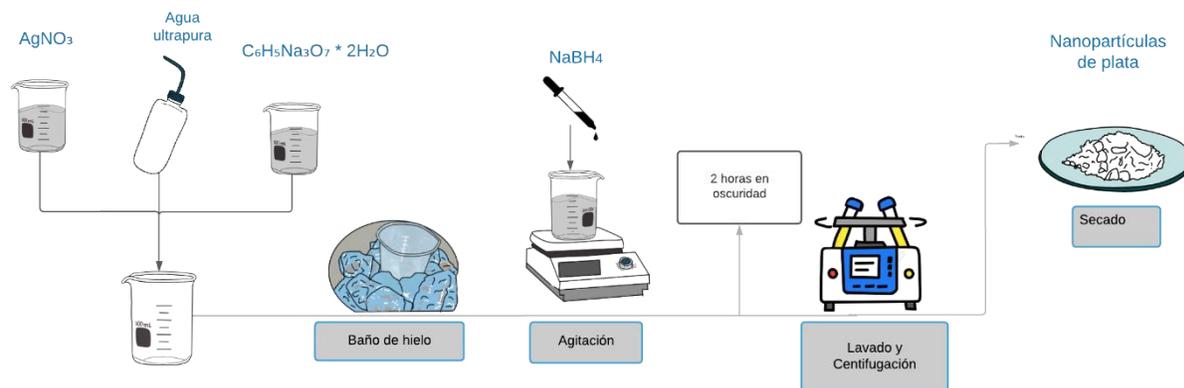


Figura 4.1: Síntesis de nanopartículas de plata por método químico

4.2 Ensayo de actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro. Consiste en la determinación de la velocidad espectrofotométrica de la oxidación de o-Dianisidina catalizada por peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (Fig. 4.2), la cual es absorbida una longitud de onda de 500nm. Los ensayos se llevaron a cabo a diferentes

pH y temperaturas para obtener el valor óptimo en el que la enzima trabaja en estado libre y posteriormente comparar los valores con el sistema de enzima inmovilizada.



Figura 4.2: Reacción de o-Dianisidina con HRP en presencia de H₂O₂.

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en Merck para ensayos enzimáticos con cambio de pH y temperatura (KGaA, 2021). Se prepararon los siguientes reactivos (**Fig. 4.3**):

- Buffer fosfatos (K₂HPO₄) 0.1M, diferentes pH a temperatura ambiente. Se preparó en agua destilada y se ajustaron los pH con KOH y HCL 1M.
- Solución de o-dianisidina. Se preparó 0.5 mL de solución de 10g de o-dianisidina por cada mL de agua desionizada.
- Solución de peroxidasa. La peroxidasa fue disuelta en agua desionizada para obtener 0.5 mL con concentración de 100 unidades de piroganol/mL
- Solución Coctel. Se añadieron 0.5 mL de o-Dianisidina a 40 mL de buffer aun matraz de 50 m, posteriormente se ajustó el pH y temperatura y se aforó a 50mL con buffer.

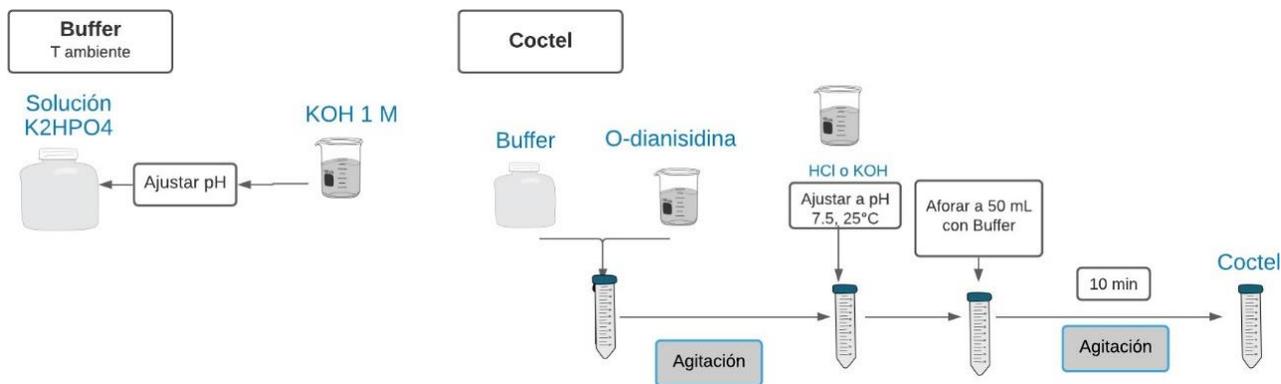


Figura 4.3: Preparación de Buffer y coctel de peroxidasa.

Para la prueba con cambio de pH (**Fig. 4.4**), se ajustó el tampón de fosfato para cada uno de los 12 diferentes valores utilizados, de 2 a 7.5 unidades variando media unidad, a temperatura ambiente. En cuanto a la prueba con cambio de temperatura (**Fig. 4.5**), las soluciones se ajustaron al pH óptimo (obtenido de la prueba anterior) y se modificó su temperatura a 15, 25, 35, 45, 55 y 65°C.

Se realizaron ambas pruebas, por triplicado, con una mezcla de:

- 1,5 ml solución de cóctel:
- 10,0 mg/ml de o-Dianisidina diluida a 50 ml con tampón fosfato.

- 0,055 ml solución de enzima peroxidasa de 100 unidades de piroganol/ ml de agua ultrapura.
- 0,1 ml de solución de peróxido (0,027 % v/v)

Finalmente se midió la absorbancia de cada solución a 500 nm de longitud.

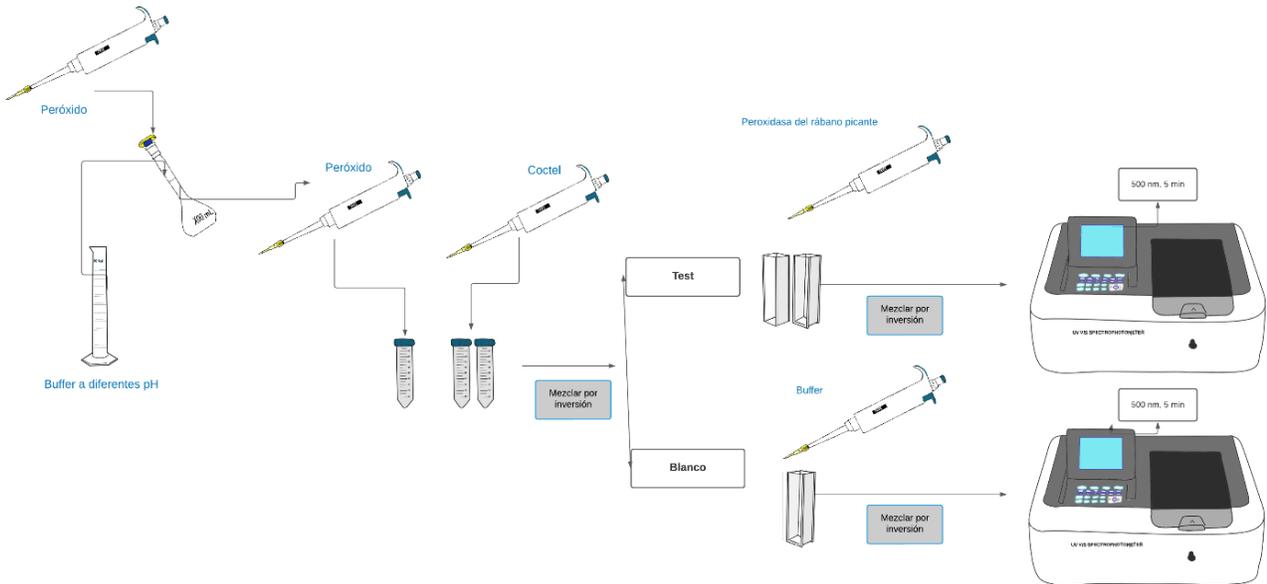


Figura 4.4: Ensayo enzimático con cambio de pH

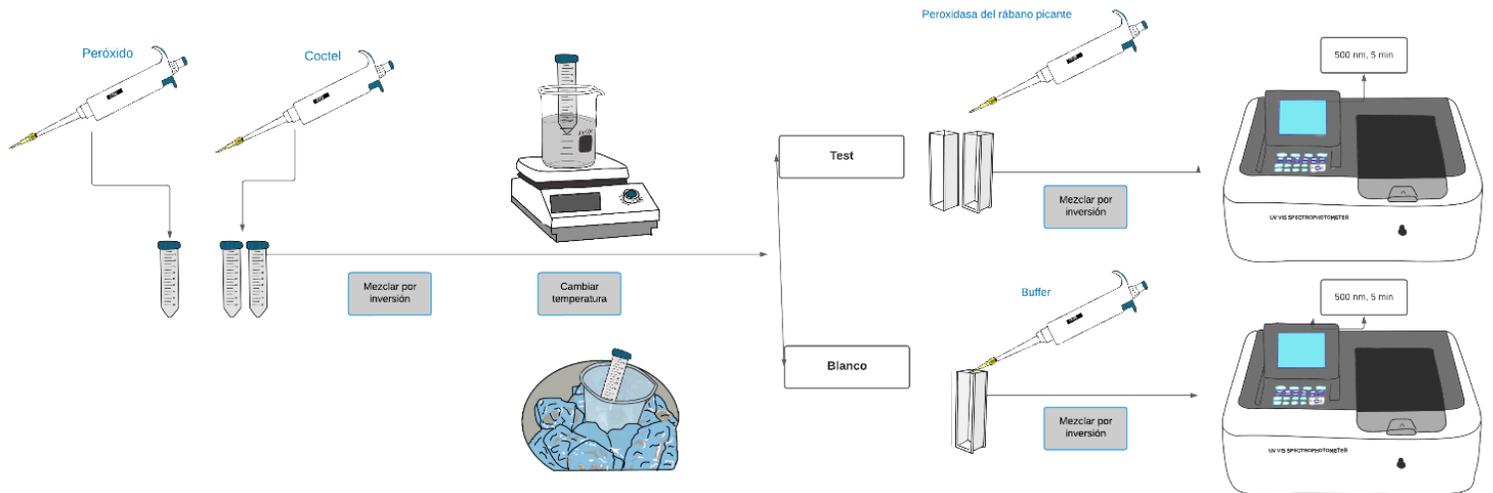


Figura 4.5: Ensayo enzimático con cambio de temperatura

4.3 Inmovilización de peroxidasa en nanopartículas de plata y fabricación de electrodos.

Esta etapa se basa en la inmovilización de la enzima peroxidasa del rábano picante (comercial) mediante enlaces covalentes. Este método implica el uso de nafiión, este polímero es modificado con bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) para la formación de enlaces que permitan la inmovilización. Ésta se lleva a cabo cuando los cationes del amonio cuaternario del TBAB reemplazando los protones del nafiión y a su vez contrarrestan los grupos sulfonato (Mani et al., 2021).

Para ello, se puso a agregar 1 mg de las Ag-NPs, 20 mg de carbón vulcan, 189 μL de nafiión, 5 mg de TBAB, y 300 μL de buffer fosfato, durante un periodo de tiempo establecido para que ocurran las interacciones necesarias para formación de enlaces de las enzimas en la matriz del soporte. Esto bajo las condiciones de pH y temperatura ideales obtenidas en los ensayos de actividad del capítulo 4.2.

La mezcla se homogeneizó usando un baño de ultrasonido durante 20 minutos; terminado este tiempo se agregó la enzima disuelta (1mg/200 μL de buffer) y se agitó todo el sistema usando un vortex durante 60 segundos. Utilizando un electrodo de carbón vítreo (GCE), la tinta resultante de la inmovilización se depositó en la superficie (3 mm de diámetro) y se dejó secar. El electrodo de referencia usado es un electrodo Ag|AgCl saturado con KCl. Este proceso se ilustra en el esquema de la **Fig 4.6**.

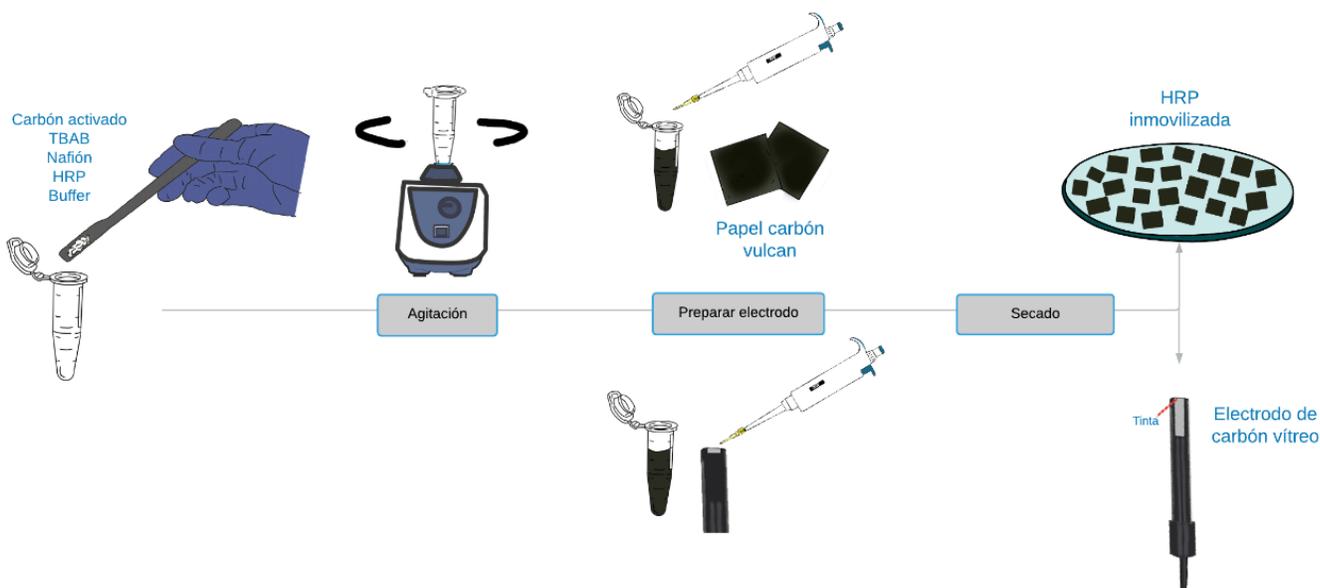


Figura 4.6: Inmovilización enzimática.

Para los ensayos enzimáticos se utilizó papel carbón como matriz de soporte de la tinta catalítica, siguiendo el mismo procedimiento anterior se depositó la mezcla homogeneizada sobre cuadros de papel carbón de 0.5cm*0.5cm y se dejó secar para la formación de los electrodos.

4.4 Caracterización de electrodos.

4.4.1 Prueba de acoplamiento

Con el fin de determinar la cantidad de nanopartículas de plata y tiempo de absorción ideales para la inmovilización de enzima, se llevó a cabo una prueba de acoplamiento basada en el método de Lowry.

El método consiste en una reacción de 2 pasos que combina la reacción de Biuret con el reactivo Folin: 1) primero se lleva a cabo la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} en una solución alcalina; donde se forma un complejo entre el nitrógeno presente en las proteínas y el cobre; 2) posteriormente, la adición de reactivo de Folin forma un complejo de color azul oscuro, por la reducción de este último debido a la presencia de grupos fenoles (residuos de tirosina y triptófano de las enzimas). Esta reacción es medida por espectrofotometría UV-Vis (Lowry et al., 1951).

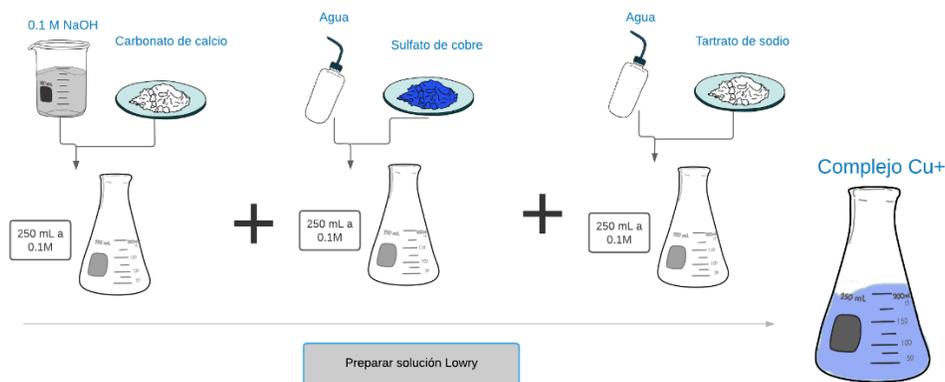


Figura 4.7: síntesis de solución de carbonato-tartrato-cobre.

En un matraz se añadieron 250 mL de una solución de carbonato de calcio 0.1M disuelta en hidróxido de sodio 0.1M, 250 mL de sulfato de cobre 0.1 disuelto en agua y 250 mL de solución de tartrato de sodio 0.1M (**Fig. 4.7**).

De esta solución se agregaron volúmenes fijos (1.5 mL) a diferentes tubos de ensayo. En la primera prueba (triplicado) se añadió 25 μL de enzima disuelta en buffer (1mg/mL, pH 7 y temperatura ambiente), junto con la solución de carbonato-tartrato-cobre y 500 μL de solución de reactivo folin disuelto en agua (50% v/v). Después se agitó la solución y se mantuvo en temperatura ambiente por 10 min; pasado este tiempo se obtuvo la absorbancia de las soluciones usando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

Las siguientes pruebas se realizaron siguiendo el mismo proceso, exceptuando la adición de un electrodo de papel carbón con la enzima inmovilizada en nanopartículas (sintetizado en el capítulo 4.3). Cada 5 minutos se tomó la alícuota de enzima disuelta para realizar el procedimiento (**Fig. 4.8**).

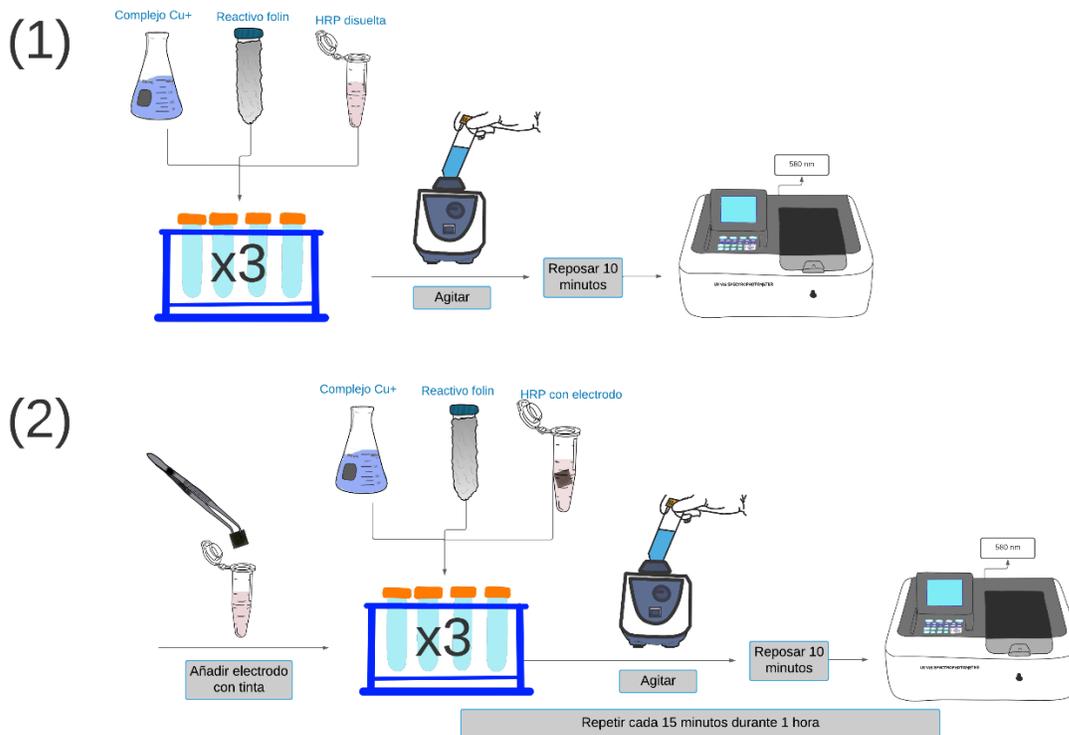


Figura 4.8: Prueba de acoplamiento.

4.4.2 Electroquímica

4.4.1.1 Comportamiento de Oxitetraciclina con diferentes electrodos.

La detección electroquímica en la que se basa el electrodo consiste en la oxidación del grupo funcional fenólico de la oxitetraciclina usando la enzima HRP en presencia de peróxido. Ya que, de acuerdo a la bibliografía consultada, la presencia de oxitetraciclina se observa con un pico en la corriente de oxidación en el rango de 0.8-0.85 V (Ghodsi et al., 2015).

Para comparar la respuesta del electrodo modificado, se realizaron pruebas de voltamperometría cíclica y de pulso diferencial con soluciones de tampón de fosfato y oxitetraciclina disuelta (concentración 0,028 mg/ml) usando otros 2 electrodos incompletos.

El electrodo de trabajo se modificó con: 1) la tinta catalítica sintetizada en la sección 4.3, 2) una tinta hecha con únicamente Ag NPs (20 mg de carbón vulcan, 5 mg de TBAB y 1 mg de nanopartículas), 3) y otra con la enzima en estado libre (20 mg de carbón vulcan, 5 mg de TBAB y 1 mg de peroxidasa del rábano picante). Los 3 electrodos se estudiaron usando mediciones DPV y CV, con la adición 10 μ L de H₂O₂ en las soluciones a pH 7 y temperatura ambiente.

4.5 Ensayo de actividad enzimática

El pH óptimo de una enzima inmovilizada puede cambiar 1 o 2 unidades comparada a cuando se encuentra en estado libre. Por ello, para conocer los valores correspondientes a la HRP

inmovilizada se realizaron pruebas de respuesta fotométrica en función del cambio de pH, en un rango de 2 a 8.

Se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.2, utilizando los electrodos de papel carbón con el sistema de enzima inmovilizada con nanopartículas (Fig. 4.9).

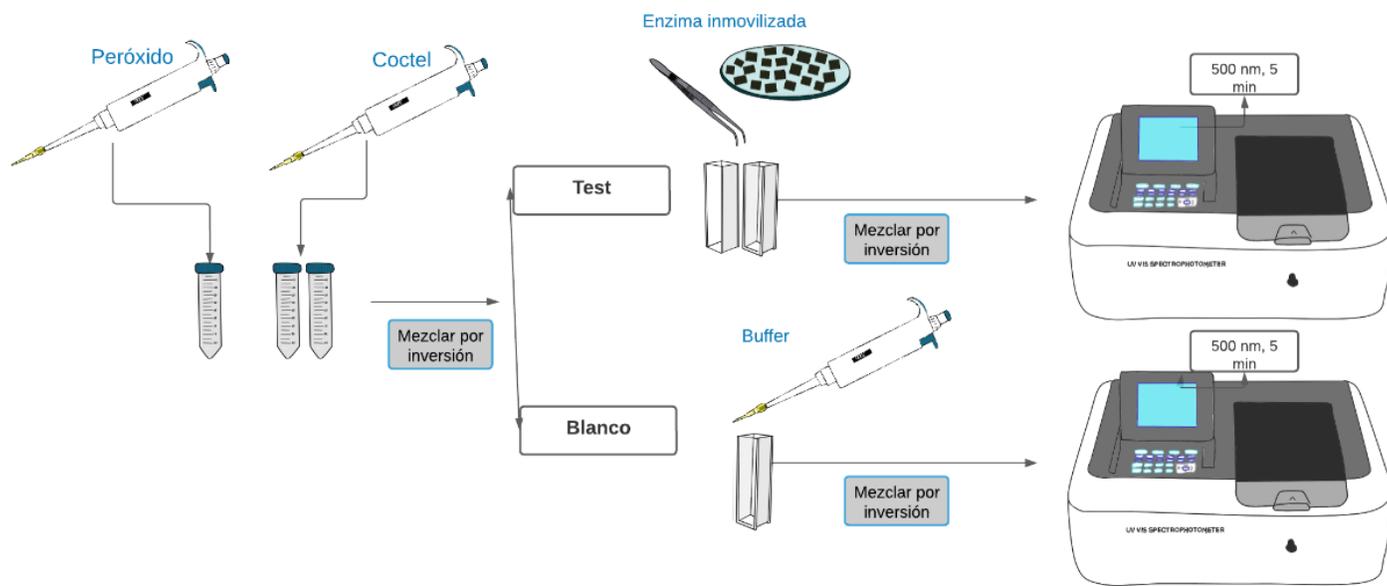


Figura 4.9: Ensayo enzimático con enzima inmovilizada

4.6 Optimización de H₂O₂

El peróxido de hidrógeno es usado en todas las pruebas biológicas y electroquímicas al ser parte fundamental del proceso catalítico de la peroxidasa. Para calcular la concentración óptima de su uso en la reacción del electrodo y la solución de OTC, sin que llegue a afectar la actividad enzimática de la HRP, se empleó una prueba ensayo enzimático similar a la descrita en la sección 4.2, variando la concentración de peróxido de 0.09% reduciéndolo a la mitad hasta llegar a 0.00015625%.

4.7 Detección de oxitetraciclina en Buffer fosfato

La aplicación del electrodo inmovilizado se realizó con el estudio mediante DPV y CV de diferentes soluciones de oxitetraciclina en buffer fosfato, en un rango de concentración basado en los diversos valores encontrados en mieles comerciales de acuerdo a la bibliografía consultada (Sporns et al., 1986) (Roth et al., 1986) (Z. Xu et al., 2016) (Mahmoudi, et al., 2014) (Z. Xu et al., 2016)(Chilumuru Rama et al., 2015).

El método consiste en la peroxidasa que actúa como electrocatalizador que se activa con el peróxido presente en la solución. La peroxidasa oxidada puede a su vez oxidar a la oxitetraciclina; posteriormente la enzima (ya reducida) se volverá a oxidar en la superficie del electrodo. Esta reacción provocará un pico de corriente proporcional a la concentración

de OTC en la solución (Yang et al., 2006). Este proceso sucederá siempre y cuando el peróxido no sea un reactivo limitante. El electrodo de carbón vítreo modificado usado como sensor resulta en un sistema similar al mostrado en la **Fig. 4.10**.

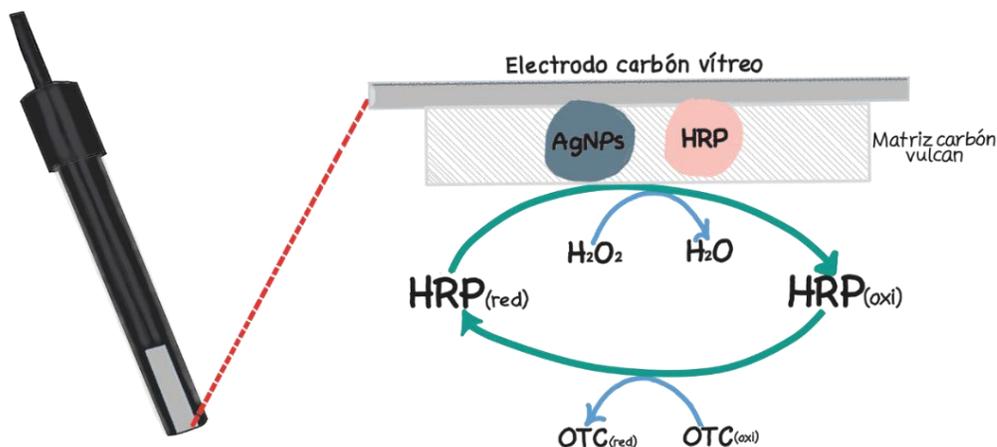


Figura 4.10: Electrodo de carbón vítreo modificado con HRP inmovilizada en nanopartículas de plata sobre carbón vulcan para detección de OTC.

La voltamperometría cíclica (CV) se realizó en un rango de 0 a 1V a una velocidad de exploración de 25 mV/s. Para la correlación de corriente de oxidación contra la cantidad de OTC en la muestra, se realizaron diferentes soluciones con la adición de OTC a buffer fosfato medidas con voltamperometría de pulso diferencial (DPV) en un rango de potencial de 0 a 1.2 V, a una velocidad de exploración de 25 mV/s y amplitud de pulso de 100 mV.

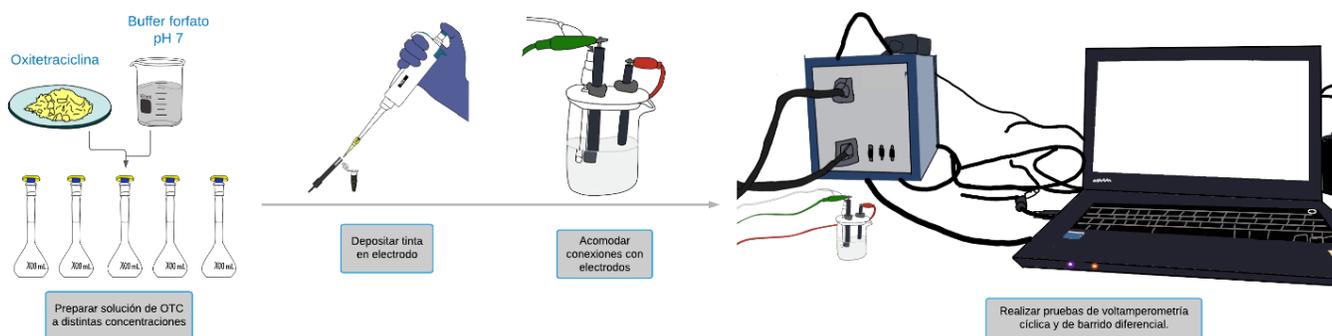


Figura 4.11: Detección de oxitetraciclina en soluciones con buffer fosfato.

Una curva de calibración se define como la relación funcional entre la respuesta observada, representando un valor variable, y la concentración de analito; representando cuantitativamente esta relación existente (Ristoff, 2013). Para construir esta curva se requieren al menos 5 valores diferentes, en el presente trabajo se utilizaron 10. Las soluciones se prepararon con las siguientes concentraciones de OTC: 0.6 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.464 µg/mL, 0.4639 µg/mL, 0.258 µg/mL, 0.179 µg/mL, 71.5 ng/mL, 35.75 ng/mL, 28.992 ng/mL, 17.875 ng/mL. Todas las soluciones se trabajaron con 10 µL de H₂O₂, pH 7 y a temperatura ambiente (**Fig. 4.11**).

4.8 Estabilidad y Reúso

Una vez demostrada la efectividad del sistema de enzima inmovilizada para la detección de OTC en una solución sintética, se llevaron a cabo distintas pruebas de estabilidad mediante cronoamperometría para evaluar la actividad enzimática de la peroxidasa en el sistema inmovilizado con nanopartículas de plata en soporte de carbón vulcan y en el sistema sin nanopartículas en el mismo soporte. Se comparó el desempeño de ambas tintas catalíticas para determinar si existe un efecto negativo o positivo en la estabilidad de la enzima en el tiempo.

Las pruebas fueron realizadas primero a un tiempo de 5 minutos y después a 10 minutos, ambas a un potencial establecido de 0.8 V. Se utilizó una solución de OTC en buffer fosfato a una concentración de 0.02804 mg/mL.

4.9 Actividad con la reutilización del electrodo

La estabilidad de los dispositivos analíticos tiene un papel importante para determinar la reutilización del dispositivo perdiendo el menor porcentaje posible de sensibilidad. Las pruebas de reutilización del electrodo se realizaron comparando las dos tintas catalíticas anteriores. Para ello se realizaron las pruebas de actividad enzimática del capítulo 4.5 a temperatura ambiente y pH 7.5, reutilizando el electrodo durante 10 ciclos. También se realizaron pruebas electroquímicas usando potenciometría de pulso diferencial con las mismas condiciones del capítulo 4.7 y una solución 0.02804 mg de OTC /mL de buffer fosfato.

4.10 Prueba de interferentes

La miel está constituida por diferentes compuestos, por lo que un inconveniente que presentan muchos biosensores es la aparición de interferencias en las señales de reconocimiento. A pesar de que los biosensores enzimáticos son altamente selectivos, se requiere un estudio de interferencias para descartar un posible efecto externo no deseado en la corriente oxidativa.

Los mayores constituyentes en la composición de esta matriz son: glucosa, la cual corresponde al 28%, fructuosa con 22% y sacarosa en 3.2% de la miel de abeja común. Estos 3 compuestos se estudiaron como posibles interferentes (Chi & Wilhad M. R, 2015) que acompañan al antibiótico en la aplicación con muestras reales.

Para examinar el efecto que pueden tener estos compuestos, se elaboraron 3 soluciones aforadas en un matraz de 25 mL con solución de 0.129 mg de OTC/mL buffer: 1) 1.148g de sacarosa, 2) 7.8925 g de Fructuosa y 3) 10.045g de glucosa. La concentración de OTC se mantuvo constante para las 3 mediciones que fueron analizadas mediante DPV con las mismas condiciones planteadas en la prueba anterior.

4.11 Detección de oxitetraciclina en solución de miel de abeja.

Con el fin de examinar su aplicabilidad, en esta sección se evaluó el desempeño del sistema de enzima inmovilizada en una muestra real de miel comercial marca great value.

Para la preparación de las muestras se tomaron 6.3 mL de miel y se disolvieron en 8.7 mL de buffer de fosfatos, con el fin de no afectar el ambiente de detección por el cambio drástico de viscosidad. La calibración se realizó con 10 concentraciones de OTC: 17.875 ng/mL, 28.992 ng/mL, 71.5 ng/mL, 0.129 µg/mL, 0.179 µg/mL, 0.258 µg/mL, 0.46397 µg/mL, 0.46997 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.6 µg/mL. De igual manera, se estudió mediante DPV con las mismas condiciones que la prueba anterior (**Fig. 4.12**).

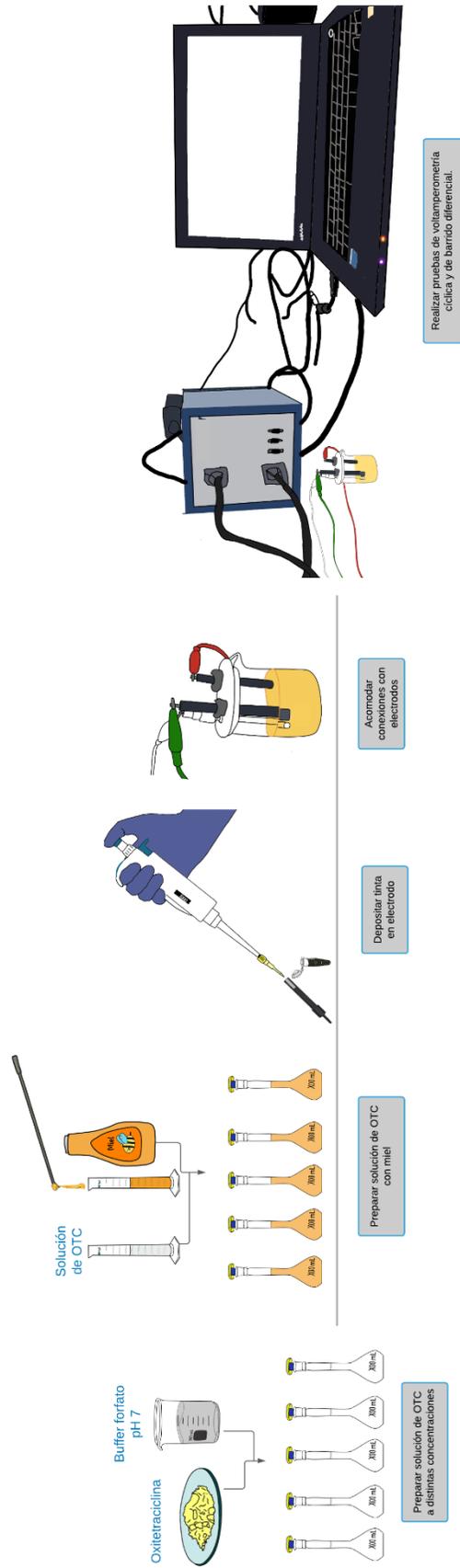


Figura 3.12: Detección de oxitetraciclina en soluciones de miel de abeja.

RESULTADOS

4.1 Cálculo eficiencia de la síntesis de nanopartículas.

La concentración final de la solución de nanopartículas coloidales se estimó de la fórmula 4.1, donde $M(\text{Ag})$ es la concentración, $W(\text{Ag})$ es la cantidad de precursor utilizado (0.136 g) y $V(\text{total})$ el volumen de la solución final (203 ml).

$$M(\text{Ag}) = \frac{W(\text{Ag})}{V(\text{total})} \quad (4.1)$$

La concentración del método empleado fue de 0.67 g Ag/L. Para obtener el rendimiento del total de nanopartículas sólidas recolectadas después del lavado, centrifugación y secado se empleó la fórmula 4.2, donde %R es el porcentaje de rendimiento.

$$\%R = \frac{\text{cantidad real}}{\text{cantidad teórica}} * 100 \quad (4.2)$$

De la síntesis se obtuvieron 6.9 mg, dando un rendimiento del 0.507%. La eficiencia resulta baja debido al método de recuperación de las nanopartículas en solución, sin embargo, para efectos prácticos en la inmovilización enzimática se requiere el uso de nanopartículas en estado sólido.

4.2 Caracterización de nanopartículas de plata.

Al añadir la solución de NaBH_4 , en el método de síntesis descrito en el capítulo anterior, hubo un indicio de la presencia de nanopartículas coloidales de plata indicado por el cambio de coloración a marrón amarillento. La **Fig. 4.1** muestra una imagen SEM (microscopio electrónico de barrido) de las nanopartículas obtenidas del precipitado de la solución.

Se puede apreciar una aglomeración de partículas, cada una de tamaño inferior a 1 μm , este efecto de agregación puede deberse al proceso de centrifugación durante la recolección del precipitado de la solución de las nanopartículas originalmente coloidales el cual posiblemente afectó la barrera estabilizadora dada por del citrato y con ello se aglomeraron las nanopartículas. Sin embargo, el tamaño real no se puede apreciar claramente por la resolución de las imágenes que baja con el tamaño total de las nanopartículas individuales aglomeradas y debido a que esta técnica no es estrictamente cuantitativa.

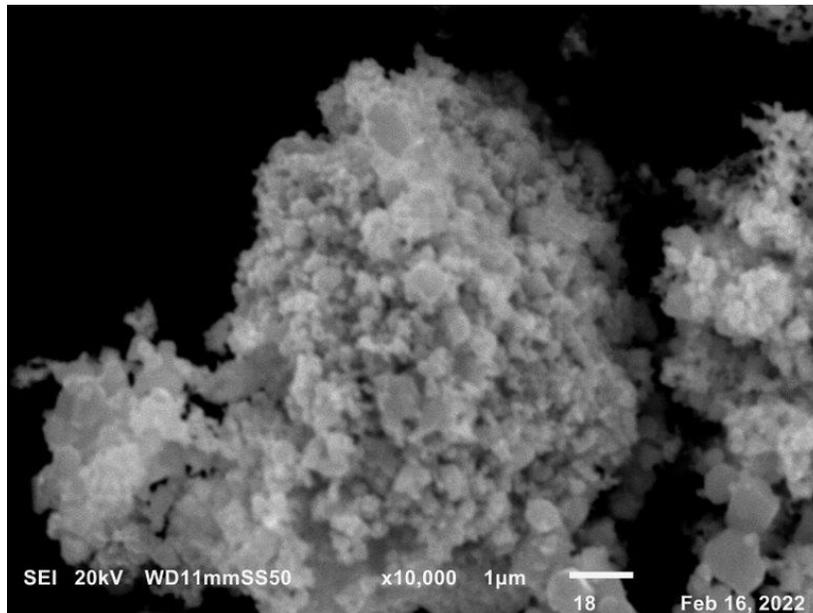
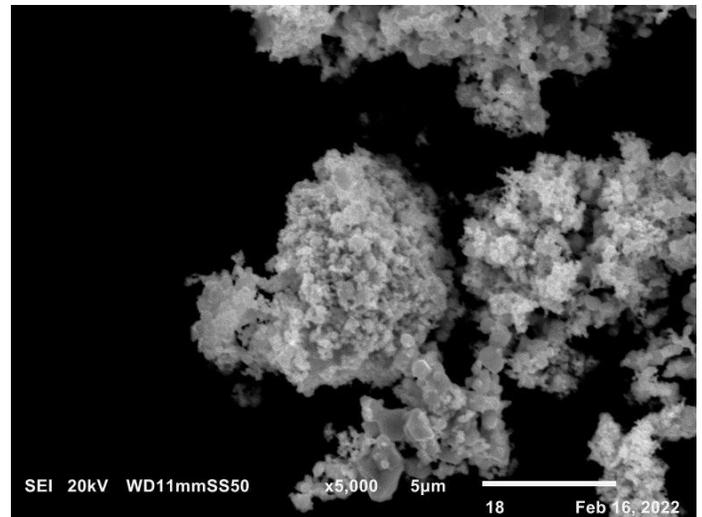
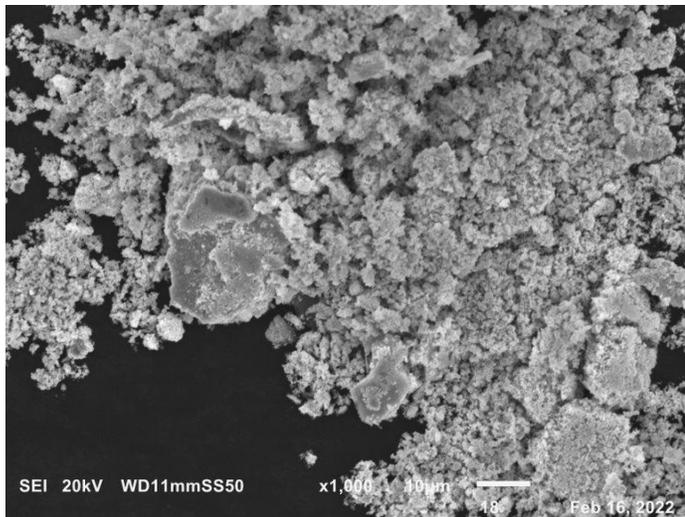


Figura 4.1: Imágenes SEM de nanopartículas de plata a diferentes aumentos: (a) 1,000x, (b) 5,000x y (c) 10,000x.

La figura 4.1 c) con el aumento de 10,000x, nos permite apreciar de mejor manera la forma de las nanopartículas obtenidas en la síntesis, ésta parece tener una tendencia hacia nanopartículas esféricas irregulares. A pesar de que no se puede obtener un tamaño exacto de ellas con esta técnica de caracterización, usando correlación se llegó a la conclusión de que se formaron partículas grandes en la síntesis, pero con nanopartículas de tamaños entre 100 nm y 200 nm (o menores) en su superficie.

4.3 Pruebas de actividad enzimática

4.3.1 Efecto del pH

El valor de pH tomado para el desempeño de las siguientes pruebas fue tomado en base a los resultados de las pruebas experimentales de actividad enzimática de este ensayo para la enzima inmovilizada.

Los resultados se ilustran en la **Fig. 4.2**, donde se cambió el pH del medio en un rango de 2 a 8. Los resultados nos indican que la enzima se adapta mejor a medios neutros o un poco alcalinos, tanto para el sistema libre como inmovilizado: con la diferencia que el sistema inmovilizado ayudó a la enzima a resistir un valor más alcalino antes de perder su actividad.

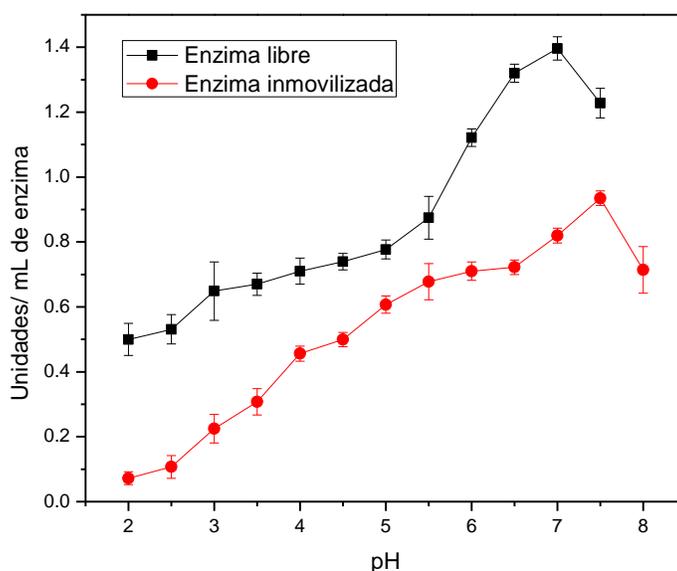


Figura 4.2: Actividad enzimática en función del pH en solución de buffer para enzima peroxidasa en estado libre e inmovilizada en nanopartículas de plata.

Basándonos en la bibliografía y los resultados obtenidos se puede plantear que la inmovilización se llevó a cabo cuando el nafi3n fue modificado por el TBAB que contiene un amonio cuaternario cuyos cationes reemplazan a los protones del nafi3n (Mani et al., 2021). Esta reacci3n contribuy3 a la formaci3n de enlaces, principalmente de grupos i3nicos hidrof3licos de SO^{-3} (Xing et al., 2011), que actúan como matriz para la distribuci3n de las nanopartículas y la enzima. Con el uso de citrato tris3dico para la estabilizaci3n de las AgNPs, durante la s3ntesis, se mantienen los grupos citrato en la superficie de las nanopartículas; lo cual podr3a ayudar a la formaci3n de enlaces en el sistema.

Con la inmovilizaci3n, la actividad m3xima decreci3 33.05% comparado con el estado libre de la peroxidasa. Tambi3n, a diferencia del estado libre en donde el pH 3ptimo fue de 7, el de la enzima inmovilizada en AgNPs fue de 7.5. Este decremento en la actividad puede ser atribuida a un efecto limitante de los grupos funcionales que actúan para la oxidaci3n de per3xido en la enzima debido a la formaci3n de enlaces con los componentes usados en la inmovilizaci3n covalente, ya que a pesar de que se espera la mejora en la estabilidad de la

peroxidasa, este método conlleva a la pérdida de actividad catalítica enzimática y posible modificación del entorno químico de la matriz (Moore et al., 2004).

Los valores máximos de actividad se presentaron en un pH de 7 para la enzima en estado libre y 7.5 para el sistema inmovilizado. De acuerdo a los autores Ramos Díaz et. al., la miel tiende a ser ácida con valores de pH entre 4 y 5 (Ramos Díaz & Pacheco López, 2016), esto puede representar un problema por el decaimiento de actividad a este pH. Sin embargo, la inmovilización presentó un factor de protección ante cambios de pH al disminuir la actividad tan solo un 35.05% con el cambio de pH 7 a pH 5, mientras que con la enzima sin inmovilizar la disminución fue de 44.34%.

4.3.2 Efecto de la temperatura

En cuanto a la respuesta óptima de la peroxidasa en función de la temperatura, tanto en estado libre como inmovilizada, los resultados se muestran en la **Fig. 4.3**. El rango de 30 a 35°C mostró mayor actividad para la HRP libre e inmovilizada.

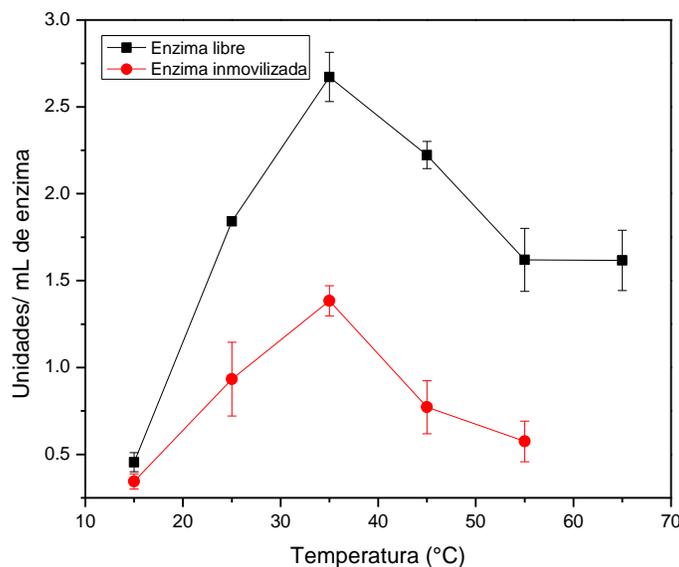


Figura 4.3: Actividad enzimática en función de la temperatura en solución de buffer a pH 7 para enzima peroxidasa en estado libre e inmovilizada en nanopartículas de plata.

La disminución de la actividad a partir de los 35°C se puede atribuir al proceso de desnaturalización enzimática a altas temperaturas, y este efecto se presentó en ambos sistemas. Así como con el cambio de pH, la inmovilización disminuyó la actividad en un 48.20%, sin embargo, se conservó la misma temperatura óptima que con la enzima en estado libre. Debido a que se espera una detección simple y sin instrumental avanzado, las siguientes pruebas se realizaron a temperatura ambiente (Aproximadamente 21°C).

En este caso, contrario al efecto de la inmovilización frente a cambios de pH, la inmovilización covalente no parece proteger a la enzima con los cambios de temperatura. Cuando se cambió la temperatura de 35°C (valor óptimo) a 40°C la enzima en estado libre disminuyó su actividad 16.82% y la enzima inmovilizada decreció hasta 44.25%. Esto nos

indica que existe una limitación en cuanto a la estabilidad de la enzima a temperaturas superiores a 35°C.

Los resultados de pH y temperatura son favorables para el uso práctico de la enzima al lograr la detección con un pH cercano al neutro y desnaturalización a una temperatura muy arriba de la ambiental.

4.4 Prueba de acoplamiento

La Fig. 4.4 ilustra los resultados obtenidos de la prueba de acoplamiento para la obtención de la cantidad óptima de nanomaterial y el tiempo necesario para una correcta inmovilización.

El porcentaje de enzima inmovilizada se estimó mediante los valores de actividad enzimática obtenidos y usando la ecuación 4.3.

$$\% \text{ Enzima inmovilizada} = \frac{\text{Actividad residual}}{\text{Actividad inicial}} * 100 \quad (4.3)$$

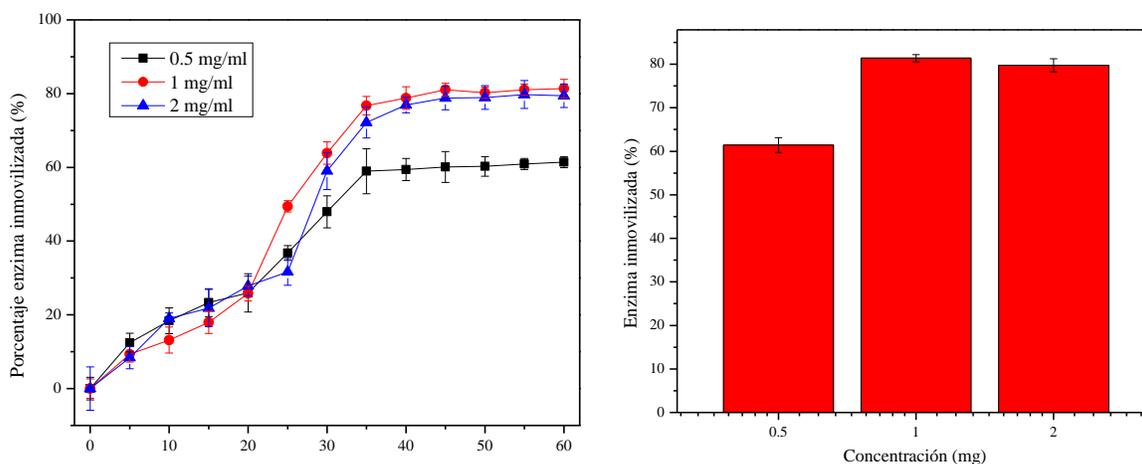


Figura 4.4: Porcentaje de enzima inmovilizada respecto al tiempo, comparando 3 diferentes concentraciones de tinta.

Los resultados indican que usando 1 mg de nanopartículas por cada mL de enzima se llega a un 80% de enzima inmovilizada en el soporte, este valor es 19.97% mayor comparado a cuando se usa la mitad de esta cantidad y al duplicar la cantidad a 2 mg de nanopartículas el cambio es casi nulo.

Los autores Sharifi et al indican que la cantidad de nanopartículas empleadas en la inmovilización puede afectar el desempeño del electrodo de detección al cambiar la actividad enzimática de la enzima (Sharifi et al., 2020), aunado a que una menor cantidad de nanomateriales sintetizados baja el costo total del método de detección. Por ello, se optó por usar 1 mg de nanopartículas de plata en la síntesis de la tinta electrocatalítica para las pruebas subsecuentes.

Este incremento de enzima inmovilizada con el aumento de concentración de nanopartículas

de plata puede deberse a los beneficios planteados con el uso de nanopartículas, ya que éstas conllevan a una mayor superficie disponible en la que puede acoplarse una mayor cantidad de enzima mediante la formación de enlaces. La cantidad ideal fue de 1mg de material, ya que el usar el doble de cantidad no significó diferencia en la cantidad de enzima inmovilizada, posiblemente debido a la falta de enzima disponible. Sin embargo, el valor obtenido (80%) es un gran parámetro para el uso en el electrodo (Yu et al., 2013).

4.5 Caracterización del electrodo

Las **figuras 4.5 y 4.6** muestran las gráficas obtenidas mediante voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de pulso diferencial (DPV) respectivamente.

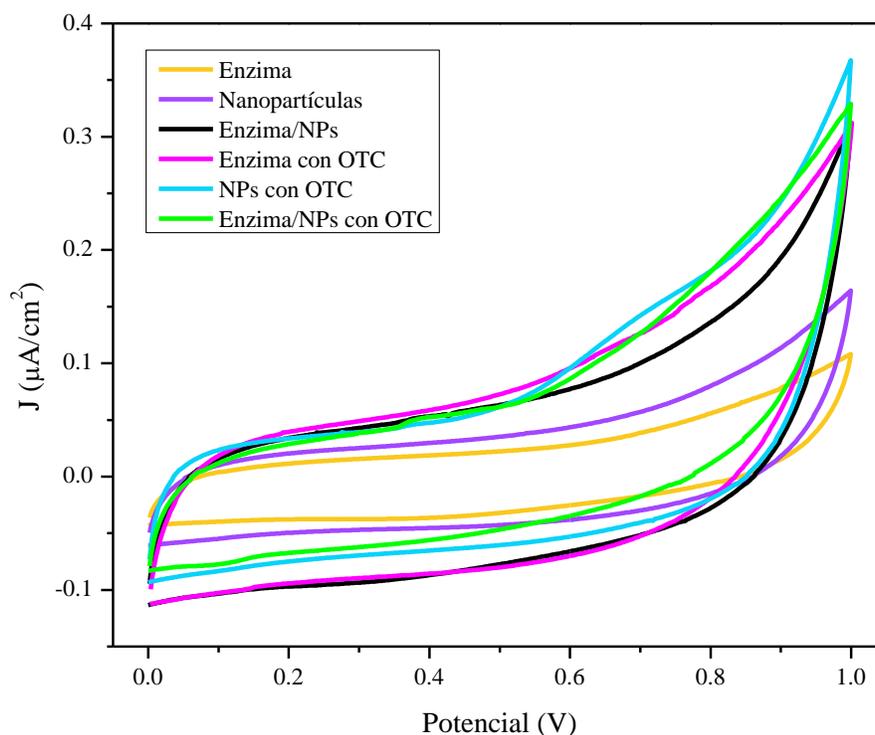


Figura 4.5: Voltamperograma cíclico de detección en solución sin oxitetraciclina y solución de 0.028 mg de OTC /mL de buffer fosfato, comparando 3 tintas de 1) HRP, 2) NPs y 3) HRP inmovilizada en AgNPs.

Las voltamperometrías cíclicas (CV) de control para las soluciones en ausencia de OTC y a una concentración de 0.028 mg de antibiótico/ mL de buffer fosfato probados en sistemas HRP/Vulcan, AgNPs/Vulcan y HRP/AgNPs/Vulcan se muestran en la **Fig. 4.5**. En la figura se puede observar la ligera formación de un pico en el potencial de 0.8 V para el sistema de enzima y nanopartículas con enzima; el sistema de nanopartículas sin enzima mostró un pico más prominente, pero con un corrimiento al potencial de 0.7V.

De acuerdo a la bibliografía, la presencia de oxitetraciclina se ve confirmada con la presencia de un pico en la corriente de oxidación en el rango de 0.8-0.85 V (Ghodsi et al., 2015). Esta señal ocurre por una reacción dada por la molécula de oxitetraciclina que contiene

un hidroxilo fenólico en su estructura química, el cual puede oxidarse mediante la enzima peroxidasa (previamente activada con peróxido), provocando una corriente máxima oxidativa en la superficie del electrodo. Esta señal puede ser relacionada linealmente a la cantidad de OTC en un amplio rango de concentración (Yang et al., 2006).

La señal de corriente de oxidación de OTC no resulta muy apreciable, por lo que se analizó mediante DPV (Fig. 4.6) para obtener señales más pronunciadas. Como resultado, el pico de corriente resultante de la oxidación con el sistema Ag NPs /HRP se encuentra más visible que la de los otros dos electrodos que no incluyen enzima ni nanopartículas.

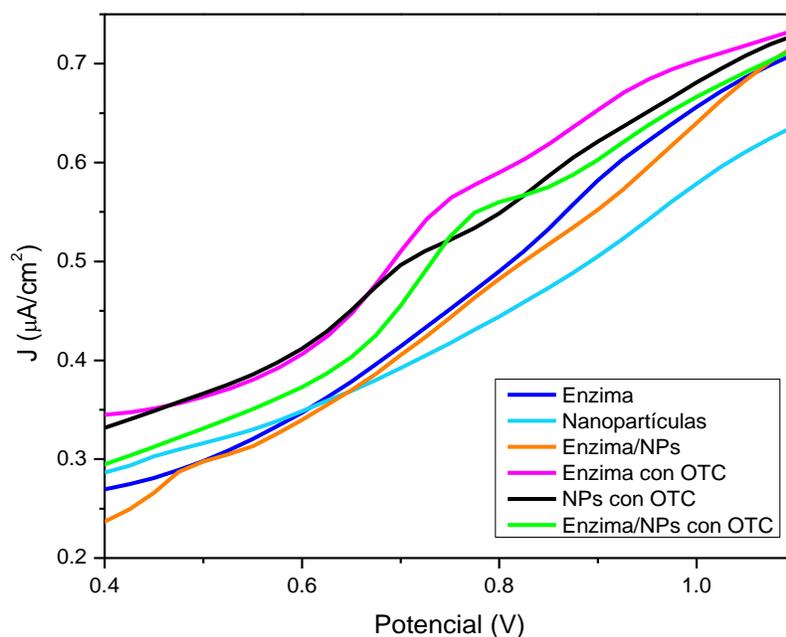


Figura 4.6: Voltamperograma de pulso diferencial, detección en solución sin oxitetraciclina y solución de 0.028 mg de OTC /mL de buffer fosfato, comparando 3 tintas de 1) HRP, 2) NPs y 3) HRP inmovilizada (tinta).

Con estos estudios se puede suponer que la enzima por si sola contribuye significativamente a que el electrodo final desempeñe más eficientemente la oxidación de antibiótico en la solución a detectar, ya que este es el elemento de reconocimiento que actúa como catalizador para el reconocimiento del analito.

En esta caracterización la presencia de nanopartículas presentó una disminución de la densidad de corriente, pero con una señal oxidativa con un pico más prominente a comparación del sistema de enzima sin nanopartículas; contrario al electrodo con NPs inmovilizadas en carbón vulcan sin peroxidasa, el cual presenta una señal oxidativa en un potencial diferente al buscado, esto posiblemente por la reacción debida a la presencia de peróxido.

4.9 Ciclos de reuso

4.9.1 Prueba bioquímica

Para esta prueba se inmovilizó la HRP en papel carbón toray con ttab, nafi3n y carb3n vulcan, con presencia y ausencia de AgNPs para analizar la actividad enzimática y mediante la ecuaci3n 4.3 (para calcular el porcentaje de enzima residual) obtener los resultados de la Fig. 4.7.

Este ensayo evalu3 el porcentaje residual dada la reutilizaci3n de la enzima inmovilizada al comparar la actividad presentada durante 10 ciclos. Esto nos ayuda a evaluar la vida 3til del electrodo con el reuso y determinar si el sistema de inmovilizaci3n con nanopart3culas resulta efectivo a pesar de las limitantes con la actividad enzimática presentadas hasta ahora.

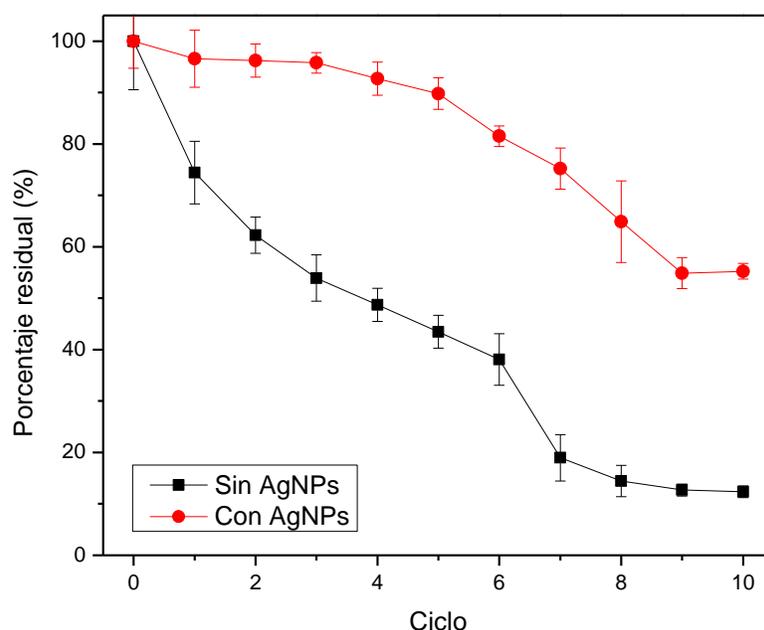


Figura 4.7: Actividad enzimática residual de electrodos del material con y sin nanopart3culas de plata como soporte de inmovilizaci3n; ensayo respecto a los ciclos de reuso.

Como se observa en la figura, las pruebas realizadas con nanopart3culas de plata presentaron una actividad m3s estable sin una gran p3rdida en la actividad de la enzima comparada a la inmovilizaci3n sin nanopart3culas. Despu3s de 10 ciclos de uso las nanopart3culas ayudaron a lograr un decrecimiento de tan solo 44.77%, mientras que con la enzima inmovilizada sin nanopart3culas fue de 87.65%.

Adem3s, se demuestra la posible reutilizaci3n del electrodo para la detecci3n del antibi3tico, ya que la p3rdida de sensibilidad no se ver3 afectada significativamente al mantener m3s estable a la enzima mediante la modificaci3n.

4.7.1 Pruebas electroquímicas

Otra prueba para determinar la eficiencia del electrodo al reutilizarlo se hizo mediante DPV. Esta vez se midió la efectividad de la enzima inmovilizada al oxidar el grupo fenólico del antibiótico después de varios ciclos de lavado con agua destilada y reúso.

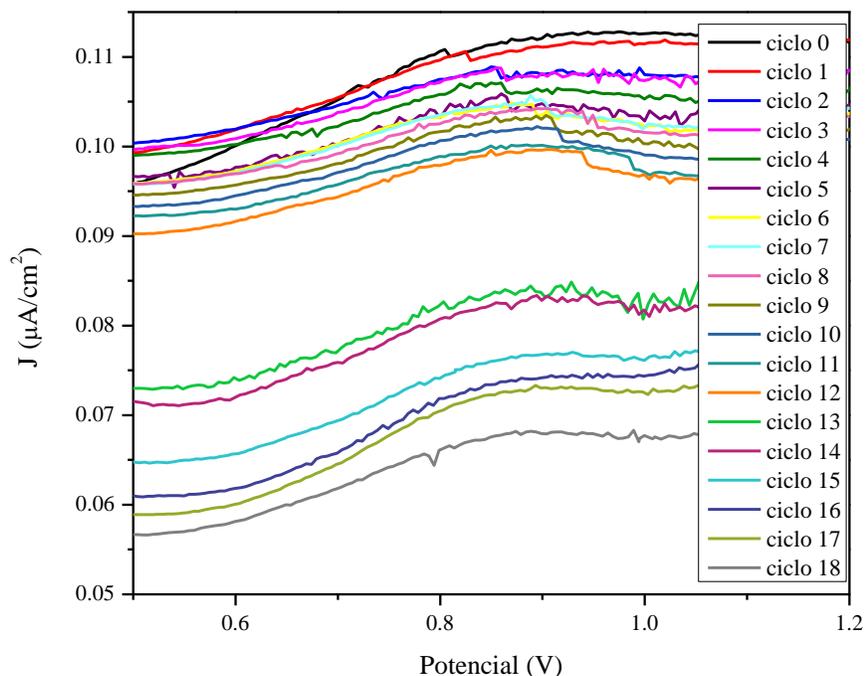


Figura 4.8: Ciclos de reúso del electrodo de peroxidasa inmovilizada con nanopartículas de plata y carbón vulcan medido mediante DPV de la detección de una solución sintética de 0.02804 mg de OTC/ mL de buffer fosfato.

Tal como se muestra en la **Fig. 4.8**, después de haber sido utilizada 12 veces la actividad no tuvo una pérdida significativa en la señal de detección, esta fue de 11.1%. Después de eso hubo una caída en la intensidad de corriente de la oxidación, pero se siguió mostrando una señal de detección durante 6 ciclos más. En total se perdió 39.175% de densidad de corriente después de 18 ciclos de reúso.

Al contrario de estos resultados, en la **Fig. 4.9** se observa que en el electrodo con enzima inmovilizada sin presencia de nanopartículas se obtuvo una notoria señal de oxidación con el primer uso sin lavado, pero a partir del primer ciclo de reúso se presentó una caída del 10% en la intensidad de corriente y pérdida en la definición del pico al potencial buscado. Con la pérdida de la señal oxidativa los siguientes 4 ciclos de reúso tampoco presentaron la señal representativa en la detección.

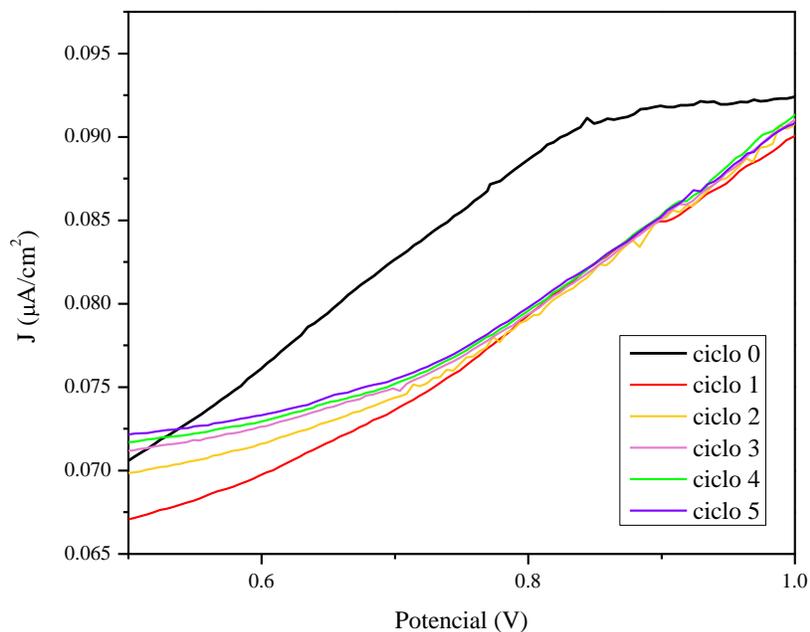


Figura 4.9: Ciclos de reuso del electrodo de peroxidasa inmovilizada con carbón vulcan medido mediante DPV de la detección de una solución sintética de 0.02804 mg de OTC/ mL de buffer fosfato.

Estos resultados, tanto electroquímicos como biológicos, determinan que la presencia de nanopartículas ayuda a tener una mayor vida útil de la actividad catalítica de la peroxidasa con los ciclos de reuso. Y que, a pesar de presentar una menor actividad comparada al sistema de enzima libre, cuando se lleva a cabo la inmovilización con carbón vulcan la presencia de AgNPs beneficia al sistema, posiblemente por la interacción con el tamaño y área superficial que contrarrestan las limitantes de los enlaces covalentes y del nafión.

4.6 Optimización de H₂O₂

El peróxido de hidrógeno es un compuesto bastante reactivo y su uso implica un factor relevante en el desempeño de la peroxidasa ya que, como se mencionó antes, este sirve como mecanismo de activación de la peroxidasa que oxidará el grupo fenólico de la OTC. La **figura 4.10** ilustra los resultados obtenidos del ensayo de actividad enzimática al variar la concentración de peróxido añadida al sistema de detección.

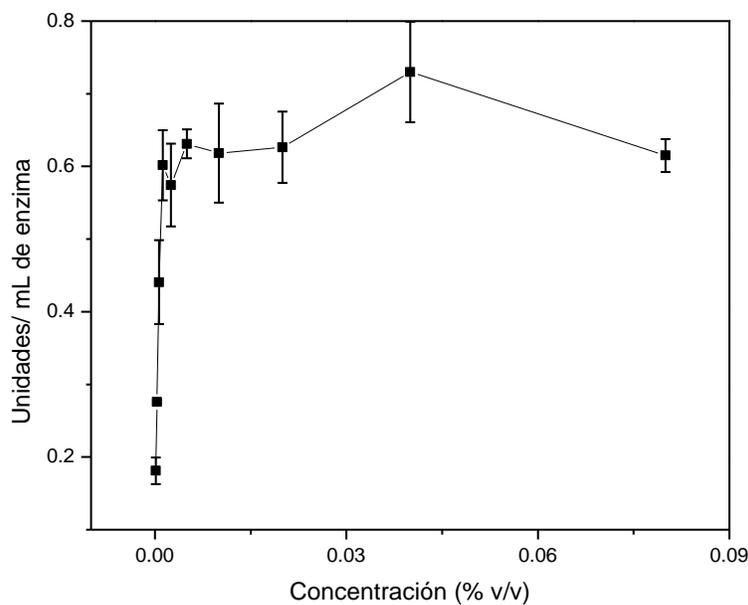


Figura 4.10: Actividad de la HRP en función de la concentración de H₂O₂.

La máxima actividad se obtuvo a una concentración de 0.04% de H₂O₂, la prueba demostró que al disminuir o aumentar demasiado la cantidad de peróxido en la reacción decrece la actividad de la peroxidasa. El uso indispensable de este compuesto para las reacciones de peroxidasa queda demostrado al tener un alto incremento en la actividad de una concentración de 0 a 0.015% de peróxido, a partir de este valor el aumento de actividad es más lineal respecto a la concentración.

Este comportamiento puede deberse a que cuando el peróxido se encuentra a una baja concentración actúa como reactivo limitante de la reacción oxidativa (al ser el que oxida a la enzima y empieza su proceso) y al no estar presente en la reacción se disminuye la actividad catalítica de la enzima. La disminución de la actividad a una concentración mayor de 0.04% de peróxido puede deberse a la desnaturalización de la enzima por la naturaleza reactiva del peróxido o a la saturación de la enzima.

4.7 Detección de oxitetraciclina en Buffer fosfato

Para la correlación de la corriente de oxidación con la cantidad de oxitetraciclina en las soluciones, primero se realizaron las pruebas usando un rango de concentración de oxitetraciclina disuelta en buffer fosfato, manteniendo las condiciones de pH, cantidad de peróxido y cantidad de nanopartículas establecidas como ideales para el sistema.

El rango de concentraciones se estableció a partir de otros estudios que establecieron previas concentraciones de OTC encontradas en miel de abeja y de rangos de cantidades aceptadas en algunos países para este antibiótico.

En la **figura 4.11** se presentan los voltamogramas obtenidos por voltamperometría de pulso diferencial (DPV); en este gráfico se pueden observar que existe un aumento de la densidad de corriente respecto a la concentración de analito en la muestra. La detección se dio a un

rango de potencial de 0.77 V a 0.85021 V, indicando la presencia de OTC en las soluciones.

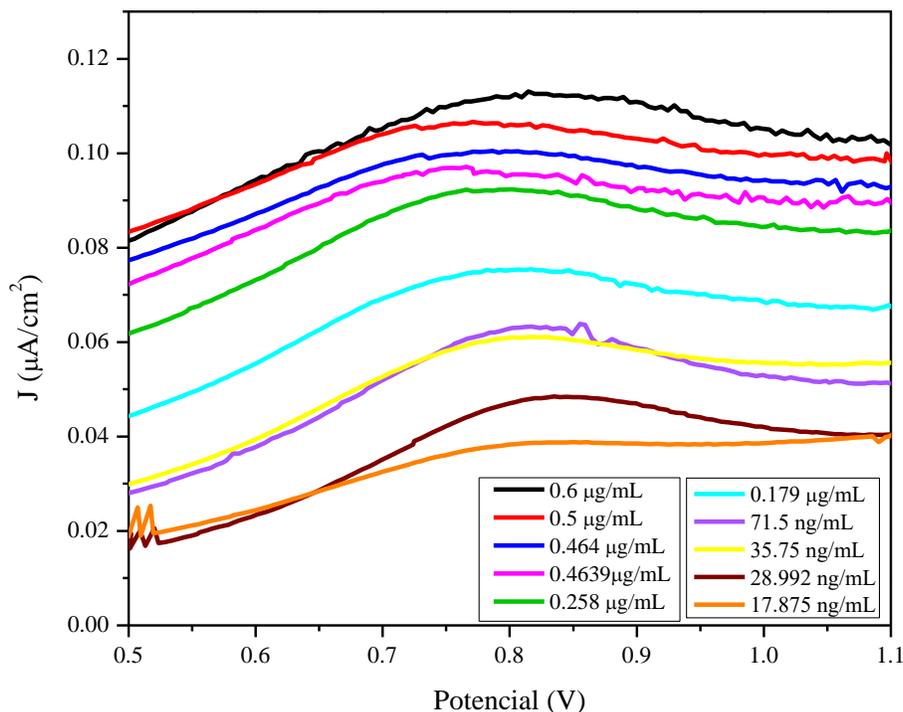


Figura 4.11: DPV detección de oxitetraciclina en solución de buffer fosfatos a diferentes concentraciones.

Se puede observar también que un efecto de la baja concentración de antibiótico es el corrimiento a la izquierda de la señal máxima, lo que afecta su correcta determinación a concentraciones menores. Esto puede deberse a la presencia de peróxido que no cambió su concentración en todas las soluciones de OTC e interfiere con la señal a concentraciones bajas de antibiótico.

Al obtener una variación en la densidad de corriente respecto a la concentración de OTC se pudieron usar los resultados para realizar una curva de calibración (**Fig. 4.12**) de corriente vs concentración de oxitetraciclina.

Despreciando la última medición, debido a su valor bastante fuera del rango lineal, la pendiente de la curva de calibración obtenida mediante el ajuste lineal fue de $322.56 \pm 31.85 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ y la ordenada al origen de $39.225 \mu\text{A}$.

El coeficiente de regresión de Pearson $r=0.9675$ indica que el incremento de la corriente está explicado en un 96.75% del aumento de la concentración de glucosa a través de la fórmula de relación lineal en el rango de concentraciones que va desde $0.0063 \mu\text{M}$ hasta $0.13031 \mu\text{M}$.

$$LOD = \frac{3S}{m} \quad (4.4)$$

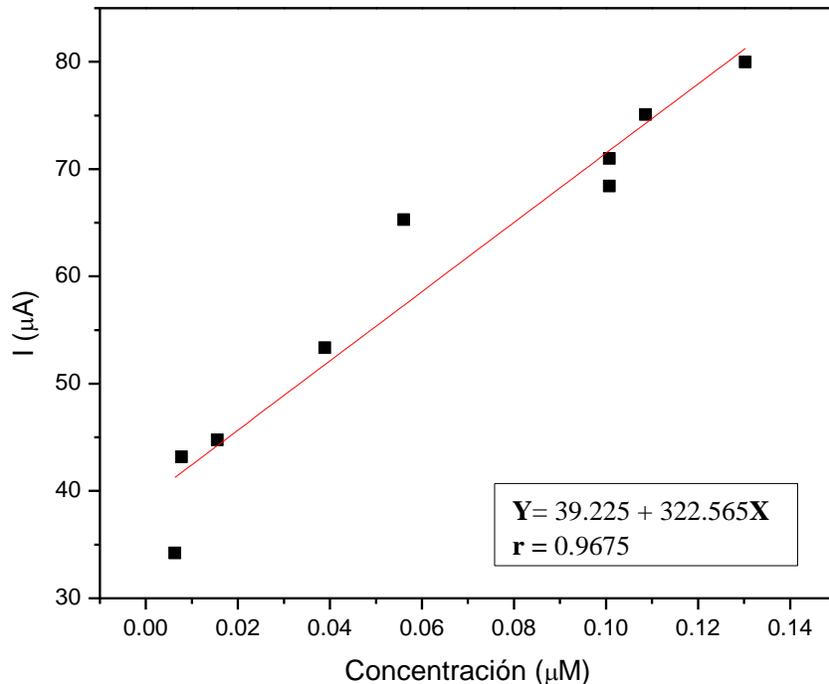


Figura 4.12: Curva de calibración para detección de OTC en buffer fosfato, construida a partir de los diagramas DPV.

Para obtener el límite de detección se usó la ecuación 4.4 (Vashist & Luong, 2018), donde S representa la desviación estándar de la corriente obtenida del blanco y m la pendiente de la curva de calibración.

Mediante los valores extraídos de la voltamperometría potencial se obtuvo el valor de la desviación estándar correspondiente: 10.9769633 μA. Por lo que, de acuerdo a la fórmula, el valor obtenido del límite de detección fue de 0.102091 μM de OTC/ ml de buffer fosfato o 47 ng de OTC/ ml de buffer fosfato.

La sensibilidad del biosensor queda representada por la pendiente de la curva de calibración (Ristoff, 2013)(Ghodsi et al., 2015). Para este sistema, la sensibilidad tuvo un valor de 322.56 ± 31.85 μA/μM.

La tabla 4.1 recopila los límites de cuantificación reportados en la bibliografía, comparado con el método desarrollado en este trabajo el rango de detección se considera aceptable, siendo menor que los métodos: microbiológico, de cromatografía, sonda fluorescente o electroforesis capilar (Dieguez et al., 2002)(Gunes et al., 2009)(Casado-Terrones et al., 2007).

Tabla 4.1*Límites de cuantificación de OTC en miel de abeja de diferentes técnicas*

Método de detección	Límite de detección	Referencia
Electrodo de HRP inmovilizada con nanopartículas de plata	0.047 $\mu\text{g/mL}$ miel	---
Microbiológico	0.4 $\mu\text{g/g}$ miel	(Dieguez et al., 2002)
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detector UV	0.05 $\mu\text{g/g}$ miel	(Dieguez et al., 2002)
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Elisa)	5.3 ng/g miel	(Mahmoudi, Moosavy, et al., 2014)
Cromatografía líquida con Espectrometría de masas	10 ng/g miel	(Gunes et al., 2009)
Sonda fluorescente	0.72 μM	(Gunes et al., 2009)
Electroforesis Capilar	10–40 mg/L miel	(Casado-Terrones et al., 2007)

4.8 Estabilidad

La **Fig. 4.13** ilustra las curvas cronoamperométricas de la detección durante 5 minutos de una concentración de 0.028 mg de OTC/ ml de buffer usando el sistema de enzima inmovilizada en AgNPs.

Los resultados demuestran que la densidad de corriente decrece cuando la enzima se encuentra inmovilizada únicamente con el soporte de carbón al contrario del sistema con nanopartículas. Cuando las nanopartículas están presentes el sistema la densidad de corriente disminuye durante los primeros segundos, pero después se incrementa repentinamente y permanece estable durante el resto de los 5 minutos; llegando incluso a aumentar un poco. Además de esta estabilidad, en esta prueba cronoamperométrica la densidad de corriente es mayor con la presencia de nanopartículas.

Al aumentar a 10 minutos el tiempo de análisis (**Fig. 4.14**), la actividad igualmente decreció para ambos sistemas, sin embargo, con la inmovilización usando nanopartículas la densidad de corriente fue mayor que sin la presencia de ellas.

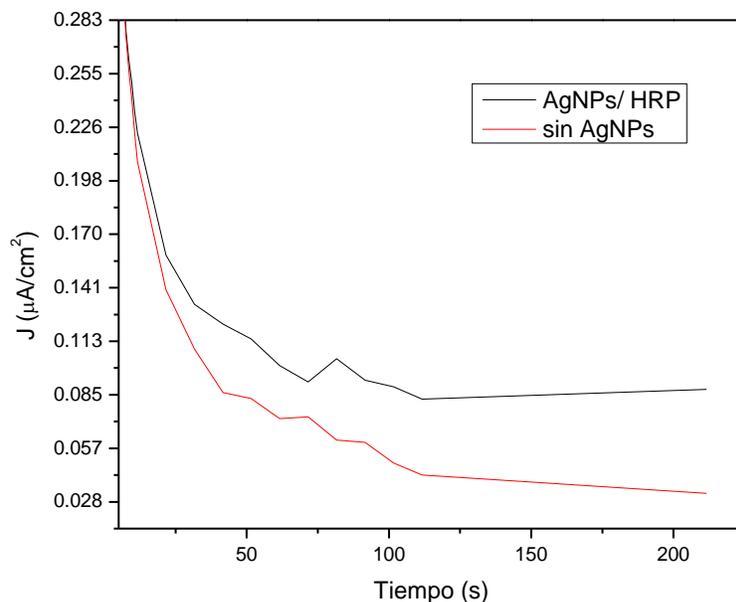


Figura 4.13: Cronoamperometría durante 5 minutos desde el potencial inicial hasta 0.8 V (zona del pico de la voltametría), en presencia o ausencia de nanopartículas de plata.

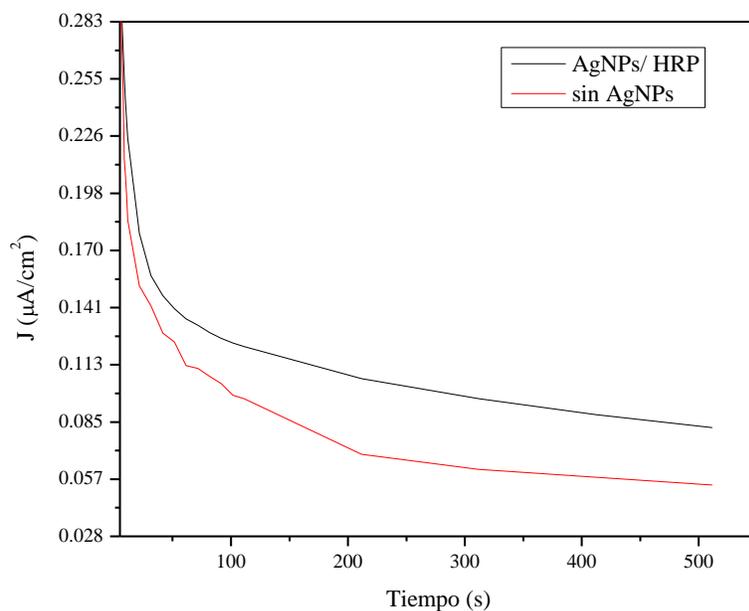


Figura 4.14: Cronoamperometría durante 5 minutos desde el potencial inicial hasta 0.8 V (zona del pico de la voltametría), en presencia o ausencia de nanopartículas de plata.

Debido a que ésta es una técnica analítica que mide la corriente respecto a la difusión en función del tiempo después de aplicarse un escalón de potencial, evalúa la eficiencia del electrodo durante tiempos determinados. En base a los resultados se puede suponer que el electrodo que tiene la presencia de nanopartículas sigue funcionando durante más de unos segundos de uso; esta característica, junto con los resultados obtenidos de las pruebas de reúso, comprueban que la eficiencia del método de inmovilización por enlaces covalentes es efectiva para la estabilidad y reúso a pesar de tener una limitante en cuanto a la disminución

de actividad catalítica. Se intuye que estas mejoras se deben a la protección que proporciona la inmovilización con AgNPs, carbón vulcan y nafión ante los ciclos de lavado, estabilidad en el tiempo y cambios de pH con la unión enzimática a la matriz del sistema que a pesar de que limita su actividad, modifica el microambiente para la protección ante estos cambios y resistencia a la pérdida de enzima.

4.10 Prueba de Interferentes

En la **Fig. 4.15** se muestran los voltagramas cíclico y DPV respectivamente, para ello se analizaron soluciones (todas con 0.129 mg de OTC/mL buffer) que contenían glucosa, fructuosa o sacarosa por separado. Esto debido a que la miel tiene estos compuestos como principales constituyentes y pueden presentar interferencias significativas en la medición de antibiótico en una muestra real con miel.

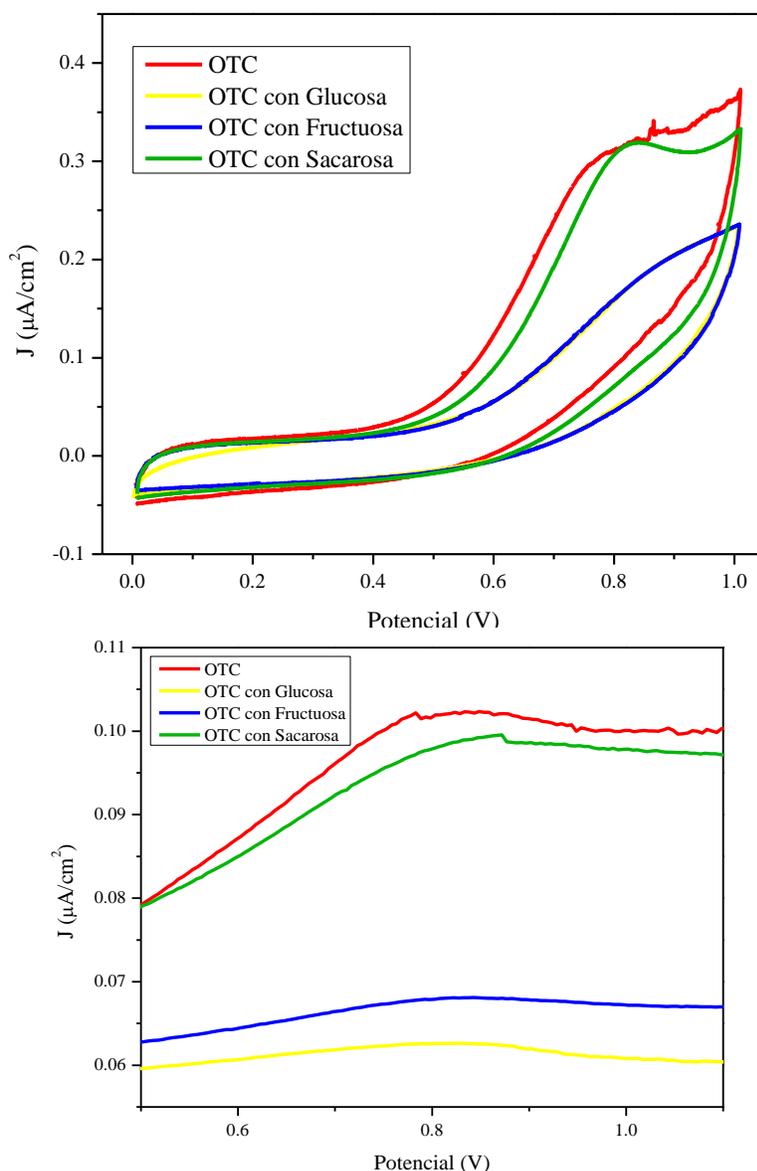


Figura 4.15: Pruebas de interferentes en solución de oxitetraciclina en buffer fosfato a) CV, b) DPV.

Ambas pruebas comprueban que efectivamente existe una interferencia en la señal oxidativa y en la densidad de corriente; especialmente dada por la glucosa y fructuosa, los cuales son sustancias que componen en un 28% y 22% a la miel, respectivamente.

El estudio de interferencias es una prueba crucial para el desarrollo de un biosensor, especialmente si este quiere ser aplicado en matrices complejas como lo es la miel de abeja. Al encontrar que se presentaron interferencias será necesario el análisis de la detección de diferentes concentraciones de OTC para observar su comportamiento con muestras de miel, sin embargo, para garantizar un buen desempeño estas fueron realizadas usando soluciones de miel con buffer, de esta manera se garantiza un ambiente más ideal al no cambiar drásticamente el pH y viscosidad del medio.

4.11 Detección de oxitetraciclina en solución de miel de abeja

La **Fig. 4.16** ilustra los resultados obtenidos de la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) para el rango de concentraciones (igual que el anterior) de OTC disuelta en soluciones de miel de abeja y buffer fosfato.

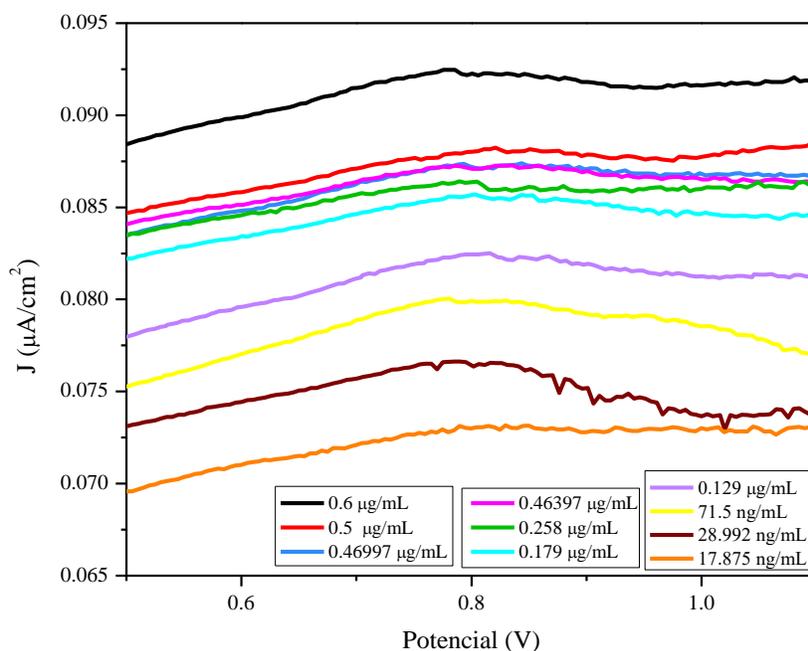


Figura 4.16: DPV oxidación de oxitetraciclina en soluciones de miel.

Los resultados nos indican que al igual que en la sección 4.5, la densidad de corriente aumentó conforme la concentración de antibiótico era mayor y se mantuvo presente la señal del analito correspondiente a la oxidación del grupo fenólico de la oxitetraciclina.

Sin embargo, tal como se esperaba de los resultados obtenidos en la prueba de interferentes, pese a que la señal oxidativa (en un rango de 0.78 V a 0.84 V) se mantiene presente para cada concentración de OTC, los valores de corriente fueron menores en ese potencial. La disminución es de al menos 18% (respecto a la detección de 6 mg de OTC) y las señales son

menos marcadas.

Dado que el cambio fue muy evidente, de los datos obtenidos en este análisis se realizó la curva de calibración mostrada en la **Fig. 4.17**. El valor de la pendiente fue de $67.64 \pm 11.1267 \mu\text{A}/\mu\text{M}$, que comparado con el valor anterior de $322.56 \pm 31.85 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ se puede ver una diferencia significativa. Sin embargo, cumple la función de detección del antibiótico en el mismo rango de concentración de OTC de $0.0063 \mu\text{M}$ a $0.13031 \mu\text{M}$.

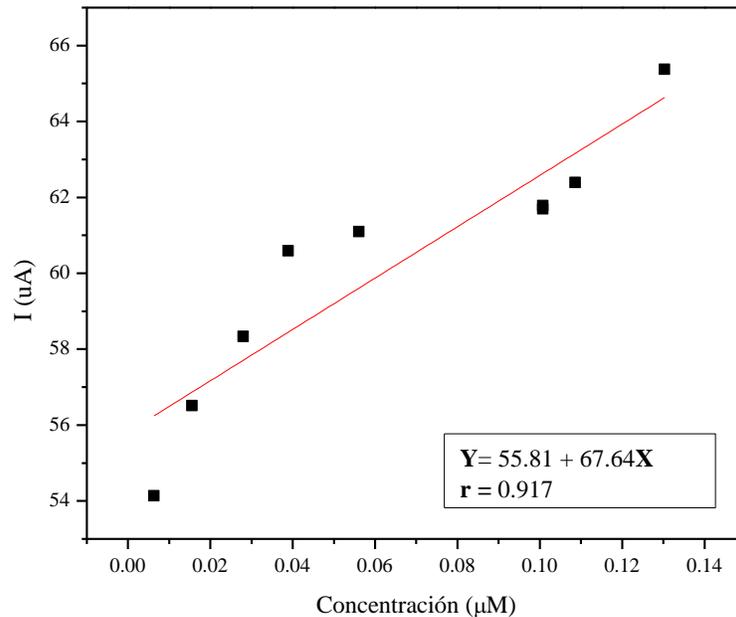


Figura 4.17: Curva de calibración para OTC construida a partir de los diagramas DPV en muestras reales de miel de abeja en solución.

Usando la ecuación 4.4 y el valor de desviación estándar correspondiente ($4.493113874 \mu\text{A}$), se obtuvo el límite de detección. Este valor fue de $0.199281 \mu\text{M}$ o $91.8 \text{ ng de OTC/ ml de solución de miel}$.

A pesar de la diferencia en los valores obtenidos al usar miel de abeja, la detección de oxitetraciclina fue efectiva usando el sistema de HRP inmovilizada en AgNPs con un límite de detección aceptable dentro de los parámetros de algunas investigaciones y límites permisibles en ciertos países, lo que resulta en un electrodo útil como primer acercamiento al desarrollo de un biosensor.

CONCLUSIONES

El presente trabajo consistió en un electrodo modificado con la enzima peroxidasa del rábano picante inmovilizada en nanopartículas de plata soportadas en carbón vulcan, con el propósito de detectar oxitetraciclina, un antibiótico comúnmente utilizado en la apicultura para el control y prevención de enfermedades, en soluciones de miel de abeja.

Se logró la síntesis de nanopartículas de plata a partir de un método previamente reportado. A pesar de la aglomeración dada por la recuperación y secado del material, la caracterización microscópica reveló la forma y tamaño adecuados para su uso. Como una manera de aprovechar los beneficios propios de los nanomateriales y evitar la aglomeración en la superficie del electrodo, estas nanopartículas se homogeneizaron mediante sonicación previo a su uso.

La enzima fue capaz de inmovilizarse en los materiales planteados, demostrado por la actividad enzimática dada en la prueba de acoplamiento en donde los resultados mostraron que con 1 mg de nanopartículas se alcanzó un porcentaje de inmovilización del 80% y que al estar en contacto el soporte con la enzima por más de 35 minutos la peroxidasa quedó absorbida en la matriz del soporte Ag NPs/carbón vulcan.

Se determinaron las condiciones óptimas para el funcionamiento del electrodo. Los valores mostrados en cuanto a pH y temperatura no variaron mucho después de la inmovilización a comparación de su estado libre. Usando pH 7 y temperatura ambiente se llevaron a cabo los procedimientos posteriores. Los ensayos enzimáticos ayudaron a determinar la actividad enzimática de la enzima en estado libre e inmovilizada, demostrando la presencia de enzimas en la matriz que además presentan actividad catalítica, sin embargo, la actividad máxima decreció 33.05% en su pH óptimo y 48.20% en temperatura óptima. Dada la bibliografía, se esperaba la interferencia de las nanopartículas como soporte de inmovilización en la actividad catalítica.

Para determinar la eficacia del electrodo construido se midió la oxidación de una muestra de OTC con un valor dentro del rango presente en otros estudios. Se comparó la eficacia del electrodo completo vs 2 electrodos incompletos, uno con únicamente nanopartículas y otro con peroxidasa. A pesar de que la enzima por sí sola realiza un gran trabajo de oxidación, el complemento de nanopartículas ayuda a estabilizar el microambiente y no afectó la señal de corriente oxidativa, a diferencia de cuando se usaron únicamente nanopartículas.

En todas las pruebas, tanto biológicas como electroquímicas, el uso de peróxido de hidrógeno fue obligatorio para el funcionamiento de la peroxidasa. Se llegó a la conclusión, mediante una prueba de actividad enzimática, que una concentración del 0.04% representa un valor adecuado. Una menor o mayor cantidad conlleva a un menor desempeño de la HRP.

Para la aplicación del electrodo se pudo observar el pico de potencial de oxidación de la OTC en un rango de 0.77 V a 0.85 V. La linealidad fue comprobada obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson igual a 0.9675. Los límites de detección en donde el sistema fue lineal se encontraron entre 0.0063 μM y 0.13031 μM , rango aceptable considerando otros métodos de cuantificación y los valores de OTC encontrados en otros análisis en miel.

Se determinó que las nanopartículas de plata como soporte en la inmovilización covalente resulta en una mejora del ambiente de la enzima, ya que ayudan a la estabilidad del electrodo con el tiempo de uso y a la reutilización del sistema por más de 10 ciclos.

Previo a la aplicación en muestras reales de miel de abeja se llevó a cabo un estudio de interferencias con los compuestos de mayor concentración encontrada en la miel. La sacarosa resultó en una leve interferencia debido a su baja concentración (disminución del 2.7%), pero la fructuosa y glucosa disminuyeron la corriente de la señal oxidativa en un 33.5% y 38.8% respectivamente. Debido a que ésta es una cantidad considerable, se optó por la medición de OTC en soluciones de abeja, evitando también interferencias debidas al cambio drástico de viscosidad.

A continuación, se determinó la concentración de antibiótico en las soluciones de miel, obteniéndose señales indicativas a la presencia de oxitetraciclina, pero, como se esperaba después de la prueba de interferentes, los resultados en cuanto a linealidad de la curva de calibración fueron diferentes a la obtenida con las soluciones de buffer fosfato.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en cada uno de los estudios llevados a cabo, se puede concluir que el sistema de detección cumple con la hipótesis planteada al inicio. La inmovilización de la enzima peroxidasa del rábano picante en nanopartículas de plata sirvió para el desarrollo de un electrodo capaz de detectar fácilmente la presencia de oxitetraciclina a través de la oxidación del grupo fenólico presente en este antibiótico, con un límite de detección bajo que se encuentra en el rango de presencia de residuos de OTC. Adicionalmente, el uso de nanopartículas de plata mejoró la inmovilización respecto a la falta de ellas, al tener mayor actividad enzimática con el reuso y al aumentar la estabilidad de detección respecto al tiempo de uso.

Si bien, como método de análisis cuantitativo presenta detalles que pueden mejorarse en cuanto a mayor selectividad al aplicarse con miel de abeja, resulta efectivo como punto de partida para el desarrollo de un biosensor.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, T., Mir, I. A., Kumar, D., & Rajesh. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. In *Biomaterials* (Vol. 28, Issue 5, pp. 791–805). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.046>
- Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Usmani, S., Al-Waili, N., Nuru, A., Sharma, D., Khan, K. A., Kaur, M., & Omer, M. (2016). In vitro evaluation of the effects of some plant essential oils on *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 49–55. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1086690>
- Arechavaleta-Velasco, M. E., García-Figueroa, C., Alvarado-Avila, L. Y., Ramírez-Ramírez, F. J., & Alcalá-Escamilla, K. I. (2021). Resultados e impacto de la investigación en genética y mejoramiento genético de las abejas melíferas desarrollada por el INIFAP en México. In *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias* (Vol. 12, pp. 224–242). INIFAP-CENID Parasitología Veterinaria. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5919>
- Arribillaga, M. (2021). *Manejo de la loque americana en Argentina, desde su introducción a la actualidad* [Universidad Nacional de La Plata]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/122658>
- Asal, M., Özen, Ö., Şahinler, M., Baysal, H. T., & Polatoğlu, İ. (2019). An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors. In *Sensor Review* (Vol. 39, Issue 3, pp. 377–386). Emerald Group Holdings Ltd. <https://doi.org/10.1108/SR-04-2018-0084>
- Asif, M., Aziz, A., Azeem, M., Wang, Z., Ashraf, G., Xiao, F., Chen, X., & Liu, H. (2018). A review on electrochemical biosensing platform based on layered double hydroxides for small molecule biomarkers determination. *Advances in Colloid and Interface Science*, 262, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.001>
- Babu, V. R. S., Patra, S., Karanth, N. G., Kumar, M. A., & Thakur, M. S. (2007). Development of a biosensor for caffeine. *Analytica Chimica Acta*, 582(2), 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.017>
- Baghayeri, M., Amiri, A., & Farhadi, S. (2016). Development of non-enzymatic glucose sensor based on efficient loading Ag nanoparticles on functionalized carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.003>
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2015). Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry*, 478, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011>
- Berezhetsky, A. L., Sosovska, O. F., Durrieu, C., Chovelon, J.-M., Dzyadevych, S. V., & Tran-Minh, C. (2008). Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. *IRBM*, 29(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2007.12.007>
- Boonsaner, M., & Hawker, D. W. (2013). Evaluation of food chain transfer of the antibiotic oxytetracycline and human risk assessment. *Chemosphere*, 93(6). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.070>

- Brajovic, F. (2020). *Todo sobre cromatografía líquida con espectrometría de masas*. Cromtek. <https://www.cromtek.cl/2020/07/22/todo-sobre-cromatografia-liquida-con-espectrometria-de-masas/>
- Cai, H., Xu, Y., Zhu, N., He, P., & Fang, Y. (2002). An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label. *The Analyst*, 127(6), 803–808. <https://doi.org/10.1039/b200555g>
- Casado-Terrones, S., Segura-Carretero, A., Busi, S., Dinelli, G., & Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection. *Electrophoresis*, 28(16), 2882–2887. <https://doi.org/10.1002/elps.200600614>
- Chaiyo, S., Apiluk, A., Siangproh, W., & Chailapakul, O. (2016). High sensitivity and specificity simultaneous determination of lead, cadmium and copper using μ PAD with dual electrochemical and colorimetric detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233, 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.109>
- Chemistry LibreTexts. (2020). *Horseradish Peroxidase*. <https://chem.libretexts.org/@go/page/400>
- Chen, Z., Dinh, H. N., & Miller, E. (2013). *Photoelectrochemical water splitting: standards, experimental methods, and protocols* (1st ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8298-7>
- Chi, M. N., & Wilhad M. R. (2015). Analysis of Sugars in Honey Using the PerkinElmer Altus HPLC System with RI Detection. In *Liquid Chromatography*. PerkinElmer Inc.
- Chilumuru Rama, M., Mohana, R., Lakkineni Cyril, A., & Chandra Bala, S. (2015). Quantitative analysis of oxytetracycline Residues in honey by high performance liquid chromatography. *International Research Journal of Biological Sciences*, 4(5), 59–65. <http://www.isca.in/IJBS/Archive/v4/i5/12.ISCA-IRJBS-2015-038.pdf>
- Chopin, M. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: Técnica analítica de separación de analitos. *Revista Tecnología y Salud*, 1(2), 86–89. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2012/ir122g.pdf>
- Codex Alimentarius Commission. (1981). Revised Codex Standard for Honey Codex Stan. *Codex Standard*, 12, 1–7.
- Collings, A. F., & Caruso, F. (1997). Biosensors: recent advances. *Reports on Progress in Physics*, 60(11). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/60/11/005>
- Dall'Orto, V. C., Vago, J. M., Carballo, R. R., & Rezzano, I. N. (2005). Comparison of Tyrosinase Biosensor and Colorimetric Method for Polyphenol Analysis in Different Kinds of Teas. *Analytical Letters*, 38(1), 19–33. <https://doi.org/10.1081/AL-200043435>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Davis, J. L. (2018). Pharmacologic Principles. In *Equine Internal Medicine*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44329-6.00002-4>
- de Groot, G., Mayoral, A., & Huerta, G. J. (2018). ¿Cómo prevenir Loque Americana en nuestras colmenas? *Presencia*, 29(69), 31–35. https://inta.gob.ar/sites/default/files/rev_presencia_n_69_reducida.pdf
- Dieguez, S., Soraci, A., Bedascarrasbure, E., & Libonatti, C. (2002). Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31(1), 159–165.
- Dornelles Mello, L., & Tatsuo Kubota, L. (2002). Review of the use of biosensors as

- analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77, 237–256. www.elsevier.com/locate/foodchem
- D'Souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 337–353. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00125-7)
- Eissa, S., Siaj, M., & Zourob, M. (2015). Aptamer-based competitive electrochemical biosensor for brevetoxin-2. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.01.055>
- Enrico, D. L., Manera, M. G., Montagna, G., Cimaglia, F., Chiesa, M., Poltronieri, P., Santino, A., & Rella, R. (2013). SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples. *Optics Communications*, 294, 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2012.12.064>
- Famulok, M., Mayer, G., & Blind, M. (2000). Nucleic Acid Aptamers From Selection in Vitro to Applications in Vivo. *Accounts of Chemical Research*, 33(9), 591–599. <https://doi.org/10.1021/ar960167q>
- Fei, A., Liu, Q., Huan, J., Qian, J., Dong, X., Qiu, B., Mao, H., & Wang, K. (2015). Label-free impedimetric aptasensor for detection of femtomole level acetamiprid using gold nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotube-reduced graphene oxide nanoribbon composites. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.028>
- Fiorito, P. A., Gonçalves, V. R., Ponzio, E. A., & de Torresi, S. I. C. (2005). Synthesis, characterization and immobilization of Prussian blue nanoparticles. A potential tool for biosensing devices. *Chem. Commun.*, 3, 366–368. <https://doi.org/10.1039/B412583E>
- Flores B., E. (1995). Voltametría cíclica: la espectroscopía electroquímica. Parte I. *Revista de Química*, 9(2), 165–172.
- Gagner, J. E., Lopez, M. D., Dordick, J. S., & Siegel, R. W. (2011). Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function. *Biomaterials*, 32(29), 7241–7252. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.091>
- Gakiya-Teruya, M., Palomino-Marcelo, L., & Rodriguez-Reyes, J. (2018). Synthesis of Highly Concentrated Suspensions of Silver Nanoparticles by Two Versions of the Chemical Reduction Method. *Methods and Protocols*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.3390/mps2010003>
- Gallo, A., Landi, R., Rubino, V., di Cerbo, A., Giovazzino, A., Palatucci, A. T., Centenaro, S., Guidetti, G., Canello, S., Cortese, L., Ruggiero, G., Alessandrini, A., & Terrazzano, G. (2017). Oxytetracycline induces DNA damage and epigenetic changes: a possible risk for human and animal health? *PeerJ*, 5, 32–36. <https://doi.org/10.7717/peerj.3236>
- García García, M., Ríos Osorio, L. A., & Álvarez del Castillo, J. (2016). La polinización en los sistemas de producción agrícola: revisión sistemática de la literatura. *Idesia (Arica)*, 34(3), 53–68. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016000300008>
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16). <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
- Gaudin, V. (2017). Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 90, pp. 363–377). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.005>
- Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S.,

- Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., & Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, *41*(3), 332–352. <https://doi.org/10.1051/apido/2010014>
- Ghodsi, J., Rafati, A. A., & Shoja, Y. (2015). First report on electrocatalytic oxidation of oxytetracycline by horse radish peroxidase: Application in developing a biosensor to oxytetracycline determination. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *224*, 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.091>
- Ghodsi, J., Rafati, A. A., & Shoja, Y. (2016). First report on electrocatalytic oxidation of oxytetracycline by horse radish peroxidase: Application in developing a biosensor to oxytetracycline determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *224*. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.091>
- González, S., Tamayo, J., Vargas L., & Sauri, E. (2011). Permanencia de antibióticos en la miel de Tahonal (*Viguiera Dentata*) y su impacto en algunos factores de calidad. *Revista Mexicana de Agronegocios*, *28*, 567–574.
- Gunes, M. E., Gunes, N., & Cibik, R. (2009). Oxytetracycline and sulphonamide residues analysis of honey samples from southern Marmara region in Turkey. *Bulg. J. Agric. Sci.*, *15*, 163–167.
- Gupta, M. N., Kaloti, M., Kapoor, M., & Solanki, K. (2011). Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, *39*(2), 98–109. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.516259>
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2014). Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases. *Molecules*, *19*(7), 8995–9018. <https://doi.org/10.3390/molecules19078995>
- Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S., & Tkac, J. (2016). Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 69–80. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>
- Harwood, G. W. J., & Pouton, C. W. (1996). Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drugs and metabolites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *18*(2), 163–191. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00093-M](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00093-M)
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*, *6*(4), 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Huang, J., Xie, Z., Xie, Z., Luo, S., Xie, L., Huang, L., Fan, Q., Zhang, Y., Wang, S., & Zeng, T. (2016). Silver nanoparticles coated graphene electrochemical sensor for the ultrasensitive analysis of avian influenza virus H7. *Analytica Chimica Acta*, *913*, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.050>
- Ichimura, K., & Watanabe, S. (1982). Preparation and characteristics of photocross-linkable poly(vinyl alcohol). *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, *20*(6), 1419–1432. <https://doi.org/10.1002/pol.1982.170200605>
- Jung, I. Y., Kim, J. S., Choi, B. R., Lee, K., & Lee, H. (2017). Hydrogel Based Biosensors for In Vitro Diagnostics of Biochemicals, Proteins, and Genes. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 6, Issue 12). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601475>
- Justino, C., Duarte, A., & Rocha-Santos, T. (2017). Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. *Sensors*, *17*(12), 2918. <https://doi.org/10.3390/s17122918>

- Kang, X. bin, Pang, G. C., Liang, X. Y., Wang, M., Liu, J., & Zhu, W. M. (2012). Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan. *Electrochimica Acta*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.12.034>
- Karim, Z., Adnan, R., & Ansari, M. S. (2012). Low Concentration of Silver Nanoparticles Not Only Enhances the Activity of Horseradish Peroxidase but Alter the Structure Also. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041422>
- Karim, Z., Khan, M. J., Maskat, M. Y., & Adnan, R. (2016). Immobilization of horseradish peroxidase on β -cyclodextrin-capped silver nanoparticles: Its future aspects in biosensor application. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(4), 321–327. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1031389>
- Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2019). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 1823–1838. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>
- Khoobi, M., Motevalizadeh, S. F., Asadgol, Z., Forootanfar, H., Shafiee, A., & Faramarzi, M. A. (2015). Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. *Materials Chemistry and Physics*, 149–150, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.09.039>
- Kim, J., Jeeran, I., Imani, S., Cho, T. N., Bandodkar, A., Cinti, S., Mercier, P. P., & Wang, J. (2016). Noninvasive Alcohol Monitoring Using a Wearable Tattoo-Based Iontophoretic-Biosensing System. *ACS Sensors*, 1(8), 1011–1019. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00356>
- Kimmel, D. W., LeBlanc, G., Meschievitz, M. E., & Cliffel, D. E. (2012). Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry*, 84(2), 685–707. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>
- Korotkaya, E. v. (2014). Biosensors: Design, classification, and applications in the food industry. *Foods and Raw Materials*, 2(2), 161–171. <https://doi.org/10.12737/5476>
- Krainer, F. W., & Glieder, A. (2015). An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4). <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>
- Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, A. A., Olenin, A. Y., & Lisichkin, G. v. (2008). Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*, 77(3), 233–257. <https://doi.org/10.1070/RC2008v077n03ABEH003751>
- Kumar, A. (2000). Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application. *JOM-e*, 52(10).
- Kumar, J. V., Karthik, R., Chen, S.-M., Muthuraj, V., & Karuppiah, C. (2016). Fabrication of potato-like silver molybdate microstructures for photocatalytic degradation of chronic toxicity ciprofloxacin and highly selective electrochemical detection of H₂O₂. *Scientific Reports*, 6(1), 34149. <https://doi.org/10.1038/srep34149>
- Kwong, A. W. K., Gründig, B., Hu, J., & Renneberg, R. (2000). Comparative study of hydrogel-immobilized l-glutamate oxidases for a novel thick-film biosensor and its application in food samples. *Biotechnology Letters*, 22(4), 267–272. <https://doi.org/10.1023/A:1005694704872>
- Lata, J. P., Gao, L., Mukai, C., Cohen, R., Nelson, J. L., Anguish, L., Coonrod, S., & Travis, A. J. (2015). Effects of Nanoparticle Size on Multilayer Formation and Kinetics of Tethered Enzymes. *Bioconjugate Chemistry*, 26(9), 1931–1938. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00354>

- Lewkowski, O., & Erler, S. (2019). Virulence of *Melissococcus plutonius* and secondary invaders associated with European foulbrood disease of the honey bee. *MicrobiologyOpen*, 8(3), e00649. <https://doi.org/10.1002/mbo3.649>
- Li, Z., Miao, X., Xing, K., Peng, X., Zhu, A., & Ling, L. (2016). Ultrasensitive electrochemical sensor for Hg²⁺ by using hybridization chain reaction coupled with Ag@Au core-shell nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.074>
- Liu, B., & Liu, J. (2019). Sensors and biosensors based on metal oxide nanomaterials. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 121). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115690>
- Liu, D.-M., & Dong, C. (2020). Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. *Process Biochemistry*, 92, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.005>
- Liu, L., Deng, D., Sun, W., Yang, X., Yang, S., & He, S. (2018). Electrochemical biosensors with electrocatalysts based on metallic nanomaterials as signal labels. *International Journal of Electrochemical Science*, 13(11), 10496–10513. <https://doi.org/10.20964/2018.11.47>
- Liu, R., Huang, Y., Ma, Y., Jia, S., Gao, M., Li, J., Zhang, H., Xu, D., Wu, M., Chen, Y., Zhu, Z., & Yang, C. (2015). Design and Synthesis of Target-Responsive Aptamer-Cross-linked Hydrogel for Visual Quantitative Detection of Ochratoxin A. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(12), 6982–6990. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01120>
- Lopes, G. R., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2014). Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. *RSC Adv.*, 4(70), 37244–37265. <https://doi.org/10.1039/C4RA06094F>
- López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2005). Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*, 119(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.021>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Luo, X., Morrin, A., Killard, A. J., & Smyth, M. R. (2006). Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Electroanalysis*, 18(4). <https://doi.org/10.1002/elan.200503415>
- Maduraiveeran, G., & Jin, W. (2017). Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications. In *Trends in Environmental Analytical Chemistry* (Vol. 13, pp. 10–23). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2017.02.001>
- Maduraiveeran, G., & Ramaraj, R. (2009). Potential Sensing Platform of Silver Nanoparticles Embedded in Functionalized Silicate Shell for Nitroaromatic Compounds. *Analytical Chemistry*, 81(18), 7552–7560. <https://doi.org/10.1021/ac900781d>
- Mahmoudi, R., Mahmoudi, R., Moosavy, M., Norian, R., Kazemi, S., Reza, M., Nadari, A., & Mardani, K. (2014). Detection of Oxytetracycline Residues in Honey Samples Using ELISA and HPLC Methods. *Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 145–150. <http://pharm-sci.tbzmed.ac.ir>
- Mahmoudi, R., Moosavy, M., Norian, R., Kazemi, S., Asadi Nadari, M., & Mardani, K. (2014). Detection of oxytetracycline residues in honey samples using elisa and hplc

- methods. *Pharmaceutical Sciences*, 19(4), 145–150.
- Malhotra, B. D., & Ali, Md. A. (2018). Nanomaterials in Biosensors. In *Nanomaterials for Biosensors*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7>
- Mani, P., Fidal, V. T., Keshavarz, T., Chandra, T. S., & Kyazze, G. (2021). Laccase Immobilization Strategies for Application as a Cathode Catalyst in Microbial Fuel Cells for Azo Dye Decolourization. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.620075>
- Masood, F., Thebeau, J. M., Cloet, A., Kozii, I. v., Zabrodski, M. W., Biganski, S., Liang, J., Marta Guarna, M., Simko, E., Ruzzini, A., & Wood, S. C. (2022). Evaluating approved and alternative treatments against an oxytetracycline-resistant bacterium responsible for European foulbrood disease in honey bees. *Scientific Reports*, 12(1), 5906. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09796-4>
- McRipley, M. A., & Linsenmeier, R. A. (1996). Fabrication of a mediated glucose oxidase recessed microelectrode for the amperometric determination of glucose. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 414(2), 235–246. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(96\)04692-X](https://doi.org/10.1016/0022-0728(96)04692-X)
- Mishra, G., Barfidokht, A., Tehrani, F., & Mishra, R. (2018). Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors. *Foods*, 7(9), 141. <https://doi.org/10.3390/foods7090141>
- Mohammad-Razdari, A., Ghasemi-Varnamkhasi, M., Izadi, Z., Rostami, S., Ensafi, A. A., Siadat, M., & Losson, E. (2019). Detection of sulfadimethoxine in meat samples using a novel electrochemical biosensor as a rapid analysis method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103252. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103252>
- Mohanty, S. P., & Kougiannos, E. (2006). Biosensors: a tutorial review. *IEEE Potentials*, 25(2), 35–40. <https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>
- Monošík, R., Stredánský, M., & Šturdík, E. (2012). Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 109–120. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>
- Moore, C. M., Akers, N. L., Hill, A. D., Johnson, Z. C., & Minter, S. D. (2004). Improving the Environment for Immobilized Dehydrogenase Enzymes by Modifying Nafion with Tetraalkylammonium Bromides. *Biomacromolecules*, 5(4). <https://doi.org/10.1021/bm0345256>
- National Center for Biotechnology Information. (2021). *PubChem Compound Summary for CID 54675779, Oxytetracycline*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxytetracycline>.
- Neethirajan, S., Ragavan, V., Weng, X., & Chand, R. (2018). Biosensors for Sustainable Food Engineering: Challenges and Perspectives. *Biosensors*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/bios8010023>
- Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6). <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>
- Owens, P. (1999). Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(3), 146–154. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00092-2)
- Papich, M. G. (2016). Oxytetracycline. In *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00433-2>
- Pellegrini, M. C., Alonso-Salces, R. M., Umpierrez, M. L., Rossini, C., & Fuselli, S. R. (2017). Chemical Composition, Antimicrobial Activity, and Mode of Action of

- Essential Oils against *Paenibacillus larvae*, Etiological Agent of American Foulbrood on *Apis mellifera*. *Chemistry & Biodiversity*, 14(4), e1600382. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600382>
- Petković, H., Lukežič, T., & Šušković, J. (2017). Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*: Past, Present and Future Directions in the Development of Tetracycline Antibiotics. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1). <https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4617>
- Pickens, L. B., & Tang, Y. (2010). Oxytetracycline Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36). <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.130419>
- Piccolo, M., Aceto, M., & Vitorino, T. (2019). UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, 4(4), 1–14. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0008>
- Raghu, P., Madhusudana Reddy, T., Reddaiah, K., Jaidev, L., & Narasimha, G. (2013). A novel electrochemical biosensor based on Horseradish Peroxidase immobilized on Ag-nanoparticles / Poly (L-Arginine) modified carbon paste electrode toward the determination of pyrogallol/hydroquinone. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(6–7), 377–385.
- Ramos Díaz, A. L., & Pacheco López, N. A. (2016). *Producción y comercialización de miel y sus derivados en México: Desafíos y oportunidades para la exportación* (A. Ramos Díaz & N. Pacheco López, Eds.; 1st ed., Vol. 1). Ciatej-Conacyt. https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5f243ecb97f89.pdf
- Rank, M., Danielsson, B., & Gram, J. (1992). Implementation of a thermal biosensor in a process environment: on-line monitoring of penicillin V in production-scale fermentations. *Biosensors and Bioelectronics*, 7(9), 631–635. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(92\)85020-B](https://doi.org/10.1016/0956-5663(92)85020-B)
- Reybroeck, W. (2018). Residues of antibiotics and chemotherapeutics in honey. *Journal of Apicultural Research*, 57(1). <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338129>
- Rogers, K. R. (2006). Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 568(1–2), 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.067>
- Rok, J., Wrześniok, D., Beberok, A., Otręba, M., Delijewski, M., & Buszman, E. (2018). Phototoxic effect of oxytetracycline on normal human melanocytes. *Toxicology in Vitro*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.008>
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747. <https://doi.org/10.1039/b714449k>
- Roth, L. A., Kwan, S., & Sporns, P. (1986). Use of a Disc-Assay System to Detect Oxytetracycline Residues in Honey. *Journal of Food Protection*, 49(6), 436–441. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.6.436>
- SAGARPA. (2018). *Buenas prácticas pecuarias en la producción primaria de miel*.
- SAGARPA. (2021a). *Manual de patología Apícola* (Coordinación general de ganadería, Ed.).
- SAGARPA. (2021b). *Procedimiento para la Operación del Programa Nacional de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos en Miel*.
- Sanjana, S., Medha, M. U., Meghna, M. R., Shruthi, T. S., Srinivas, S. P., Madhyastha, H., Navya, P. N., & Daima, H. K. (2019). Enzyme immobilization on quercetin capped gold and silver nanoparticles for improved performance. *Materials Today: Proceedings*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.02.193>
- Sardar, M., & Gupta, M. N. (2005). Immobilization of tomato pectinase on Con A–Seralose

- 4B by bioaffinity layering. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3), 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.007>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012a). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012b). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- Secretaría rural. (2020, May 20). *La apicultura en México*. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-apicultura-en-mexico?idiom=es>
- Sepunaru, L., Plowman, B. J., Sokolov, S. v., Young, N. P., & Compton, R. G. (2016). Rapid electrochemical detection of single influenza viruses tagged with silver nanoparticles. *Chemical Science*, 7(6), 3892–3899. <https://doi.org/10.1039/C6SC00412A>
- Serrano, E. C. (n.d.). *POLÍMEROS INTELIGENTES Y APLICACIONES Informe de Vigilancia Tecnológica*.
- Shaif Mohammed Kasem Saleh, Amer Mohammed Mussaed, & Fadhl Mohammed Al-Hariri. (2016). Determination of Tetracycline and Oxytetracycline Residues in Honey by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 6(2), 135–139. <https://doi.org/10.17265/2161-6264/2016.02.009>
- Sharifi, M., Sohrabi, M. J., Hosseinali, S. H., Hasan, A., Kani, P. H., Talaei, A. J., Karim, A. Y., Nanakali, N. M. Q., Salihi, A., Aziz, F. M., Yan, B., Khan, R. H., Saboury, A. A., & Falahati, M. (2020). Enzyme immobilization onto the nanomaterials: Application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.064>
- SIAP. (2021). *Panorama agroalimentario*.
- Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 79). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>
- Situmorang, M., Hibbert, D. B., Gooding, J. J., & Barnett, D. (1999). A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis. *The Analyst*, 124(12), 1775–1779. <https://doi.org/10.1039/a907239j>
- Skoog, D. A., Holler, F., & Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6th ed.). Cengage Learning.
- Spadiut, O., & Herwig, C. (2013). Production and purification of the multifunctional enzyme horseradish peroxidase. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 1(3), 283–295. <https://doi.org/10.4155/pbp.13.23>
- Sporns, P., Kwan, S., & Roth, L. A. (1986). HPLC Analysis of Oxytetracycline Residues in Honey. *Journal of Food Protection*, 49(5), 383–388. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.5.383>
- Valadez, A., Lana, C., Tu, S.-I., Morgan, M., & Bhunia, A. (2009). Evanescent Wave Fiber Optic Biosensor for Salmonella Detection in Food. *Sensors*, 9(7), 5810–5824. <https://doi.org/10.3390/s90705810>
- van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., de Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., & Robbens, J. (2010). Recent advances in recognition elements of food and

- environmental biosensors: A review. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 26, Issue 4, pp. 1178–1194). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.033>
- Vashist, S. K., & Luong, J. H. T. (2018). Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays. In *Handbook of Immunoassay Technologies*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9>
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Velasco-Garcia, M. N. (2009). Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.01.013>
- Vo-Dinh, T., Cullum, B. M., & Stokes, D. L. (2001). Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 74(1–3), 2–11. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00705-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00705-X)
- Wang, P., Bashiri, G., Gao, X., Sawaya, M. R., & Tang, Y. (2013). Uncovering the Enzymes that Catalyze the Final Steps in Oxytetracycline Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 135(19). <https://doi.org/10.1021/ja403516u>
- Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., & Willner, I. (2003). “Plugging into Enzymes”: Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science*, 299(5614), 1877–1881. <https://doi.org/10.1126/science.1080664>
- Xing, S., Xu, H., Chen, J., Shi, G., & Jin, L. (2011). Nafion stabilized silver nanoparticles modified electrode and its application to Cr(VI) detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 652(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.03.035>
- Xu, J.-J., Zhao, W., Luo, X.-L., & Chen, H.-Y. (2005). A sensitive biosensor for lactate based on layer-by-layer assembling MnO₂ nanoparticles and lactate oxidase on ion-sensitive field-effect transistors. *Chemical Communications*, 6, 792. <https://doi.org/10.1039/b416548a>
- Xu, S., Huang, X., Chen, Y., Liu, Y., Zhao, W., Sun, Z., Zhu, Y., Liu, X., & Wong, C. P. (2019). Silver Nanoparticle-Enzyme Composite Films for Hydrogen Peroxide Detection. *ACS Applied Nano Materials*, 2(9), 5910–5921. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01346>
- Xu, Y., Liu, X., Ding, Y., Luo, L., Wang, Y., Zhang, Y., & Xu, Y. (2011). Preparation and electrochemical investigation of a nano-structured material Ni²⁺/MgFe layered double hydroxide as a glucose biosensor. *Applied Clay Science*, 52(3), 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.03.011>
- Xu, Z., Liu, X.-W., Ma, Y.-S., & Gao, H.-W. (2010). Interaction of nano-TiO₂ with lysozyme: insights into the enzyme toxicity of nanosized particles. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 798–806. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0153-1>
- Xu, Z., Yi, X., Wu, Q., Zhu, Y., Ou, M., & Xu, X. (2016). First report on a BODIPY-based fluorescent probe for sensitive detection of oxytetracycline: Application for the rapid determination of oxytetracycline in milk, honey and pork. *RSC Advances*, 6(92), 89288–89297. <https://doi.org/10.1039/c6ra19459a>
- Yang, S., Li, Y., Jiang, X., Chen, Z., & Lin, X. (2006). Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.07.035>
- Yoo, E.-H., & Lee, S.-Y. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*, 10(5), 4558–4576. <https://doi.org/10.3390/s100504558>

- Yu, S., Yin, Y., & Liu, J. (2013). Silver nanoparticles in the environment. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 15(1), 78–92. <https://doi.org/10.1039/C2EM30595J>
- Zaydan, R., Dion, M., & Boujtita, M. (2004). Development of a New Method, Based on a Bioreactor Coupled with an L-Lactate Biosensor, toward the Determination of a Nonspecific Inhibition of L-Lactic Acid Production during Milk Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 8–14. <https://doi.org/10.1021/jf0343985>
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/catal8020092>
- Zhang, B., He, Y., Liu, B., & Tang, D. (2014). NiCoBP-doped carbon nanotube hybrid: A novel oxidase mimetic system for highly efficient electrochemical immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 851, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.026>

APÉNDICE

A.1 MÉTODOS EMPLEADOS

En este capítulo se incluye la descripción de las técnicas y equipos utilizados.

A.1.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Método de microscopía electrónica, ofrece una resolución superior a la microscopía óptica clásica que está limitada por los efectos de difracción respecto a la longitud de onda de la luz. Proporciona imágenes de la morfología externa de las muestras.

Para obtener una imagen SEM, se enfoca un fino haz de electrones sobre la superficie sólida que, con ayuda de instrumentos análogos, pasa por la muestra en un barrido de trama mediante bobinas de barrido. El patrón de barrido resultante es similar al que se usa en el tubo de rayos catódicos de un televisor.

En los instrumentos análogos, el haz de electrones barre la superficie en línea recta en dirección “x”, vuelve a la posición inicial y se desplaza hacia abajo en la dirección “y” durante un incremento estándar. Al recibir la señal por encima de la superficie (dirección “y”) se almacena en una computadora donde se convierte en imagen. Instrumentos más recientes consiguen el mismo efecto mediante control digital para ubicar el haz sobre la muestra.

En este proceso se producen varias señales: electrones retrodispersados, secundarios y Auger, fotones (debido a la fluorescencia de rayos X) y entre otros fotones. Los instrumentos de espectroscopía electrónica de barrido utilizan la detección de los electrones retrodispersados y secundarios para construir la imagen final. (Skoog et al., 2008)

A.1.1 Uv-vis (luz ultravioleta-visible)

Las mediciones en esta espectroscopia se basan en la excitación de los electrones más externos de los

átomos, los cuales están involucrados en la región UV-Vis y se realizan generalmente en los modos de transmitancia, reflectancia y fotoluminiscencia. La transmitancia y reflectancia debe medirse con un material de referencia. (Picollo et al., 2019)

La absorción de luz en una medición, en función de la longitud de onda, proporciona información sobre las transiciones electrónicas que ocurren en el material. La fracción de luz transmitida se describe por ley de Beer-Lambert (ecuación A.1), la cual establece que la medición de la fracción de la luz después de la interacción con la muestra (I , transmitancia o

reflectancia) frente a la intensidad incidente (I_0) depende de: la longitud de trayectoria de la luz a través de la muestra (l), la sección transversal de absorción (r) y la diferencia en la población del estado inicial (N_1) y el estado final (N_2) de los niveles de energía electrónica inicial (E_1) y final (E_2). De la ecuación, A es la absorbancia, ϵ coeficiente de absorción del material, c concentración de las especies absorbentes e l la longitud de trayectoria a través de la muestra. (Chen et al., 2013)

$$A = \epsilon cl = -\log \frac{I}{I_0} \quad (\text{A.1})$$

A.1.2 Detalles del procedimiento

Para un correcto análisis se deben establecer las condiciones de trabajo que generen reproducibilidad, preferentemente lineal, entre la absorbancia y concentración de analito.

- Selección de longitud de onda: Por lo regular las medidas de absorbancia se hacen a una longitud de onda que corresponda a un pico de absorción, ya que en ésta el cambio de absorbancia/unidad de concentración es mayor.
- Variables que influyen en la absorbancia: Estos efectos deben conocerse para elegir las condiciones que mantengan al mínimo las variaciones para el análisis. Las variables comunes se encuentran en la naturaleza del solvente, pH de la solución, temperatura, altas concentraciones de electrolito y presencia de sustancias que interfieren.
- Limpieza y manipulación de las celdas: Es necesario el uso de cubetas ajustadas de buena calidad, éstas deben calibrarse con regularidad una respecto a la otra. Se recomienda la siguiente secuencia de limpieza para las caras externas de las celdas: antes de la medición, las superficies se limpian con un papel para lentes empapado con metanol para espectrometría; dicho papel se sostiene con una pinza para efectuar la limpieza y se deja secar el metanol. (Skoog et al., 2008)

A.1.3 Voltametría

Con estos métodos se deduce información del analito a partir de la medición de corriente en función al potencial aplicado, en condiciones donde se favorece la polarización de un electrodo indicador o de trabajo. La amperometría es una técnica donde la corriente, proporcional a la concentración del analito, se controla a un potencial fijo.

El funcionamiento se da a partir de la aplicación de una señal de excitación de potencial variable (o fijo en amperometría) a un electrodo de trabajo en una celda electroquímica. Esta señal de excitación causa una respuesta de corriente característica (cantidad mensurable en este método) que se desarrolla en la celda; esta corriente se registra entonces en función del tiempo, que por ende se da en función del voltaje aplicado.

Electrodo polarizado es aquel al que se le ha aplicado un voltaje superior al pronosticado por la ecuación de Nernst para hacer que haya oxidación o reducción. (Skoog et al., 2008)

A.1.3.1 Voltametría cíclica

Mediante esta voltametría podemos tener información cualitativa de los procesos de transferencia de electrones; estudiar el comportamiento de un par redox; determinar el número de electrones transferidos en una oxidación o reducción y el mecanismo de la reacción, entre otros.

A.1.3.2 Diseño del equipo:

Las partes que componen el equipo son:

A.1.3.2.1 Celda de trabajo

El equipo se compone de una celda con electrodos. La celda presenta 5 orificios: 3 en donde se colocan los electrodos, uno por donde se puede introducir gas inerte de requerirse y otro por donde se coloca el electrolito y muestra a analizar.

Se utilizan 3 electrodos:

- **Trabajo:** donde tienen lugar las reacciones de interés, está hecho de un material inerte.
- **Referencia:** tiene un potencial conocido. El potencial del electrodo de trabajo es medido versus este electrodo.
- **Auxiliar o contraelectrodo:** generalmente es de un material inerte, la corriente fluye entre éste y el electrodo de trabajo.
- **Potenciostato:** Es en donde son conectadas las terminales de los electrodos, controla el potencial del electrodo de trabajo y mide la corriente resultante.

A.1.3.2.2 Electrolito

Solución que se añade para evitar corrientes de migración, causadas por el movimiento de partículas cargadas en el campo eléctrico, y asegurar la conductividad. (Flores B., 1995)

A.1.3.3 Electrodo de trabajo

Tienen una variedad de configuraciones y formas. Uno de ellos es: pequeños discos planos de un conductor que se montan en una varilla de material inerte, como Teflón o Kel-F, y tiene incorporado un alambre de contacto. El material conductor puede ser metales nobles como platino u oro; material de carbono como pasta de carbono, fibra de carbono, grafito pirolítico o carbono vítreo, diamante o nanotubos de carbono; semiconductores como estaño u óxido de indio (otro ejemplo podría ser un metal revestido con una película de mercurio).

El intervalo de potenciales utilizado en soluciones acuosas varía y depende de ciertas características como el material del electrodo o composición de la solución en que está sumergido. Los límites de los potenciales positivos pueden ser causadas por corrientes elevadas provocadas por la oxidación del agua, dando oxígeno molecular. Y los límites negativos se deben a la reducción del agua para producir hidrógeno. (Skoog et al., 2008)

A.1.3.3 Electrodo de referencia

El papel de este electrodo en general es permanecer a un potencial constante sin importar las propiedades del electrodo de trabajo y de la solución que se está midiendo. Es crucial la separación de los electrodos de referencia y trabajo para una medición precisa (Kimmel et al., 2012).

A.2 Ecuaciones ensayo enzimático

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml enzima}} = \frac{(\Delta A_{420}/20\text{secTestSample} - \Delta A_{420}/20\text{secBlank})(c)(df)}{(\varepsilon)(ve)} \quad (\text{A.2})$$

Donde:

df = factor de dilución

ε = 12 (determinado internamente), coeficiente de extinción de 1 mg/mL de purpurogalina a 420nm

ve = volumen (en mililitros) de enzima usada

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg sólido}} = \frac{\text{unidades/ml enzima}}{\text{mg sólido/ml enzima}} \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg proteína}} = \frac{\text{unidades/ml enzima}}{\text{mg proteína/ml enzima}} \quad (\text{A.4})$$

A.3 AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al laboratorio de biosensores de la universidad autónoma de Querétaro, campus aeropuerto, por el apoyo en el uso de instalaciones, equipo y materiales empleados en el presente proyecto.

Así como al proyecto FOPER: fondo de proyectos especiales de rectoría, por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto de tesis.

A.4 LOGROS DEL PROYECTO

- Financiamiento de la universidad autónoma de Querétaro mediante programa “FOPER 2021”



FOPER-2021-FIN02437

“Inmovilización de peroxidasa del rábano picante sobre nanopartículas de plata para detección de oxitetraciclina en miel de abeja.”

RESPONSABLE ALUMNO(A): CITLALI ARACELI ROSALES GARCÍA
FACULTAD: INGENIERÍA
SEMESTRE: 10
ASESOR(A) DOCENTE: ALEJANDRA ÁLVAREZ LÓPEZ



- Participación en el XVII congreso internacional de ingeniería “CONiIN”



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



FACULTAD
DE INGENIERÍA



CONCYTEQ



CONACYT

CONiIN
XVIII INTERNATIONAL ENGINEERING
CONGRESS

THE QUERÉTARO STATE UNIVERSITY THROUGH THE ENGINEERING
FACULTY GRANT THE PRESENT ACKNOWLEDGMENT TO:

**Citali Araceli Rosales-García, Vanessa Vallejo-Becerra, Alejandra Álvarez y
Juan de Dios Galindo de la Rosa**

CONFERENCE:

**Immobilization of horseradish peroxidase on silver nanoparticles for
detection of Oxytetracycline in honey**

QUERÉTARO, MEX.
MAY 2022

Dr. Manuel Toledano Ayala
PRINCIPAL
ENGINEERING FACULTY

Dr. Gonzalo Macías Bobadilla
GENERAL COORDINATOR CONiIN
ENGINEERING FACULTY