



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
 UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

**SOLICITUD DE TÉRMINO
 DE SERVICIO SOCIAL**

Mtra. María Elena Contreras Garfias
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
 PRESENTE



Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	4	8	2022				

Datos del Alumno

Nombre : Samantha Moreno Jiménez
 Matrícula : 2152028372 Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
 Domicilio : Sur 141 #1623, Col. Gabriel Ramos Millán, C.P 08020, Municipio Iztacalco
 Teléfono : 58036823 Celular : 5576181637
 Correo Electrónico : samrmmmt@hotmail.com CURP : MOJS960520MPLRMM03

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Determinación de Antioxidantes en Nutraceuticos y Medicamentos Utilizando Biosensores.
 Lugar donde se realizó el Servicio Social : Departamento de Sistemas Biológicos. Laboratorio 102 en MODALIDAD REMOTA A DISTANCIA.
 Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
 Entidad Federativa : Distrito Federal
 Municipio : Coyoacán Localidad : Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud
 Fecha de Inicio Día Mes Año Fecha de Término Día Mes Año
 3 2 2022 3 8 2022

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo Tipo: 2.- Interno
 Orientación: 10.- Otros

FIRMAS

Dr. Martín Gómez Hernández No. Eco. 30641

Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico

Dra. Georgina Alarcón Angeles No. Eco. 34432

Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico

Samantha Moreno Jiménez

Alumno
 Nombre, firma

Vo. Bo. de la Comisión
 Nombre y firma de la persona que autoriza



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 4 de Agosto del 2022

ASUNTO: Notificación de término
de proyecto de servicio social

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos

PRESENTE:

Por este medio informo la terminación del proyecto específico de Servicio Social: "Revisión bibliográfica de la Determinación de Antioxidantes en Nutracéuticos y Medicamentos Utilizando Biosensores", que realizó la alumna: Samantha Moreno Jiménez con matrícula: 2152028372, en el Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio 102. Ubicado en: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (en modalidad remota a distancia), durante el periodo comprendido del 3 de Febrero del 2022 al 3 de Agosto del 2022, cumpliendo un total de 480 horas. Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Martín Gómez Hernández
No. Eco. 30641



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 4 de Agosto del 2022

ASUNTO: Notificación de término
de proyecto de servicio social

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos

PRESENTE:

Por este medio informo la terminación del proyecto específico de Servicio Social: "Revisión bibliográfica de la Determinación de Antioxidantes en Nutracéuticos y Medicamentos Utilizando Biosensores", que realizó la alumna: Samantha Moreno Jiménez con matrícula: 2152028372, en el Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio 102. Ubicado en: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (en modalidad remota a distancia), durante el periodo comprendido del 3 de Febrero del 2022 al 3 de Agosto del 2022, cumpliendo un total de 480 horas. Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Georgina Alarcón Angeles

Dra. Georgina Alarcón Ángeles
No. Eco. 34432



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe del Servicio Social

Revisión bibliográfica de la Determinación de Antioxidantes en Nutracéuticos y Medicamentos Utilizando Biosensores.

Elaboró: Samantha Moreno Jiménez

Asesor interno: Dr. Martín Gómez Hernández

Asesor interno: Dra. Georgina Alarcón Ángeles *Georgina Alarcón Ángeles*

Fecha: 4 de Agosto del 2022



Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. OBJETIVO GENERAL	6
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
5. ACTIVIDADES REALIZADAS	6
6. MARCO TEORICO	7
6.1 Antioxidantes	7
6.1.1 Clasificación	7
6.1.2 Antioxidantes endógenos	9
6.1.3 Antioxidantes exógenos	10
6.1.4 Minerales	11
6.2 Nutraceuticos	12
6.2.1 Características	14
6.2.2 Clasificación	14
6.2.2 Principales sustancias nutraceuticas	14
6.3 Determinación de la capacidad antioxidante	16
6.4 Métodos para medir la capacidad antioxidante	17
6.4.1 Sistemas enzimáticos	17
6.4.2 Métodos basados en la transferencia de hidrógeno (directos)	19
6.4.3 Métodos basados en la transferencia de electrones (indirectos)	19
6.4.4 Métodos analíticos	22
6.4.5 Otros métodos	25
6.5 Sensores	27
6.5.1 Clasificación	28
6.6 Biosensores	28
6.6.1 Características de los Biosensores	29

6.6.2 Clasificación	30
6.6.3 Tipos de biosensores	30
6.7 Enzimas.....	40
6.7.1 Tipos de enzimas	41
6.7.2 Tirosinasa	41
6.8 Técnicas de inmovilización	45
6.8.1 Propiedades de las enzimas inmovilizadas	48
6.9 Electroodos.....	50
6.9.1 Tipos de electrodos	50
6.10 Electroquímica.....	51
6.10.1 Celdas electroquímicas	51
6.10.2 Tipos de celdas	51
6.10.3 Técnicas electroquímicas.....	53
7. RESULTADOS: PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN BIOSENSOR	54
8. MATERIAL Y MÉTODOS	56
8.1 Reactivos	56
8.2 Equipo.....	56
8.3 Preparación de electrodos de pasta de carbono	56
8.4 Extracción de Tirosinasa de Hongos (<i>Agaricus bisporus</i>).....	56
8.5 Preparación de biosensores	57
8.6 Mediciones usando amperometría y voltamperometría de barrido lineal	57
8.7 Método Folin-Ciocalteu.....	58
9. CONCLUSIÓN	58
10. RECOMENDACIONES	58
11. BIBLIOGRAFÍA	59

RESUMEN

En la actualidad existe un gran interés en la detección y cuantificación de antioxidantes presentes en productos farmacéuticos y nutracéuticos, ya que su análisis y determinación es de suma importancia, debido a que estos juegan un papel importante en la salud humana al proporcionar una defensa contra muchas enfermedades. En los últimos años, se han realizado muchos intentos para aportar enfoques analíticos simples, rápidos y económicos para su detección y determinación. En este sentido, los biosensores se consideran herramientas prometedoras para la investigación de antioxidantes debido a su alta sensibilidad, tiempo de respuesta rápido y facilidad de miniaturización. Por lo tanto, en esta investigación, basándose en información bibliográfica se propone el desarrollo de un biosensor utilizando a la enzima tirosinasa como elemento de reconocimiento para la detección de antioxidantes, inmovilizada mediante la técnica de entrecruzamiento, ya que en la literatura se ha demostrado que la construcción de este biosensor presenta una mejora significativa en el rendimiento analítico, arrojando señales rápidas, grandes y estables donde el tiempo de respuesta es de 20 segundos, al igual mostrando una buena repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de almacenamiento, todo esto es gracias a las ventajas que presenta la técnica de inmovilización y la capacidad que presenta tirosinasa de responder a un amplio espectro de compuestos fenólicos. Siendo así que el biosensor propuesto tiene la capacidad de detectar antioxidantes de forma sencilla, con bajo costo y de fácil manejo, lo que podría ser de gran utilidad para la industria farmacéutica, en la sustitución de las técnicas analíticas, ya que los actuales procedimientos son lentos y requieren de instrumentación costosa como de operadores calificados.

1. INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son compuestos químicos naturales presentes en una gran diversidad de plantas y alimentos, pero que también pueden ser sintetizados. Estos han cobrado un gran interés en los últimos años por su gran capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas contrarrestando radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno, siendo este un mecanismo que ayuda a prevenir o retardar la progresión de muchas afectaciones para la salud, como: enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, cardiovasculares, enfermedades asociadas al envejecimiento y algunos cánceres. Aunque es difícil evitar la formación de radicales libres, sí es posible minimizar los efectos negativos que afectan al organismo. Para ello, es necesario incrementar el consumo de antioxidantes para así lograr un equilibrio en el sistema celular. (Moreno, 2021)

No obstante, la búsqueda y producción de compuestos antioxidantes de origen natural y de obtención mediante síntesis química a nivel industrial para satisfacer la demanda de bienestar de una comunidad o país presenta una mejora en la calidad de vida y un sustancial ahorro en el costo de los servicios de atención de la salud. (Bohorquez, 2016)

Es por esto que la importancia de cuantificar y demostrar las propiedades antioxidantes presentes en alimentos o medicamentos ha presentado un gran interés

para las industrias, los investigadores y los médicos. De modo que ante la gran diversidad de antioxidantes, han surgido distintos métodos para su cuantificación, de tal forma que esta gran variedad de métodos origina una falta de consenso para la selección de un método estándar para cuantificar la concentración analítica de antioxidantes. (Cárdenas, 2015) Surgiendo así la necesidad de adquirir métodos unificados estandarizados que permitan servir como herramienta en el control de calidad, así como proveer de estándares para la regulación y las declaraciones de efectos en la salud. (Moreno, 2021) Es por esto que se propone el uso de biosensores ya que estos son potentes herramientas de análisis con numerosas aplicaciones en las industrias agroalimentarias, farmacéuticas, entre otras, apoyándose en los instrumentos de la biotecnología y en los resultados de la investigación postgenómica. Estos presentan características destacables convirtiéndolos en opciones altamente atractivas para competir en el mercado con otras tecnologías, como: su especificidad, su alta sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad, y su bajo costo. (Benítez, y col., 2020)

2. JUSTIFICACIÓN

Los antioxidantes representan un sistema de defensa de todos los organismos aerobios, especialmente en el caso de los humanos, donde como consecuencia de los procesos de la acción metabólica y fisiológica, se generan sustancias reactivas inestables como subproductos. Estas sustancias inestables se denominan especies reactivas de oxígeno/nitrógeno, y son moléculas que contienen oxígeno o nitrógeno, con uno o más electrones desapareados, haciéndolos muy reactivos, siendo así que un aumento de estos puede abrumar el sistema antioxidante natural del organismo y provocar estrés oxidativo. Un número cada vez mayor de estudios médicos correlacionan la presencia del estrés oxidativo con varios trastornos y condiciones médicas, causadas por el daño infligido a las células sanas. Un estado de oxidación anormal está relacionado con enfermedades crónicas como la diabetes y enfermedades neurológicas como el Alzheimer. Por lo que, los antioxidantes tienen el papel de reducir los efectos adversos causados por estas especies reactivas. (David, Florescu, & Bala, 2020)

Sin embargo, durante las últimas décadas, el uso de antioxidantes ha aumentado considerablemente en la industria alimentaria. Los avances recientes en medicina y nutrición cambian el enfoque tradicional de la atención médica hacia una medicina personalizada, que prioriza la prevención de enfermedades y genera conciencia sobre la salud, principalmente a través de cambios en el estilo de vida y enfoques basados en la alimentación y la nutrición. En este contexto, los antioxidantes de las plantas, como los flavonoides, las vitaminas, las hormonas, los ácidos fenólicos y los ésteres, se consideran compuestos dietéticos bioactivos que pueden reducir el estrés oxidativo y se han asociado con múltiples beneficios para la salud. Por lo que, los antioxidantes juegan un papel importante en el mantenimiento de un equilibrio óptimo en el cuerpo humano y su análisis es de gran importancia. (Munteanu & Apetrei, 2022)

Dado el creciente interés en la detección de antioxidantes a partir de diversos recursos (alimentos, suplementos, plantas), se pueden emplear varios métodos. La mayoría de

los métodos analíticos se centran en la determinación in vitro de la capacidad antioxidante después de una reacción competitiva o no competitiva. En el caso de reacciones competitivas, se requiere una molécula diana competidora para competir con el antioxidante por las especies reactivas. Un buen ejemplo de este mecanismo es la técnica de quimioluminiscencia. En el caso de reacciones no competitivas, los compuestos antioxidantes interactúan directamente con las especies reactivas de oxígeno. Otras técnicas clásicas que ofrecen un análisis complejo de la composición química de varios compuestos que contienen antioxidantes incluyen métodos cromatográficos, como la cromatografía líquida de alta resolución utilizada como tal o junto con un sistema de reacción de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Tales técnicas clásicas son elaboradas, consumen mucho tiempo, requieren reactivos químicos o solventes específicos y, en su mayoría, necesitan personal especializado. Incluso es complicado evaluar la capacidad antioxidante de una muestra por medio de un único método, siendo así que su evaluación se hace en combinación de varios. Agregando que a menudo la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, debe realizarse con precaución ya que pueden haber existido alteraciones en la manipulación como la temperatura del ensayo, condiciones de procesado, forma en cómo se mezclaron los reactivos, etc. Por lo que, para superar estas deficiencias, los métodos electroanalíticos basados en sensores y biosensores han atraído cada vez más atención y han demostrado ser más rápidos. (David, Florescu, & Bala, 2020)

Ya que, el monitoreo de la actividad antioxidante a través de biosensores electroquímicos, basados en el principio redox, tiene muchas ventajas en comparación con los métodos químicos convencionales y se usa comúnmente para la detección inicial de antioxidantes. Esta tecnología no requiere reactivos químicos ni solventes sofisticados, ni requiere un tratamiento especial de las muestras. Ofrece información ampliada y reproducible sobre procesos electrodinámicos y asegura un rápido logro de las determinaciones. (Munteanu & Apetrei, 2022)

Es así que, el desarrollo de los biosensores ha sido espectacular, sobre todo en el campo de la medicina y, concretamente, del diagnóstico clínico, pero es importante señalar su acción en otros campos como el medioambiental, la industria farmacéutica (desarrollo de nuevos fármacos) y agroalimentaria, por citar algunos.

Por tanto, el propósito del presente proyecto de servicio social es discernir cuál sería el biosensor que presenta el mayor ratio de eficacia/eficiencia/costo/practicidad para medir el contenido de antioxidantes en productos comerciales como medicamentos y complementos alimenticios; para lograr lo anterior, se realizara una búsqueda documental que abarcará los antecedentes del uso de antioxidantes para tratamiento y prevención de enfermedades; considerando el desarrollo, síntesis y producción de antioxidantes en la industria, para su uso medicinal; culminando con la comparación de los métodos de detección de respuesta analítica ofrecida por los biosensores a la fecha conocidos para evaluar antioxidantes, para poder determinar cuál sería el biosensor más adecuado para la evaluación de los antioxidantes en medicamentos y nutracéuticos.

3. OBJETIVO GENERAL

- 3.1 Elaborar una propuesta sobre el mejor biosensor para la evaluación de la cantidad y tipo de antioxidantes presentes en nutracéuticos y medicamentos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1 Hacer una búsqueda bibliográfica para identificar los antioxidantes más comúnmente utilizados en nutracéuticos y medicamentos.
- 4.2 Analizar los métodos utilizados para determinar el contenido de antioxidantes informados en la literatura.
- 4.3 Entender el funcionamiento de un biosensor que permita cuantificar el contenido de antioxidantes.
- 4.4 Conocer los diferentes tipos de biosensores, su desarrollo y aplicación, a fin de poder realizar una comparación válida sobre el uso de cada uno y su superioridad entre ellos.

5. ACTIVIDADES REALIZADAS

El estudio de la revisión de biosensores en la detección de antioxidantes en nutracéuticos y medicamentos se realizará mediante una búsqueda bibliográfica.

5.1 Búsqueda de la información utilizando base de datos como BidiUAM, Google Scholar, SCOPUS, Science Direct, SciELO, Science Finder, Web of Science, Elsevier. Se buscarán y utilizarán artículos recientes con no más de 10 años de antigüedad dando prioridad a los de años más recientes. También se dará prioridad a editoriales de revistas reconocidas. Las palabras claves que se incluirán en las búsquedas, en inglés y español, son: antioxidante, medicamento, nutracéutico, biosensor, determinación de antioxidantes.

5.2 Establecer cuáles son los antioxidantes o tipos de antioxidantes más utilizados en farmacia.

5.3 Análisis y comparación de la información obtenida para plantear los métodos analíticos más comúnmente utilizados para determinar el contenido de antioxidantes.

5.4 Identificación de los diferentes tipos de biosensores conocidos, su desarrollo y aplicación.

5.5 Generación de una propuesta para desarrollar y probar experimentalmente un biosensor útil para evaluar antioxidantes en productos farmacéuticos y nutracéuticos.

6. MARCO TEORICO

En este marco teórico se presentará la información necesaria para entender y fundamentar la propuesta del uso de biosensores en la detección de antioxidantes en nutracéuticos y medicamentos.

6.1 Antioxidantes

El estrés oxidativo se caracteriza por ser un desequilibrio bioquímico, donde una elevada formación de especies reactivas de oxígeno y deficiencias de mecanismos antioxidantes, conllevan la alteración de la homeostasis oxidoreducción intracelular, de esta forma generando deterioro celular. Sin embargo, para encaminar el equilibrio de la respuesta oxidante, el organismo dispone de una serie de defensas antioxidantes que hacen frente a la producción de radicales libres. Dichas defensas antioxidantes, ocasionalmente, no son capaces de afrontar a las concentraciones de radicales libres, debido a un incremento excesivo en la formación de radicales libres o por un decrecimiento de las defensas antioxidantes, por tanto, esto conduce a un estado metabólico de estrés oxidativo, así dirigiendo a una muerte celular. Este estrés oxidativo puede ser ampliado y reproducido por un ciclo auto catalítico de estrés metabólico, conduciendo a su vez a un aumento en la generación de radicales libres. (González, y col., 2017)

Como resultado, se define a los antioxidantes como moléculas con capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, de tal forma que, la oxidación es aquella reacción química que implica la pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno de una sustancia a un agente oxidante, reacción que origina radicales libres que inician reacciones en cadena, mismas que dañan a las células. Es por ello que los antioxidantes presentándose en bajas concentraciones con respecto a las del sustrato oxidable, tienden a colisionar con el radical libre cediéndoles un electrón de hidrógeno para que el radical libre pierda el oxígeno y así se reduzca y a su vez el antioxidante se oxide convirtiéndose en un radical libre débil. (Coronado, Vega, Gutiérrez, Vázquez, & Radilla, 2015)

6.1.1 Clasificación

Los antioxidantes generalmente son clasificados en enzimáticos y no enzimáticos. Entre ellos, hay varios compuestos con diferentes modos y lugares de acción y diferentes efectos finales. Esta diversidad determina el papel individual de cada uno de ellos en el organismo.

Sin embargo, entre la red de interacciones antioxidantes enzimáticas, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRd), muestran la mayor eficacia de defensa antioxidante. Mientras tanto, los antioxidantes con bajo peso molecular, como la vitamina C, E, la coenzima Q, los carotenos, el glutatión y los oligoelementos, también

son responsables de inactivar los radicales reactivos. Algunos de ellos, incluidos el glutatión, la ubiquinona, la albúmina y las metalotioneínas, y el ácido úrico, se producen en el organismo, pero la mayoría son compuestos exógenos derivados de fuentes naturales como: plantas (flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, estilbenos, cumarinas, lignanos, compuestos organosulfurados, vitaminas) o minerales (selenio, zinc, manganeso) proporcionada con la dieta. Cuando los antioxidantes endógenos involucrados en las defensas de los radicales libres no pueden proteger al cuerpo contra las especies reactivas de oxígeno, existe la necesidad de antioxidantes exógenos. (Flieger, Flieger, Baj, & Maciejewski, 2021)

Muchos de los antioxidantes naturales ahora están aislados, completamente caracterizados y disponibles para diversas aplicaciones como agentes profilácticos y terapéuticos para inhibir los efectos adversos generados por especies reactivas de oxígeno. También los antioxidantes se pueden entregar al cuerpo en forma de suplementos dietéticos y de igual forma se utilizan como aditivos para evitar la oxidación de ingredientes inestables en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Debe recordarse que los antioxidantes pueden actuar a través de varios mecanismos, no solo eliminando radicales, sino también secuestrando iones de metales de transición, descomponiendo peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos, inactivando prooxidantes activos y mejorando la defensa antioxidante endógena, pero también reparando el daño celular resultante. Por lo tanto, los antioxidantes a veces se clasifican como antioxidantes primarios o que rompen cadenas y como antioxidantes secundarios o preventivos. (Flieger, Flieger, Baj, & Maciejewski, 2021)

- 6.1.1.1 Antioxidantes primarios: Previenen la creación de nuevos radicales libres, modificándolos a moléculas menos dañinas antes que reaccionen o ayudan esquivando la producción de radicales libres a partir de otras moléculas.
- 6.1.1.2 Antioxidantes secundarios: Estos suelen capturar los radicales libres, impidiendo la reacción en cadena.
- 6.1.1.3 Antioxidantes terciarios: Suelen reparar a todas aquellas biomoléculas que han sido dañadas por los radicales libres. (Tovar, 2013)

Otra clasificación de los antioxidantes es aquella donde son divididos en dos categorías: naturales y sintéticos. Donde los sintéticos son aquellos compuestos con estructuras fenólicas con diferentes grados de sustitución alquímica, en tanto que los naturales son compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides como el ácido ascórbico. (Muller, 2015)

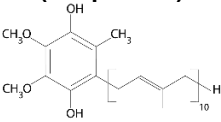
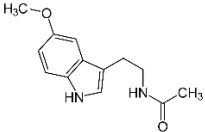
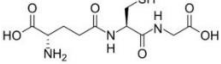
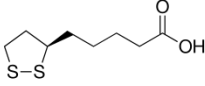
A todo esto, la clasificación de los antioxidantes como su acción y fuente de obtención, se resumen en las siguientes tablas, comenzando con los antioxidantes endógenos (Tabla 1), los cuales son producidos por el cuerpo humano, sin embargo, cuando estos no pueden proteger al cuerpo con las especies reactivas de oxígeno, se crea la

necesidad de antioxidantes exógenos (Tabla 2 y 3) que pueden ser administrados a través de la dieta. (Flieger, Flieger, Baj, & Maciejewski, 2021)

6.1.2 Antioxidantes endógenos

6.1.2.1 Antioxidantes sintetizados por el organismo

Tabla 1. Antioxidantes endógenos sintetizados por el organismo.

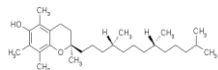
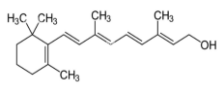
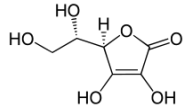
Antioxidante	Definición	Acción antioxidante	Fuente	Ref.
<p>Coenzima Q (ubiquinona)</p> 	<p>Su forma reducida se conoce como ubiquinol y la oxidada como ubiquinona. Ambas formas coexisten mediante reacciones redox secuenciales que sirven para regenerarse mutuamente (ciclo Q).</p>	<p>Su función antioxidante lipofílica radica en la eliminación de radicales libres inhibiendo el inicio y el avance de la peroxidación lipídica en las membranas celulares.</p>	<p>Sintetizada en las células, a excepción por glóbulos rojos.</p>	<p>(Pastor, y col., 2020) (Neerghee, y col., 2017)</p>
<p>Melatonina</p> 	<p>La melatonina es un compuesto indólico sintetizado en diferentes órganos aunque sus efectos no tengan un órgano diana en específico.</p>	<p>Su función antioxidante es neutralizar radicales libres originarios del oxígeno y del nitrógeno que dañan a las células. También puede operar estimulando enzimas antioxidantes e inhibiendo a las prooxidantes.</p>	<p>Es sintetizada en distintos órganos extrapineales y no endocrinos como: retina, médula ósea, piel, cerebelo y en el sistema inmune.</p>	<p>(Poza, Pujol, Ortega, & Romero, 2018)</p>
<p>Glutacion</p> 	<p>Tripéptido no proteínico que proviene de aminoácidos.</p>	<p>Considerado como el mayor antioxidante endógeno, ya que neutraliza radicales libres y compuestos de oxígeno reactivo, así brindando protección a células de aquellas especies reactivas de oxígeno.</p>	<p>El 90% de glutatión está en forma reducida en células y tejidos sanos y menos del 10% existe en la forma disulfuro.</p>	<p>(Jamanca & Alfaro, 2017)</p>
<p>Ácido lipoico</p> 	<p>Compuesto que es constituido por el capital antioxidante del organismo.</p>	<p>Protege a ácidos grasos y a glóbulos rojos del daño oxidativo (resultante de ejercicios intensos y de demasiada exhibición a los rayos ultravioletas resultantes del sol).</p>	<p>Se sintetiza en plantas, animales y en muy baja cantidad en el organismo humano.</p>	<p>(Jamanca & Alfaro, 2017)</p>

6.1.3 Antioxidantes exógenos

6.1.3.1 Vitaminas

Dentro de los antioxidantes de origen natural, se encuentran las vitaminas (Tabla 2), las cuales provienen principalmente de alimentos de origen vegetal.

Tabla 2. Vitaminas con función antioxidante.

Antioxidantes	Definición	Acción antioxidante	Fuente	Ref.
<p>Vitamina E (tocoferol)</p> 	<p>Constituido por distintos compuestos naturales, donde el alfa-tocoferol presenta la mayor actividad biológica antioxidante.</p>	<p>Protagonizan la principal defensa contra el daño oxidativo en los tejidos humanos. También:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Neutralizan al oxígeno singlete -Capturan radicales libres hidroxilo -Capturan oxígeno molecular -Neutralizar peróxidos 	<p>Tomate, aceite de girasol, frutos secos, aceite de oliva, repollo, margarina, brócoli, aceite de canola, germen de trigo.</p>	<p>(Sánchez, M. E. 2013)</p>
<p>Vitamina A (β-caroteno)</p> 	<p>Nutriente fundamental para el ser humano. Asimismo es conocido como retinol.</p>	<p>Ofrece protección al DNA y ayuda en la detención del deterioro de tejidos. β-caroteno, posee propiedades antioxidantes que previenen el envejecimiento celular.</p>	<p>Huevos, zanahorias, aceite de soja, lechuga, vísceras de animales, perejil, tomate, atún, espinacas, quesos.</p>	<p>(Jamanca & Alfaro, 2017)</p>
<p>Vitamina C (ac. ascórbico)</p> 	<p>También conocido como ácido ascórbico, siendo un ácido orgánico proveniente del azúcar con propiedades antioxidantes con un alto poder reductor.</p>	<p>Participa en la donación de electrones a compuestos del exterior y del interior de la célula. Fuera de la célula trabaja en conjunto con la vitamina E, para prevenir la oxidación lipídica. Al igual, interviene en la prevención del daño oxidativo del ADN.</p>	<p>Col silvestre, brócoli, ruda, pimiento, berro, hojas de kailán, guayaba, hojas de col, naranja, pimiento rojo, limón, grosella negra, coliflor, espinaca, kiwi y fresa.</p>	<p>(Jamanca & Alfaro, 2017)</p>

Antioxidantes	Definición	Acción antioxidante	Fuente	Ref.
Flavonoides (polifenólicos) 	<p>Químicamente son aquellas sustancias que tienen un anillo aromático, donde, contienen uno o más grupos hidroxilo. Son potentes agentes antioxidantes que intervienen inactivando radicales libres.</p>	<p>Tienen fuertes propiedades antioxidantes como captadores de oxígeno, descomponedores de peróxido, agentes quelantes de metales e inhibidores de radicales libres.</p>	<p>Distribuidos en las plantas verdes y unos pocos han sido detectados en hongos y algas. También se hallan en granos, semillas, aceites, leguminosas té verde, vino y soya.</p>	<p>(Jamanca & Alfaro, 2017) (Sánchez, M. E. 2013)</p>

6.1.4 Minerales

Los minerales descritos en la Tabla 3, también son potentes antioxidantes que actúan en distintos procesos y pasos metabólicos en el organismo.

Tabla 3. Minerales con función antioxidante.

Antioxidantes	Definición	Acción antioxidante	Fuentes	Ref.
Zinc	<p>Micronutriente necesario para el organismo humano ya que expone un importante papel en la reproducción, crecimiento, desarrollo y metabolismo celular. Su deficiencia genera daño oxidativo en tejidos.</p>	<p>Son un fragmento del núcleo activo de aquellas enzimas que presentan actividad antioxidante. Al igual conservan funciones hepáticas, cardíacas y reproductoras en buen estado.</p>	<p>Germen de trigo, lentejas, carnes, vísceras, pescado, huevo, cereales integrales y legumbres.</p>	<p>(Román, Alva, Pinzón, & Carvajal, 2016) (Sánchez, M. E. 2013)</p>
Cobre	<p>Micronutriente fundamental para la vida. Metal que constituye las cuproproteínas y las enzimas cobre dependientes, las cuales participan en reacciones oxidantes vinculadas con el metabolismo de aminoácidos precursores de neurotransmisores y del hierro.</p>		<p>Pescado, chocolate, nueces, legumbres, cereales integrales, hongos, vegetales verdes, hígado, semillas.</p>	<p>(Mendéz, Gaxiola, Díaz, Esther, & Zenteno, 2015) (Sánchez, M. E. 2013)</p>
Manganeso	<p>El manganeso (Mn) es un elemento esencial que interviene en la síntesis y activación de muchas enzimas y</p>		<p>Avena, cereales integrales, espinaca, maní, pan</p>	<p>(Li & Yang, 2018)</p>

Antioxidantes	Definición	Acción antioxidante	Fuentes	Ref.
	en la regulación del metabolismo de la glucosa y lípidos en humanos. Además, el manganeso es uno de los componentes necesarios para la superóxido dismutasa de manganeso, responsable de eliminar especies reactivas de oxígeno en el estrés oxidativo mitocondrial.		integral, habas, trigo y batata.	(Sánchez, M. E. 2013)
Selenio	Oligoelemento esencial para humanos, animales y ciertas plantas inferiores. Por medio de las selenoproteínas el selenio realiza funciones biológicas, como: el mantenimiento del estado redox celular, la señalización redox y defensa contra el estrés oxidativo.		Cereales integrales, mariscos, huevos, carnes, frutas, pescado y verduras.	(Molina, 2019) (Sánchez, M. E. 2013)
Hierro	Elemento esencial de todo organismo vivo y el más difundido metal de transición. El hierro participa en el transporte de oxígeno (principalmente en forma de hemo) y es necesario para el correcto funcionamiento de muchas enzimas implicadas en la transferencia de electrones y en reacciones de oxidación-reducción.		Hortalizas y legumbres.	(Kejík, y col., 2021) (Sánchez, M. E. 2013)

6.2 Nutracéuticos

Los nutracéuticos son compuestos bioactivos o químicos naturales que poseen actividades biológicas valiosas y beneficios fisiológicos demostrados. Por lo que, el término nutracéutico se define como aquel alimento o parte del mismo que otorga

beneficios médicos o de salud, incluida la prevención y el tratamiento de una enfermedad”. (Hoti, y col., 2022)

Estos productos están disponibles sin receta en diferentes tiendas y farmacias. Debido al significado no reglamentario de nutraceuticos, estos productos pueden considerarse complementos alimenticios o productos a base de hierbas (productos a base de hierbas medicinales no registrados). Debido a su naturaleza no medicinal, no prueba de eficacia y no se requiere aprobación previa a la comercialización por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). Sin embargo, los nutraceuticos se utilizan por sus propiedades de promoción de la salud y/o prevención de enfermedades; ya que ayudan en el manejo del estrés oxidativo, la inflamación, la artritis, osteoporosis, enfermedades gastrointestinales, cardiovasculares prevención o control de enfermedades, depresión, diabetes y cáncer. (Sut, Baldan, Faggian, Peron, & Dall'Acqua, 2016)

No obstante, las fuentes naturales de los productos nutraceuticos son matrices complejas, sus propiedades químicas y su composición no están completamente definidas. Por ello, uno de los primeros puntos a tomar en cuenta al momento de hablar de la ingesta de estos productos como complementos alimenticios es que, en muchos casos, se desconoce lo que se está tomando el consumidor. Además, se sabe poco sobre las actividades biológicas específicas que ejercen y sobre su farmacocinética. Por lo que, el término nutraceutico no tiene definición regulatoria, y la información contradictoria existente genera confusión sobre el posible uso efectivo de estos productos. Esto puede deberse a la falta de estudios sobre posibles mecanismos de acción e investigación in vivo. Esta situación ha despertado el mayor interés por la necesidad de evaluar su seguridad, mecanismos de acción y eficacia con datos clínicos. (Hoti, y col., 2022)

Por otro lado, ha existido confusión entre el término nutraceuticos y otros como alimentos funcionales, suplementos dietéticos, alimentos de diseño, alimentos médicos, alimentos farmacéuticos, fitoquímicos, etc. Los nutraceuticos, que se encuentran entre los productos farmacéuticos y los alimentos, presentan desafíos con los ensayos de declaraciones de seguridad y salud. Siendo así que, la definición de alimento funcional es de aquellos productos alimenticios fortificados con constituyentes especiales que tienen efectos fisiológicos ventajosos. Los alimentos funcionales brindan cantidades requeridas de vitaminas, grasas, proteínas, carbohidratos, etc., que el cuerpo humano requiere para una supervivencia saludable. Sin embargo, los alimentos funcionales son denominados como nutraceuticos cuando estos ayudan en la prevención y el en tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno. Dado que no se considera que los suplementos dietéticos traten, curen o prevengan enfermedades, la definición de nutraceuticos es: aquellos suplementos dietéticos que proporcionan una forma concentrada de un presunto agente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimentaria, y que es utilizado para mejorar la salud en dosis que superan las que podrían obtenerse de los alimentos normales. (Hoti, y col., 2022)

Así que, dado que suelen ser productos naturales bioactivos, los ingredientes nutraceuticos también pueden ser considerados como materias primas para el posible

desarrollo de nuevos fármacos, y luego pueden ser utilizados como compuestos líderes para la preparación sintética o semisintética de derivados con propiedades farmacocinéticas mejoradas. El estudio profundo de estos productos puede permitir la observación de nuevas entidades químicas o el descubrimiento de nueva actividad en compuestos químicos naturales antiguos. (Sut, Baldan, Faggian, Peron, & Dall'Acqua, 2016)

6.2.1 Características

Para que un producto pueda ser calificado como nutracéutico, este debe cumplir características como:

- 6.2.1.1 Ser de origen natural
- 6.2.1.2 Deben aportar efectos beneficios en la salud, como: restablecer funciones fisiológicas, acciones preventivas y/o curativas y un aumento en la calidad de vida.
- 6.2.1.3 Deben ser seguros, eficaces y de calidad. (Rojas, y col., 2015)

6.2.2 Clasificación

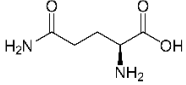
Los nutracéuticos son productos que se clasifican acorde a su naturaleza química, la biodisponibilidad de los alimentos, mecanismo de acción del componente activo y a su origen. De acuerdo a su naturaleza, se clasifican como de fuentes proteicas, carbohidratos, lípidos, además de micronutrientes como metales. Por lo que, de acuerdo a su origen, se apuntan dos tipos de nutracéuticos, siendo los de origen animal y los que proceden de los vegetales, agregando a los de origen mineral. (Rojas, y col., 2015)

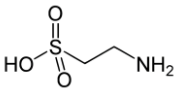
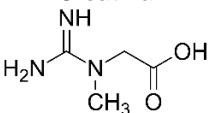
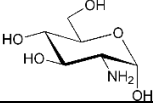

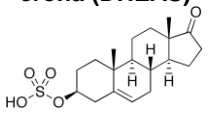
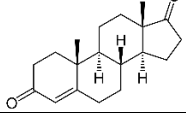
No obstante, los nutracéuticos, con respecto a su promesa, se pueden clasificar de dos maneras, como nutracéuticos potenciales, incluida la mayoría de los nutracéuticos que mantienen la promesa de un beneficio médico o de salud particular, y nutracéuticos establecidos relacionados con el logro de los datos clínicos eficientes que prueban estos beneficios. (Hoti, y col., 2022)

De ahí que, su clasificación por mecanismo de acción se engrupa de acuerdo a sus funciones metabólicas y fisiológicas sobre las que actúan, como se muestra en la Tabla 4, donde se describen las principales sustancias nutracéuticas. (Rojas, y col., 2015)

6.2.2 Principales sustancias nutracéuticas

Tabla 4. Principales sustancias nutracéuticas.

Nutracéutico	Descripción	Ref.
<p style="text-align: center;">Glutamina</p> 	<p>La glutamina es un aminoácido neutro, considerado como un aminoácido abundante en el cuerpo humano. Este aminoácido desempeña una amplia variedad de actividades biológicas como el mantenimiento de la homeostasis del nitrógeno corporal y la inmunocompetencia.</p>	<p>(Andrade, Chaug, Andino, & Rodríguez, 2017)</p>

Nutracéutico	Descripción	Ref.
		(Yule, Macedo, & Tirapegui, 2019)
<p>Taurina</p> 	<p>Aminoácido más abundante del organismo. Es propuesta como antioxidante por su papel en la estabilización de la membrana.</p>	(Igartua, 2015)
<p>Creatina</p> 	<p>Ácido orgánico nitrogenado natural sintetizado en el hígado, páncreas y riñones. El 90% de esta al ser sintetizada, se almacena en forma de fosfocreatina (PCr) en el músculo, donde su principal acción se relaciona con la resíntesis del ATP por medio de la transferencia del grupo fosfato al ADP. Esta resíntesis, da paso a un aumento en el rendimiento deportivo con elevada intensidad y de corta duración. Por tanto, el efecto de la suplementación con creatina tiene un efecto de mejora en el rendimiento de ejercicios de alta intensidad.</p>	(Jurado, Navarrete, Ranchal, & Mata, 2021)
<p>Glucosamina</p> 	<p>Amino-azúcar natural hallado en el organismo, el cual actúa como sustrato en la síntesis de proteoglicanos donde participa en la preservación de la integridad del cartílago.</p>	(Fernández, 2016)
<p>Ácidos grasos (omega 3)</p> 	<p>Compuestos de gran importancia debido a su participación en la modulación de procesos como la transmisión de señales, la inflamación, la inmunidad y el estrés oxidativo.</p>	(Waitzberg & Garla, 2014)
<p>Probióticos</p>	<p>Microorganismos vivos que al ser administrados en correctas concentraciones ofrecen beneficios a la salud, debido a que pueden funcionar de acuerdo a su capacidad de promover la resistencia a la colonización, regular el tránsito intestinal, o normalizar la microbiota alterada.</p>	(Guarner, y col., 2017)
<p>Sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS)</p> 	<p>Hormona derivada del colesterol perteneciente al metabolismo de los esteroides sexuales. Representa el esteroide más abundante en sangre, el cual modula diferentes sistemas neurotransmisores involucrados en la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos como la depresión, la demencia, la esquizofrenia y la ansiedad.</p>	(Márquez, Sandoval, Pérez, Ríos, & Diéguez, 2020)
<p>Androstenediona</p> 	<p>Hormona esteroide natural producida en ambos sexos a partir de las gónadas y las glándulas suprarrenales que sirve como intermediario en la biosíntesis de testosterona. Puede actuar directamente sobre las células óseas a través de un mecanismo mediado por receptores</p>	(Badawy, Sobeh, Xiao, & Farag, 2021)

Nutracéutico	Descripción	Ref.
	Esta se administra con frecuencia a culturistas y atletas, debido a su efecto como precursor inmediato de la testosterona en el sistema de andrógenos.	

6.3 Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación del potencial antioxidante, es difícil de establecer a causa de los complejos mecanismos de acción de los antioxidantes individuales. Algunos actúan eliminando radicales libres, otros previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno o induciendo las vías de señalización o reparando el daño oxidativo. (Flieger, Flieger, Baj, & Maciejewski, 2021)

Es importante hacer diferenciación entre actividad antioxidante y capacidad antioxidante, ya que son términos utilizados con frecuencia de forma alternativa, siendo que tienen diferentes significados. Por un lado, la actividad antioxidante hace referencia a la constante de velocidad de la reacción entre un determinado antioxidante y un oxidante específico, mientras que la capacidad antioxidante es una medida de la cantidad (expresada en moles) de un determinado tipo de radical libre medido por una muestra. Las mediciones de la capacidad antioxidante determinan la cantidad de una mezcla heterogénea de antioxidantes que reaccionan juntos para producir la capacidad total o neta para neutralizar una muestra en particular. (Naresh & Lee, 2021)

Existen diversos métodos que son utilizados en la determinación de la actividad antioxidante, los cuales se fundamentan principalmente en examinar cómo el daño oxidativo inducido por un agente oxidante a un sustrato oxidable, puede ser inhibido o reducido con la aparición de un antioxidante. Dicha inhibición es proporcional a la actividad antioxidante de uno o varios compuestos. Así mismo, lo que principalmente se busca es la cuantificación de los productos formados a causa del proceso oxidativo.

A pesar que son utilizados diversos métodos para medir la capacidad antioxidante, debido a la variedad de los compuestos con propiedades reductoras, se vuelve complicado separar y cuantificar sus contribuciones específicas. (Moreno, 2021)

Sin embargo, la reactividad que presenta un antioxidante frente a diversas especies reactivas es expresada como capacidad antioxidante total de una muestra. Pero para ello, debe considerarse que la mayoría de veces, las muestras llegan a presentar una mezcla de distintos compuestos antioxidantes en el cual cada uno tiene una capacidad antioxidante distinta, dificultando así su determinación. Por esta razón no existe como tal un único método que evalúe la capacidad antioxidante total, siendo así la inclinación por la elaboración de diversas metodologías para posibilitar la comparación e interpretación de los resultados.

Las mediciones de la actividad antioxidante deben mostrar al menos dos cosas:

1. Que la sustancia de ensayo presente algún efecto antioxidante o pro-oxidante detectable.

2. Una comparación del efecto cuantitativo de concentraciones específicas de distintos componentes de prueba sobre el sustrato. (Moreno, 2021)

De manera que el concepto “actividad antioxidante” será empleado para un ensayo individual, el cual únicamente pondrá en evidencia la reactividad química que se tiene bajo condiciones específicas aplicadas en el ensayo, de manera que será inadecuado incorporarlo como un indicador de la “actividad antioxidante total”. De igual forma, se debe tomar en cuenta que cuando es usado el término "capacidad", se hace referencia a resultados obtenidos por diversas pruebas, como:

- 6.3.1.1 Capacidad secuestradora de radicales peróxido
- 6.3.1.2 Capacidad secuestradora de superóxido
- 6.3.1.3 Capacidad reductora del ión férrico

Por lo tanto, la capacidad antioxidante indica únicamente la duración de la acción antioxidante, y por otro lado, la reactividad caracteriza el inicio dinámico de la antioxidación a una determinada concentración de un antioxidante o mezcla antioxidante. (Bohorquez, 2016)

6.4 Métodos para medir la capacidad antioxidante

6.4.1 Sistemas enzimáticos

Todas las células y los organismos aeróbicos cuentan con un sistema de defensa antioxidante para así poder hacer frente al daño oxidativo. Estos sistemas de defensa antioxidante son las enzimas, las cuales se pueden valorar mediante la cuantificación de su actividad, expresión y concentración. También puede evaluarse su capacidad antioxidante de forma directa por medio de diversos métodos, por ejemplo, mediante la concentración de una proteína de transporte, la enzima antioxidante o de reparación, la actividad de una enzima antioxidante, la concentración neta de un antioxidante o de un co-sustrato antioxidante, necesario para la actividad de enzimas antioxidantes.

No obstante, a menudo las valoraciones de antioxidantes son de forma indirecta y por inhibición, en el que un agente oxidante también conocido como inductor es un radical libre, el cual oxida a una molécula monitor (sonda) que sufre un cambio de color, emite luz (quimioluminiscencia), fluorescencia o electricidad o puede ser detectable por sus productos (inmunoquímica o espectro de masas), la capacidad antioxidante se cuantifica en el momento, en el que, al colocar la muestra a evaluar, la oxidación de la molécula sonda se oxida y con ello el parámetro modificado. Una vez comparada la intensidad de la inhibición de la modificación en las mismas condiciones con un antioxidante de potencia conocida, por ejemplo, trolox, pueden ser obtenidos los equivalentes de la capacidad antioxidante. (Reguillo, 2018)

Por lo que, en la Tabla 5, se describen los métodos enzimáticos empleados para determinar la capacidad antioxidante específica en muestras biológicas.

Tabla 5. Métodos enzimáticos utilizados en la determinación de la actividad antioxidante.

Método	Fundamento	Medición	Ref.
Superóxido Dismutasa (SOD)	<p>Cataliza reacciones de destrucción del anión superóxido, a través de la transformación de éste en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido por la actividad de la catalasa o de la glutatión peroxidasa.</p> <p>Su función principal radica en la eliminación del radical superóxido antes de que este reaccione con moléculas biológicas susceptibles.</p>	Los resultados se expresan en unidad de actividad enzimática por cada mg de proteína (U·mg-1 P)	<p>(Romero, Martínez, & Rodríguez, 2015)</p> <p>(Trujillo, 2019)</p>
Catalasa (CAT)	<p>Las CAT participan en el metabolismo del peróxido de hidrógeno, ya que a elevadas cantidades de peróxido, la catalasa lo reduce debido a que esta necesita de dos moléculas de H₂O₂ para realizar la reducción de H₂O₂ a O₂ y H₂O.</p>	Los resultados se expresan en unidad de actividad enzimática por cada mg de proteína (U·mg-1 P)	<p>(Romero, Martínez, & Rodríguez, 2015)</p> <p>(Tovar, 2013)</p>
Glutacion Peroxidasa (GPx)	<p>Flavoenzima dependiente del (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), que será ocupado por la glutatión peroxidasa para la reducción de hidroperóxidos intracelulares, peróxido de hidrógeno y grandes moléculas de peróxidos lipídicos.</p> <p>Enzimas con facultad de remover peróxidos hallados en el tejido humano.</p>	<p>Resultados expresados en unidades por mg de proteína. (U GPx/mg)</p> <p>Donde U de GPx se define como la cantidad de enzima que puede oxidar 1 nmol de NADPH a NADP+ por minuto.</p>	<p>(Vargas, 2017)</p> <p>(Sánchez, M. E. 2013)</p> <p>(Tovar, 2013)</p> <p>(Trujillo, 2019)</p>
Glutacion Reductasa (GR)	<p>Oxidorreductasa dependiente de NADPH que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Esta enzima requiere de la acción del NADPH para producirse, ya que la transformación del NADPH a NADP es la que se detecta espectrofotométricamente para medir la actividad de la enzima.</p>	<p>Los resultados son expresados en unidades por mg de proteína. (U GR/mg)</p> <p>Donde la U de GR se define como la cantidad de enzima que puede oxidar 1 nmol de NADPH a NADP+ por minuto.</p>	<p>(Vargas, 2017)</p> <p>(Csiszár, Horváth, Béla, & Gallé, 2016)</p>
Glutacion-S-Transferasa eritrocitaria (GST)	<p>La actividad de la enzima GST se determina ocupando como sustrato al 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) y glutatión reducido (GSH), donde la GST cataliza la conjugación del grupo tiol del glutatión al CNDNB.</p>	<p>Los resultados son expresados en unidades por mg de proteína. (U GST/mg)</p> <p>Donde U de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1 nmol de CNDNB con GSH por minuto.</p>	<p>(Vargas, 2017)</p> <p>(Reguillo, 2018)</p>

Sin embargo, existen otros métodos que determinan la actividad antioxidante los cuales se basan de acuerdo a la información que se requiere alcanzar, así dividiéndolos en métodos directos o métodos indirectos.

6.4.2 Métodos basados en la transferencia de hidrógeno (directos)

Aquellas reacciones donde se involucre la transferencia de hidrógeno cuantifican la capacidad que tiene un antioxidante para estabilizar un radical libre a través de la transferencia de átomos de hidrógeno. Su reactividad dependerá de la energía de disociación del enlace del grupo que contiene el hidrógeno a transferir. Son independientes del pH y de los disolventes. Estos métodos residen en la monitorización de una cinética competitiva entre, un generador de radicales libres sintético, un compuesto molecular fácilmente oxidable y del antioxidante de estudio. Las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno suelen ser sensibles en existencia de metales y agentes reductores, ya que pueden llegar a ocasionar una aparente mayor actividad antioxidante. (Moreno, 2021)

En este tipo de métodos, es común incluir a un sustrato oxidable, el cual será oxidado por la especie reactiva bajo estudio, una vez ocurrida la oxidación se mide la forma oxidada del sustrato oxidable. Siendo así, que al ser agregados los antioxidantes estos competirán con el sustrato oxidable por las especies reactivas generando la inhibición de la oxidación, esto se deberá a que los antioxidantes reaccionaran con las especies reactivas, reduciéndolas a modo de que no se continúe generando la oxidación al sustrato oxidable. (Trujillo, 2019)

En la Tabla 6, se describen los métodos más usados, como: DPPH (2,2-difenil-1-pirilhidrazilo), ABTS (sal diamónica del Ácido 2.2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y el DMPD (diclorhidrato de n, n-dimetil p-fenilendiamina). (Trujillo, 2019)

6.4.3 Métodos basados en la transferencia de electrones (indirectos)

En las reacciones donde se lleva a cabo la transferencia de electrones se genera la transferencia de un electrón para reducir algún compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. La reactividad de un antioxidante que implica este tipo de reacciones se basa en la desprotonación, por lo que, es gobernada por el potencial de ionización (PI), de tal forma que los valores descienden con el incremento del pH, reflejando un aumento en la capacidad electrodonador con la desprotonación. Este tipo de reacciones son lentas y requieren de mucho tiempo para ser completadas, por tanto los cálculos de la capacidad antioxidante se basan en el porcentaje de disminución del producto en vez de la cinética. Este tipo de métodos hacen referencia a la reacción redox del antioxidante como indicador del punto final del ensayo. (Moreno, 2021)

Al igual, en la Tabla 6, se describen los métodos más usados, como: FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro), CUPRAC (Capacidad Antioxidante Reductora de Iones Cúpricos) y Folin Cicoaltea. (Trujillo, 2019)

Tabla 6. Métodos directos e indirectos ocupados en la determinación de la capacidad antioxidante.

Tipo de método	Método	Fundamento	Medición	Ref.
Métodos directos	DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	<p>Cuantifica la captura del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) por medio de algún compuesto antioxidante. Cuanto mayor sea la captura del radical libre por parte del antioxidante, existirá una elevada disminución de la absorbancia del radical DPPH, conduciendo así a una decoloración de color violeta oscuro.</p> <p>Siendo la diferencia de absorbancia la que indica la capacidad antioxidante.</p>	<p>Son expresados como % de actividad de captación de radicales (% AAR) = $(1 - \text{muestra}(\text{mg}) / \text{control}(\text{ml})) \times 100$.</p> <p>El valor de IC50 (mg/ml) que representa la cantidad de extracto que reduce al radical DPPH• se calcula a partir del % de captación versus la curva de concentración.</p>	<p>(Jiménez, M., & Martínez, 2012)</p> <p>(Guija, Inocente, Ponce, & Zarzosa, 2015)</p> <p>(Gruszycki, y col., 2019)</p>
	ABTS (sal diamónica del Ácido 2.2-azino-bis (3-etilbenzotiazoli n-6- sulfónico)	<p>Basado en la medición de la decoloración del radical ABTS+, bien a su reducción a ABTS por la acción de los antioxidantes. Al ser reducido se presenta una disminución en la absorbancia, la cual es utilizada en la determinación de la capacidad antioxidante.</p>	<p>Son expresados como % de actividad de captación de radicales (% AAR) = $(1 - \text{muestra}(\text{mg}) / \text{control}(\text{ml})) \times 100$.</p> <p>El valor de IC50 (mg/ml) que representa la cantidad de extracto que reduce al radical DPPH• se calcula a partir del % de captación versus la curva de concentración.</p>	<p>(Gruszycki, y col., 2019)</p> <p>(Mesa, Zapata, Aarana, & Zapata, 2015)</p>
	DMPD (diclorhidrato de n, n-dimetil p-fenilendiamina)	<p>En presencia de una disolución oxidante convierte al radical libre DMPD+ en un radical catiónico coloreado. Sin embargo, al ser agregado un compuesto antioxidante, este será capaz de transferir un átomo de hidrógeno al DMPD+, así apagando el</p>	<p>Resultado expresados en equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol Trolox/g}$ o $\mu\text{mol Trolox/L}$).</p>	<p>(Karasakal, 2015)</p> <p>(Moreno, 2021)</p>

		color y generando una decoloración de la solución.		
	ORAC (Capacidad de absorción del radical oxígeno)	<p>Cuantifica el retraso, en existencia de compuestos antioxidantes, ya que la disminución de la fluorescencia se debe a la acción de radicales peroxilo.</p> <p>Siendo que estos últimos son quienes oxidan a la fluoresceína de tal manera que esta pierde su fluorescencia. De forma que el trabajo de un antioxidante, está en capturar un átomo de hidrógeno de los ROO⁻, de tal modo que ayuden a disminuir la pérdida de fluorescencia.</p>	Resultados expresados en equivalentes de Trolox (mmol de peroxilo capturado por molécula de Trolox/L plasma).	(López, 2015) (Huet, 2017)
Métodos indirectos	FRAP (Capacidad antioxidante para Reducir el ion Férrico)	Se cuantifica la reducción de un complejo que es generado por un cromógeno de TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina), y hierro férrico (Fe ³⁺ -TPTZ) incoloro que se reduce a la forma ferrosa (Fe ²⁺ -TPTZ) así causando un intenso color azul verdoso, todo esto en presencia de antioxidantes.	La actividad se determina de acuerdo al aumento de la absorbancia. Resultados expresados como mg equivalentes de Fe ²⁺ o micromolar de Fe ²⁺ /L.	(Mesa, Zapata, Aarana, & Zapata, 2015)
	CUPRAC (Capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos)	Basado en la reducción del Cu ²⁺ a Cu ⁺ por la acción combinada de los antioxidantes presentes en una muestra.	Resultados expresados en milimoles gramos de trolox (umol/g trolox).	(Cárdenas, 2015)
	FOLIN-CICOALTEU (Fenoles totales)	<p>Principalmente basado en la capacidad que presentan los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de (F-C) incluye sales de molibdeno y tungsteno que reaccionan con algún tipo de fenol generando complejos como: fosfomolibdico-fosfotungstico.</p> <p>Siendo que la transferencia de electrones, reduce los complejos en óxidos cromógenos de color azul intenso, siendo este color</p>	Resultados expresados en milimoles equivalentes de la disolución por cada gramo de extracto (mmoles EAG/ g extracto).	(Cortez, Faicán, Pirovani, & Piagentini, 2018) (Muñoz, y col., 2017)

		proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula.		
--	--	--	--	--

De modo que, la gran parte de estos métodos enuncian sus resultados como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), este es un antioxidante sintético de referencia, análogo a la vitamina E y que es usado como estándar comparativo de su actividad antioxidante respecto a la de los compuestos presentes en las muestras. (Trujillo, 2019)

6.4.4 Métodos analíticos

Otros métodos que pueden evaluar la capacidad antioxidante en especies vegetales y que pueden conducir a información valiosa, puede ser la cromatografía.

6.4.4.1 Cromatografía

Este es un método de separación ocupado para el aislamiento e identificación de compuestos químicos hallados en alguna mezcla. Sin embargo, estos métodos cromatográficos ocupan dos fases: la primera es una fase estacionaria y la segunda es una fase móvil. Siendo que, por la fase estacionaria, son transportados los compuestos por medio de una fase móvil que se mantiene fluyendo. Los compuestos que requieren ser separados por este tipo de método deberán ser solubles en la fase móvil y deberán presentar capacidad de interaccionar con la fase estacionaria. (Pássaro, y col., 2016)

Sin embargo, existen diversos métodos cromatógrafos de los cuales en la Tabla 7, se describen únicamente los más utilizados para la determinación de antioxidantes.

Tabla 7. Métodos cromatógrafos comúnmente ocupados para determina antioxidantes.

Método	Fundamento	Ventajas	Desventaja	Ref.
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Método empleado en la separación y análisis de compuestos químicos presentes en una mezcla. Sin embargo, las diferentes fuerzas químicas y físicas que intervienen entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con gran afinidad a la fase estacionaria son	<ul style="list-style-type: none"> -Gran aplicabilidad a causa de su elevada disponibilidad de equipos, columnas y demás materiales -Precisión alta en sus resultados -Los compuestos separados pueden ser recolectados. -El tiempo de separación menor a 30 min por muestra. -Elevada fuerza de 	<ul style="list-style-type: none"> -Instrumentación costosa -Elevado costo de operación -Análisis complejo -Sin detector universal y sensible 	<p>(Suarez & Morales, 2018)</p> <p>(Pássaro, y col., 2016)</p>

	desplazados a menor velocidad que aquellos que tienen menor afinidad. Siendo así que estas diferencias de velocidades dan lugar a la separación de los componentes.	separación con detección sensible. -Elevada reproducibilidad en análisis cuantitativos.		
Cromatografía de gases	Técnica donde la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria es un sólido o un líquido siendo este último "soportado" por un algún sólido inerte. Esta cromatografía debe ser en columna, ya que así la fase móvil gaseosa se conserva fluyendo adentro del sistema.	-Proveen de una buena capacidad de separación. -Rápida, puede llegar a realizarse en minutos. -Capacidad en separar compuestos orgánicos de acuerdo a sus volatilidades.	-Las muestras ocupadas requieren de etapas previas de preparación para evitar interferencias ni contaminación de la columna durante el análisis. -Etapas largas y complejas, aumentando así tiempo y costo del análisis. - Técnica no cualitativa eficiente, ya que necesita de técnicas auxiliares para que puedan ser identificadas las sustancias presentes en la muestra.	(Corzo, 2019) (Pássaro, y col., 2016)
Cromatografía de intercambio iónico	Técnica en la que se realiza la separación de moléculas basado en sus propiedades de carga eléctrica. Se basa en reacciones reversibles producidas cuando iones presentes en una disolución se intercambian por otros de igual signo, unidos estos últimos a una partícula sólida inmóvil, también llamada intercambiador.	-Buena velocidad de análisis -Reutilización de columnas -Fácil automatización	-Bajo rendimiento -Compleja etapa de tratamiento de la muestra.	(Valdivielso, 2015)

Cromatografía en capa fina	Basado en la separación de analitos por medio de las diferencias de velocidad a la que son transportados por una fase móvil líquida por una fase estacionaria (placa de TLC). La separación de los componentes de la muestra se presenta por cuestión de la adsorción de tal manera que el compuesto presente en la fase líquida entra en contacto con el sólido adsorbente fijándose a la superficie por medio de una fuerza física, sin conllevar algún intercambio de electrones.	<ul style="list-style-type: none"> -Uso de reactivos en bajas cantidades. - Todos los diversos compuestos pueden ser identificados en una misma corrida. - Son de traslado fácil a diversos lugares donde se necesite hacer algún tipo de análisis. -Presenta facilidad para ajustar y acondicionar los parámetros operativos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Limitada especificidad y la baja sensibilidad. -Bajo control del flujo de la fase móvil ya que en las separaciones se carece de instrumentación que domine la velocidad y el tiempo al cual se efectúa la separación. -Dificultad en la cuantificación de los analitos. 	(Vallejo, Barrios, & Anaya, 2021)
-----------------------------------	--	--	--	-----------------------------------

Por otro lado, en la Tabla 8, se muestran aquellos métodos analíticos utilizados para determinar antioxidantes presentes en alimentos y nutraceuticos.

Tabla 8. Métodos analíticos para determinar antioxidantes presentes en alimentos y nutraceuticos.

Antioxidante	Método analítico	Ref.
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> • Reacción de cloruro férrico • Cromatografía de gases • Cromatografía líquida de alta eficiencia • HPLC de fase inversa (RP-HPLC) • HPLC en fase normal • Colorimetría 	(Diez, 2018) (Sánchez L. M., 2016)
Vitamina A	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía líquida de alta eficiencia • HPLC de fase inversa (RP-HPLC) 	(Sánchez L. M., 2016)
Vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación iodimétrica • Espectrofotométricos indirectos • Fluorimétrico • HPLC de fase inversa (RP-HPLC) • Método del indofenol • Electroforesis capilar • Polarografía 	(Fang, 2017)
Polifenoles	<ul style="list-style-type: none"> • Folin-Ciocalteu • Cromatografía líquida • HPLC • Cromatografía de gases • Cromatografía en capa fina 	(Bohorquez, 2016) (Diez, 2018)
Zinc Cobre Manganeso Selenio Hierro	<ul style="list-style-type: none"> • Espectrofotometría • HPLC • Potenciometría • Titulometría • Fluorometría • ASV 	(Poitevin, 2016)
	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía en capa fina 	

Antioxidante	Método analítico	Ref.
Glutamina Taurina Creatina Glucosamina Ácidos grasos	<ul style="list-style-type: none"> • Cromatografía en columna • HPLC • Cromatografía de gases • Espectrometría de masas • Detector de ionización de llama (FID), • Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC-UV) 	(Fayos, 2019) (Mishra, Srivastava, & Sharma, 2021)

Sin embargo, a todo esto se debe tener en cuenta que en la práctica se han ido desarrollando diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante de las sustancias halladas en los diversos tipos de sustratos. Habiendo que tomar en cuenta que dichos métodos deben reunir ciertas condiciones ideales para realizar la determinación de la capacidad antioxidante, como:

- 6.4.4.1.1 Presentar un mecanismo químico definido y un punto final.
- 6.4.4.1.2 Debe ser capaz de evaluar reacciones de transferencia de electrones y de átomos de hidrogeno.
- 6.4.4.1.3 Presentar adaptabilidad para medir antioxidantes hidrófilos y lipofílicos.

Cada método presenta una característica única y las diferencias que existen entre ellos se hayan en la formación del sistema de radicales libres, en la diana molecular, en el punto final, la adecuación a antioxidantes lipófilos o hidrófilos y en la relevancia fisiológica.

A causa de estas diferencias existentes entre los métodos, se recomienda el uso de al menos dos métodos y más de un estándar para determinar la capacidad antioxidante de una muestra o sustrato, en vista de que los antioxidantes responden de diversas maneras a las distintas especies reactivas, en los diferentes ensayos. Es por esto, que es importante saber desde un inicio, que no existe un único método sencillo y universal por el cual se pueda medir la capacidad antioxidante de forma precisa y cuantitativa, por tanto ocupar diversos métodos, puede facilitar la comparación de los resultados. (Trujillo, 2019)

6.4.5 Otros métodos

Lo que hoy en día se requiere es de métodos que brinden información en tiempo real, que ejerzan control y trazabilidad en cada uno de los procesos implicados y que además garanticen la seguridad e inocuidad de los productos de interés. Sin embargo, en la actualidad, las técnicas analíticas tradicionales, como la cromatografía líquida de alta resolución y la cromatografía de gases, están bien aceptadas al ser eficientes para separar e identificar antioxidantes en muestras complejas, siendo así que se toman como estándares de oro para el control de calidad y de seguridad, pero estos procedimientos convencionales son engorrosos, lentos, requieren instrumentación costosa y operadores calificados, al igual requieren de una mayor cantidad de muestras y reactivos, sus procesos manuales consumen mucho tiempo, por lo tanto, no son adecuados para la detección rápida de la actividad antioxidante. Alternativamente, los biosensores pueden proporcionar un método invaluable para la

detección de la actividad antioxidante, ya que son convenientes, al demostrar ser más rápidos (análisis en tiempo real), más sensibles y más específicos en relación a los compuestos analizados, son portátiles y no requieren habilidades especiales para operar, agregando que son de bajo costo, flexibles, fáciles de usar, tienen posibilidad de uso remoto, reproducibles, presentan estabilidad a largo plazo, presentan una necesidad mínima de pretratamiento de la muestras. (Abdullah & Uddin, 2016) (Munteanu & Apetrei, 2022)

En la Tabla 9, se describen algunos ejemplos de biosensores que determinan la capacidad antioxidante.

Tabla 9. Biosensores comúnmente utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante.

Biosensor	Fundamento	Ref.
<p>Biosensores electroquímicos basados en Tirosinasa</p>	<p>La tirosinasa es una enzima que tiene dos sitios catalíticos característicos: uno para el fenol hidroxilación (actividad cresolásica) y uno para oxidación de difenol, hasta quinona (actividad catecolásica). La acción oxidorreductasa de la tirosinasa está asegurada por la transferencia reversible de electrones a través de iones de cobre ($Cu^+ \leftrightarrow Cu^{2+}$). La enzima tirosinasa se usa con mayor frecuencia para lograr biosensores para determinar fenoles en muestras de alimentos.</p>	<p>(Munteanu & Apetrei, 2022)</p>
<p>Biosensores electroquímicos basados en peroxidasa</p>	<p>Las peroxidasas son enzimas que catalizan las reacciones de oxidación-reducción por el mecanismo de radicales libres. Convierten los sustratos en productos oxidados o polimerizados. La peroxidasa de rábano picante (HRP) es una de las peroxidasas más utilizadas en aplicaciones bioquímicas y biotecnológicas. Sin embargo, existen pocos estudios sobre biosensores electroquímicos basados en peroxidasa en la determinación de antioxidantes.</p>	
<p>Biosensores electroquímicos basados en Lacasa</p>	<p>La lacasa pertenece a la familia de las multicobre oxidasas, es decir, un grupo que incluye muchas enzimas con diferentes especificidades para diferentes sustratos y diversas funciones biológicas. Esta enzima cataliza la oxidación de fenoles, difenoles y otros polifenoles en derivados de quinona, sin requerir H_2O_2 como cosustrato. Entre las enzimas redox, la lacasa tiene muy buena estabilidad, lo que la hace ideal para análisis de antioxidantes.</p>	

A todo esto para hablar de biosensores es importante describir su composición, siendo que estos se tratan de sensores, es decir, dispositivos capaces de detectar y cuantificar un elemento en concreto de una solución (analito), pero con la peculiaridad de que lo hace a través de biomoléculas, por lo que, no se trata de un sensor que detecta biomoléculas, sino de un sensor que utiliza biomoléculas para detectar otros analitos.

6.5 Sensores

Un sensor es aquel dispositivo que transforma la información física o/u química en una señal útil con la facultad de ser procesada, así facilitando la información de interés, al ser rápido y sin necesidad de análisis muy complejos. (Martín, 2015)

Existen dos diferentes tipos de sensores:

1. Físicos: son aquellos que cuantifican propiedades como temperatura, humedad, presión, etc., en otras palabras no existen reacciones químicas en la detección.
2. Químicos: son aquellos dispositivos miniaturizados que transforman información química en tiempo real, como la concentración de un analito dentro de una muestra compleja, en una señal analítica útil, de manera reversible y selectiva, en otras palabras la señal deriva de una reacción química.

La interacción existente ente la especie química a cuantificar y el sensor, por lo general constan de dos fases: por un lado el reconocimiento y por el otro la amplificación de la señal producida en ese reconocimiento. (Martín, 2015)

En la Figura 1, se presenta un clásico ejemplo de lo que un sensor químico posee:

6.5.1.1 Fase sensora: en esta se localiza el receptor inmovilizado encargado del reconocimiento molecular. El reconocimiento reside en una interacción selectiva entre el analito y el receptor, el cual tiene una enorme afinidad por el mismo.

6.5.1.2 Transductor: este es encargado de transformar la energía producida por la interacción del analito con la fase sensora en una señal medible.

6.5.1.3 Sistema electrónico: este facilita el análisis de los datos obtenidos. (García, 2016)

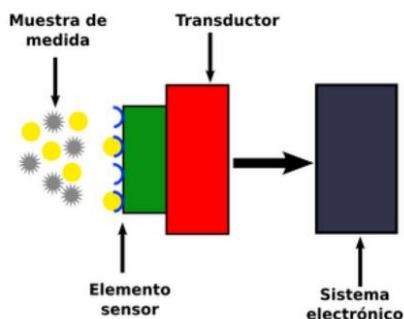


Figura 1. Operatividad básica de un sensor químico. (García, 2016)

6.5.1 Clasificación

A todo esto los sensores químicos pueden ser clasificados de diversas formas: por un lado, en función de la naturaleza de la fase sensora, ya que esta pueden ser materiales bióticos (o biológicos) o abióticos (sintéticos). Y por otra parte, en función del sistema de transducción, ya que estos pueden ser electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos o térmicos.

De manera que los sensores químicos cuya fase sensora sea de origen biológico serán conocidos como biosensores. (Gutiérrez O., 2015)

6.6 Biosensores

Un biosensor es definido como aquel dispositivo conformado por dos principales elementos: primero por un receptor biológico, el cual es preparado para que interactúe específicamente con un analito y por otro lado de un transductor o sensor, que es apto para descifrar la reacción de reconocimiento biológico que genera el receptor, transformándola en una señal medible. Siendo el material biológico quien concede la selectividad del biosensor, en tanto la sensibilidad vendrá dada por el transductor.

Así mismo, el principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica que ocurre entre el analito de interés con el receptor biológico. A consecuencia de esa interacción, se genera el cambio de una o de distintas propiedades físico-químicas, tales como: eléctricas, mecánicas, ópticas, térmicas, etc., que son detectadas por el transductor, ya que traduce la respuesta del receptor biológico en una señal electrónica indicando la existencia del analito sometido a estudio o proporcional a su concentración en la muestra. (Gómez, 2013)

Los biosensores vienen en diferentes tamaños y formas y pueden detectar y medir incluso concentraciones bajas de patógenos específicos o sustancias químicas tóxicas y niveles de pH. La Figura 2, presenta lo que comprende un biosensor típico, el cual cumple con lo siguiente:

1. Analito: Sustancia de interés cuyos constituyentes están siendo identificados o detectados (por ejemplo, glucosa, amoníaco, alcohol y lactosa).
2. Bioreceptor: Biomolécula (molécula) o un elemento biológico que puede reconocer el sustrato objetivo (es decir, un analito) se conoce como bioreceptor (por ejemplo, enzimas, células, aptámeros, ácido desoxirribonucleico (ADN o ARN) y anticuerpos). El proceso de producción de señales durante la interacción entre bioreceptores y el analito se llama bioreconocimiento.
3. Transductor: Un dispositivo que transforma la energía de una forma a otra. Convierte el evento de bioreconocimiento en una señal medible (eléctrica) que se relaciona con la cantidad o en presencia de un objetivo químico o biológico. Este proceso de conversión de energía se conoce como señalización. Según el principio de funcionamiento, los transductores se clasifican en términos generales como electroquímicos, ópticos, térmicos, electrónicos, y transductores gravimétricos.

4. Electrónica: La señal transducida se procesa y prepara para la pantalla. Las señales eléctricas obtenidas del transductor se amplifican y se convierten en forma digital. Las señales procesadas son cuantificadas por la unidad de visualización.
5. Pantalla: La unidad de pantalla está compuesta por un sistema de interpretación del usuario, como una computadora o una impresora que genera la salida para que la respuesta correspondiente pueda ser leída y comprensible por el usuario. (Naresh & Lee, 2021)

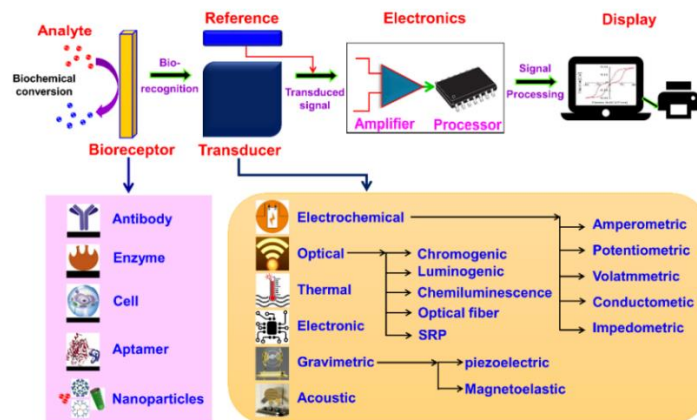


Figura 2. Diagrama esquemático de un biosensor típico. (Naresh & Lee, 2021)

6.6.1 Características de los Biosensores

Para desarrollar un sistema biosensor altamente efectivo y capaz, son necesarios ciertos requisitos estáticos y dinámicos. Sobre la base de estas especificaciones, el rendimiento de los biosensores se puede optimizar para usos comerciales.

6.6.1.1 Selectividad: la selectividad es una característica crucial a considerar cuando se selecciona un biorreceptor para un biosensor. Un biorreceptor puede detectar una molécula de analito objetivo en particular en una muestra compuesta por una mezcla de especias y contaminantes no deseados.

6.6.1.2 Sensibilidad: La cantidad mínima de analito. Cuanto mayor sea la linealidad (línea recta), mayor será la detección de concentración de sustrato.

6.6.1.3 Tiempo de respuesta: El tiempo que se toma para obtener el 95% de los resultados.

6.6.1.4 Reproducibilidad: La reproducibilidad se caracteriza por la precisión (salida similar cuando la muestra se mide más de una vez) y exactitud (capacidad de un sensor para generar un valor medio más cercano al valor real cuando la muestra se mide cada vez). Es la capacidad del biosensor para producir resultados idénticos siempre que la misma muestra se mida más de una vez que se puede detectar/identificar correctamente en un número mínimo de pasos y en

bajas concentraciones (ng/mL o fg/mL) para verificar la existencia de trazas de analito en la muestra.

6.6.1.5 Linealidad: La linealidad contribuye a la precisión de los resultados medidos.

6.6.1.6 Estabilidad: La estabilidad es una de las características clave en las aplicaciones de biosensores donde se requiere un monitoreo continuo. La estabilidad es el grado de vulnerabilidad a las perturbaciones ambientales dentro y fuera del dispositivo biosensor. Los factores que afectan la estabilidad son la afinidad del biorreceptor (el grado de unión del analito al biorreceptor) y la degradación del biorreceptor con el tiempo. (Naresh & Lee, 2021)

6.6.2 Clasificación

Los biorreceptores se consideran el componente principal en la construcción de biosensores. Según el biorreceptor, los biosensores se clasifican en biosensores enzimáticos (la clase de biosensores más común), inmunosensores (poseen alta especificidad y sensibilidad y son específicamente útiles en el diagnóstico), biosensores basados en aptámeros o ácidos nucleicos (poseen alta especificidad para cepas microbianas y analito que contiene ácido nucleico), y biosensores microbianos o de células enteras. La segunda clasificación se realiza sobre la base del transductor y los sensores se clasifican en electroquímicos (que se agrupan además en potenciométricos, amperométricos, de impedancia y conductimétricos), biosensores electrónicos, biosensores térmicos, ópticos y basados en masa o gravimétricos. (Naresh & Lee, 2021)

6.6.3 Tipos de biosensores

6.6.3.1 Biosensores en función de los elementos biológicos de reconocimiento.

Todas aquellas moléculas empleadas en los biosensores como receptores biológicos deben obedecer criterios elementales para ser utilizadas como unidades de detección. Para empezar deben presentar afinidad hacia el analito de interés, es decir, de aquel que quiere detectarse, las cuales deben ser altamente selectivas para distinguir al analito de interés en presencia de otros compuestos y así mismo deben mantenerse estables en el transcurso del tiempo. (Gómez, 2013)

En la Tabla 10, se describen los distintos tipos de biosensores conocidos a la fecha y su aplicación en función del elemento biológico de reconocimiento.

Tabla 10. Biosensores en función de los elementos biológicos de reconocimiento.

Sensor	Elemento de reconocimiento	Aplicación	Ventajas	Desventajas	Ref.
Biocatalíticos: Basados en el empleo de	Enzimas	Utilizados en análisis de control de calidad.	-Alta sensibilidad -Rápida respuesta	- Sensibles a condiciones ambientales, como: pH,	(Beleño, 2019)

<p>catalizadores que median en una reacción química, donde participan uno o diversos sustratos, para así originar uno o distintos productos. Acabado el proceso, el biocatalizados se regenera y puede ser reutilizado. Pueden ser utilizados para:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Detectar la existencia de algún sustrato que interviene en la reacción. -Para calcular la desaparición de algún cosustrato o cofactor conocido y determinable. 		<p>También se utilizan para aplicaciones clínicas como los utilizados para el autocontrol de los niveles de glucosa en sangre. Prometedoras en el diagnóstico médico, medio ambiente, industria de bioprociamiento, alimentos y análisis de agua, seguridad y bioterrorismo. Son de ayuda en el monitoreo de la presencia de productos, biomasa, anticuerpos, subproductos, enzimas, metabolitos, etc., durante una fermentación. También se usan en la detección de patógenos en los alimentos o su deterioro causado por ellos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Autorregenerables -Permiten monitorización continua -No requiere lavado de muestra -Disponibilidad de diversas enzimas -Permiten amplificar señales -Sencillos de diseñar -Construcción sencilla -Uso fácil 	<p>temperatura o fuerza iónica</p> <ul style="list-style-type: none"> -Necesitan la presencia de cofactores -Llegan a ser inhibidos por sustancias de la muestra -Presentan limitado tiempo de vida 	<p>(González, y col., 2017)</p> <p>(Murali, Srinivas, Sasi, & Jakeer, 2017)</p> <p>(Kaur, Choudhary, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019)</p> <p>(Hasan, y col., 2014)</p>
	<p>Células completas (bacterianas, fúngicas, protozoos)</p>	<p>Se utilizan en la determinación de la cantidad total de compuestos orgánicos oxidables. También son utilizados en la determinación de agentes antimicrobianos que suprimen la respiración</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Pueden ser utilizadas para el análisis de diferentes compuestos -De bajo costo -Escasa preparación previa -No se requiere adición de cofactores. -Buena estabilidad - Gran capacidad de aclimatación 	<ul style="list-style-type: none"> -Respuesta lenta -Selectividad limitada -Baja sensibilidad -Pueden descomponer compuestos orgánicos. 	<p>(Velasco, 2018)</p> <p>(Korotkaya, 2014)</p> <p>(Hasan, y col., 2014)</p>

		microbiana. Igual se emplean en estudios toxicológicos para estimar la concentración letal media de sustancias tóxicas.	condiciones indeseables		
	Orgánulos subcelulares (cloroplastos completos, tilacoides o mitocondrias)	Se pueden utilizar para medir la concentración de calcio en el medio. Sin embargo, la aplicación de las mitocondrias funciona para la detección de la contaminación del agua.	-Baja preparación previa	-Respuesta lenta -Baja sensibilidad	(Velasco, 2018) (Hasan, y col., 2014)
	Tejidos	Se utilizan con frecuencia para detectar parámetros globales como condición de estrés, toxicidad y derivados orgánicos y para monitorear el efecto del tratamiento de las drogas.	-Bajo costo -No necesitan añadir cofactores para la regeneración enzimática. -Construcción simple -Alta estabilidad -Alta actividad -Fácil inmovilización	-Sensibilidad baja - De lenta respuesta - Falta de especificidad	(Velasco, 2018) (Hasan, y col., 2014)

<p>Bioafinidad:</p> <p>Basado en la interacción entre el analito de estudio con el receptor biológico, sin que medie transformación catalítica. Es decir, que en la interacción existirá una modificación de un equilibrio en el que se formará un complejo analito-receptor. Sin embargo, como en la interacción no se consumen reactivos ni se forman productos, se marca al analito involucrado en la interacción con el receptor o si no al de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor.</p>	<p>Anticuerpos</p>	<p>Utilizados en detectar a los participantes de la interacción inmunoquímica, a saber, los anticuerpos y el antígeno. Siempre que existan anticuerpos específicos, los inmunosensores pueden detectar cualquier compuesto.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Alta sensibilidad y especificidad -Estabilidad química -Afinidad variable -Rápida respuesta -Costo bajo. 	<ul style="list-style-type: none"> -Complicada regeneración. -Necesitan de contacto directo con la muestra. -Requieren marcaje. -No amplifican la señal. -Saturación al no existir un consumo del analito. -No es posible detectar sustancias desconocidas. 	<p>(Beleño, 2019)</p> <p>(Korotkaya, 2014)</p>
	<p>Lectinas</p>	<p>Son utilizadas para el estudio de las interacciones proteína-carbohidrato, ya que reconocen y se unen específicamente a la estructura de los carbohidratos sin modificarlos. Descifradores de glicocodificadores.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Fácil utilización -De gran disponibilidad -Pueden asociarse a distintos tipos de transductores. -Rápidos -Alto rendimiento -Amplio rango lineal 	<ul style="list-style-type: none"> -Selectividad limitada -Sensibilidad baja -Costosas -Análisis de datos complejos 	<p>(Gutiérrez E. , 2014)</p> <p>(Bertók, Katrík, Gemeiner, & Tkac, 2013)</p>
	<p>Ácidos nucleicos</p>	<p>Considerados como candidatos adecuados para el diagnóstico rápido y económico de enfermedades genéticas y de la detección de especies biológicas patógenas de interés clínico.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Estabilidad química -Buena selectividad -Buena estabilidad -Simples -Rápidos -Baratos 	<ul style="list-style-type: none"> -Selectividad limitada 	<p>(Beleño, 2019)</p> <p>(Velasco, 2018)</p> <p>(Monošíka, Stredánský b, & Šturdíka, 2012)</p> <p>(Murali, Srinivas, Sasi, & Jakeer, 2017)</p>

	<p>Polímeros de Impresión Molecular</p>	<p>Utilizados en la detección rápida de biomarcadores clínicos para el diagnóstico y el seguimiento de enfermedades .</p> <p>Además de presentar una asombrosa variedad de aplicaciones dentro de la biotecnología y la atención médica. Otras aplicaciones incluyen el diagnóstico de enfermedades infecciosas o patógenos transmitidos por los alimentos.</p>	<p>-Alta sensibilidad y selectividad</p> <p>-Desarrollo de PIMs destinados a diferentes analitos incluso para aquellas especies para las que aún no se ha encontrado un elemento de reconocimiento biológico.</p> <p>- Presentan buena especificidad</p> <p>-Tiempo de vida largo</p> <p>- Posibilidad de ser almacenado a temperatura ambiente sin ninguna pérdida en la actividad</p>	<p>-Su tecnología continúa en desarrollo.</p> <p>- Altos tiempo de análisis al existir baja afinidad del analito hacia el PIM para unirse.</p> <p>-Se necesitan elevadas concentraciones de molécula molde.</p> <p>-La síntesis de los PIM conllevan múltiples etapas, lo que resulta laborioso.</p> <p>-Complicaciones para operar en medios acuosos.</p> <p>-Costosos</p>	<p>(Beleño, 2019)</p> <p>(Crapnell, Dempsey, Peeters, Tridente, & Banks, 2020)</p> <p>(Marfà, Pupin, Sotomayor, & Pividori, 2021)</p>
	<p>Aptámeros</p>	<p>Es una herramienta excelente para la biodetección en el diagnóstico médico. Son aplicados para la detección de prácticamente un número ilimitado de compuestos. También son útiles para la detectar moléculas pequeñas, como toxinas, pesticidas y otros contaminantes ambientales, hormonas, etc.</p>	<p>-Presentan una elevada estabilidad</p> <p>-Fácil inmovilización sobre las superficies.</p> <p>-Costos bajos de producción a gran escala.</p> <p>- Excelente reproducibilidad estructural</p> <p>- Tiempo de vida largo</p> <p>- Posibilidad de regeneración</p> <p>- Pueden ser almacenados en condiciones secas durante varios meses sin cambiar sus propiedades.</p>	<p>- Pequeñas constantes de afinidad</p> <p>- Puede cambiar de conformación en presencia de proteínas</p> <p>- Bastante sensibles a su entorno</p>	<p>(Beleño, 2019)</p> <p>(Hianik, 2017)</p>
	<p>Ácidos nucleicos peptídicos</p>	<p>Utilizados en biología</p>	<p>-Elevada</p>	<p>-Manipulación complicada</p>	<p>(Torres, 2020)</p>

		molecular y en diagnósticos genéticos, al igual que, para detectar fármacos y diferentes patógenos.	sensibilidad y selectividad		
--	--	---	-----------------------------	--	--

6.6.3.2 Biosensores en función del transductor.

Los transductores en los cuales se encuentra inmovilizado el receptor biológico, su principal función es convertir la interacción que hay entre el analito y el receptor en una señal eléctrica cuantificable, la cual es vinculada con la concentración de aquel analito. El empleo de algún transductor u otro va a depender del receptor biológico utilizado, de la naturaleza de la interacción de este con el analito y del mecanismo de señalización. (Gómez, 2013)

En la Tabla 11, se describen los distintos tipos de biosensores conocidos a la fecha y su aplicación en función del transductor.

Tabla 11. Clasificación de biosensores en función del transductor.

Transductor	Clasificación	Aplicación	Ventajas	Desventajas	Ref.
Electroquímico: Basado en la interacción selectiva del analito de interés con el elemento de reconocimiento produciendo una señal eléctrica relacionada con la concentración del analito de estudio.	Potenciométricos	Cuantifican la diferencia de potencial existente en dos electrodos, manteniendo la corriente constante. Los distintos tipos de reacción química o formación de complejos, generan especies cargadas que al acercarse al electrodo de trabajo producen una diferencia de potencial respecto a un electrodo de referencia.	-Operación simple a causa de su tamaño pequeño. -Simples de usar -Fabricación sencilla -Rápidos	-Baja sensibilidad -Se pueden unir de forma inespecífica a otros iones presentes en la muestra.	(Royano, 2020) (Franco, 2013)
	Amperométricos	Cuantifican la intensidad de corriente producida encima de la superficie del electrodo por una reacción de oxidación-reducción. La intensidad es directamente proporcional a la	-Simple operación debido a su tamaño pequeño. -Rápidos -Económicos -Sensibles -Aplicaciones en elevada variedad de muestras.	-Selectividad baja -Ocupan electrodos de referencia.	(Royano, 2020) (Franco, 2013)

		cantidad de especie electroactiva y se relaciona con la concentración de analito.			
	Conductimétricos	Cuantifican cambios en la conductividad del medio. Las reacciones químicas o la formación de distintos complejos alteran la concentración de iones en el medio, modificando su movilidad hacia el ánodo y el cátodo. Esta modificación en la movilidad varía las propiedades conductoras del medio, así mismo cambiando la transferencia de cargas.	-Simple operación debido a su tamaño pequeño. -Fácil uso -Fabricación sencilla -Rápidos	-Sensibilidad baja	(Royano, 2020) (Franco, 2013) (Monošík a, Stredánskýb, & Šturdíka, 2012)
Ópticos: El principio de funcionamiento de un biosensor óptico es generar señales, que son proporcionales a la concentración del analito y proporcionar una detección paralela en tiempo real y sin etiquetas. Los biosensores ópticos utilizan enzimas, anticuerpos, aptámeros, células enteras y tejidos como elementos de biorreconocimiento. Su proceso de transducción induce un cambio en la	Sensores de fibra óptica	Emplea un campo óptico para cuantificar especies biológicas, tales como: células completas, proteínas y aptámeros. Se requiere el uso de marcadores como indicadores ópticamente activos, ya sean colorantes sensibles al pH, a la concentración de oxígeno o al peróxido de hidrógeno y moléculas fluorescentes. A raíz de la interacción del analito con el elemento de reconocimiento se genera un cambio detectable en el marcador que es	-Flexibles -Baratos -Realizan análisis en tiempo real -Sensibles -No requiere de electrodos de referencia -Tamaño pequeño -Mayor versatilidad	-Requiere marcaje - El componente biológico presenta una vida limitada	(Franco, 2013) (Garcés, 2019) (Naresh & Lee, 2021)

<p>absorción, transmisión, reflexión, amplitud, frecuencia y/o polarización de la luz, en respuesta a cambios físicos o químicos creados por los elementos de biorreconocimiento.</p>		<p>propagado por la fibra óptica hacia el detector.</p>			
	<p>Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)</p>	<p>Detectan el cambio en el índice de refracción generado por la interacción molecular en una superficie metálica a través de ondas de plasmones superficiales. El fenómeno SPR, se presenta cuando la luz polarizada ilumina una superficie metálica en la interfaz entre dos medios de distintos índices de refracción, en un cierto ángulo produce ondas de densidad de carga de electrones llamadas plasmones.</p>	<p>-No requiere de electrodos de referencia -Tamaño pequeño -No se necesita de marcadores -Elevada afinidad -Detección directa -Detección en tiempo real -Sensibles - No se necesita purificación de muestra.</p>	<p>-Sensibles a ciertas temperaturas -De costo elevado</p>	<p>(Franco, 2013) (Naresh & Lee, 2021)</p>
	<p>Campo Evanescente (Ew)</p>	<p>La luz guiada en una guía de ondas ópticas o fibras rodeadas por un medio de bajo índice de refracción se refleja totalmente internamente después de golpear la interfaz. Esto da como resultado la generación de una onda que normalmente se extiende desde la interfaz hacia el medio de índice más bajo, llamada onda evanescente. Por lo que, cualquier interacción molecular producida en ese campo (como la unión de un analito a un receptor inmovilizado en la superficie) genera</p>	<p>-Detección directa -Rápidos -Detección selectiva del analito -Sensibles -Selectivos -Simples</p>	<p>- Necesita de marcaje</p>	<p>(Franco, 2013) (Bhattarai & Hameed, 2020)</p>

		modificaciones en las características de la luz que se propaga por la guía de ondas que pueden cuantificarse y relacionarse con la concentración del analito.			
<p>Mecánicos: Detectan cambios de masa generados encima de la superficie del sensor, al igual detectan otras propiedades, como: densidad y viscosidad de fluidos. Sin embargo, la interacción del analito con el receptor biológico genera una respuesta de tipo mecánico, el cual radica un cambio de la flexión de la estructura y/o de la frecuencia de resonancia.</p>	Mecánicos estáticos	Se basa en la inmovilización de las moléculas receptores en un solo lado del dispositivo, de tal forma que cuando se produzca la unión del analito, se producirá un cambio en la tensión superficial de ese lado con respecto al otro, dando como resultado una flexión.	<ul style="list-style-type: none"> -Detección directa -No requieren marcaje - Fáciles de usar - Baratos -Sensibles -Rápidos 	<ul style="list-style-type: none"> -Elevados pasos para el lavado y secado -Interferencia en medio líquido -La incubación requiere de tiempos largos -Falta de selectividad 	<p>(Gómez, 2013)</p> <p>(Zaripova, Petrova, & Lezhnina, 2019)</p>
	Mecánicos resonantes	Basados en la cuantificación de las variaciones de la frecuencia de la resonancia a causa del cambio de masa o a la variación de las propiedades del sensor generadas por la adsorción de moléculas sobre su superficie.			<p>(Gómez, 2013)</p> <p>(Zaripova, Petrova, & Lezhnina, 2019)</p>
<p>Térmicos: Explora las características básicas de las reacciones biológicas (exotérmicas o endotérmicas), es decir, la medición de la energía térmica absorbida o liberada durante la reacción.</p>	Calorimétricos	Miden el cambio de calor, que se controla directamente para calcular el grado de reacción (para el catalizador) o la dinámica estructural de las biomoléculas en estado disuelto.	<ul style="list-style-type: none"> -Fáciles de usar -Baratos -Sensibles -Bajo consumo de energía -Medición de múltiples muestras -No requieren una recalibración frecuente. -Son insensibles 	<ul style="list-style-type: none"> -Perdidas de calor por irradiación, conducción o convección -Procesos largos - Falta de especificidad en la medición de la temperatura - No existe una forma directa de discriminar entre cambios de calor específicos y no específicos 	<p>(Gómez, 2013)</p> <p>(Naresh & Lee, 2021)</p> <p>(Monošík a, Středánskýb, & Šturdíka, 2012)</p>

			a las propiedades ópticas y electroquímicas de la muestra		
--	--	--	---	--	--

Por otro lado, por su alta selectividad y sensibilidad, es decir, por aquella capacidad de reconocer un tipo de compuesto en particular en una mezcla donde otros compuestos están presentes, en este trabajo se estudiarán a las enzimas como elementos biológicos de reconocimiento siendo estas de las más utilizadas en la construcción de biosensores a causa de su bajo costo, disponibilidad en el mercado, fácil manipulación, simplicidad y por su capacidad de respuesta rápida en comparación con los otros diferentes tipos de bioreceptores. (Gómez, 2013)

Además, lo que contribuye a que los biosensores enzimáticos electroquímicos sean de los más abundantes y más estudiados e investigados, es la combinación entre las ventajas resultantes del empleo de enzimas, como su alta selectividad, respuesta rápida y gran disponibilidad comercialmente, y las ventajas provenientes de las técnicas electroquímicas para la construcción de biosensores, como la simplicidad, facilidad de miniaturización, sensibilidad suficiente para los analitos de interés, y bajo costo de la instrumentación. (Gutiérrez O., 2015)

Sin embargo, es de suma importancia que al preparar biosensores enzimáticos, se lleve a cabo la determinación de la sensibilidad de la enzima a las condiciones experimentales. También debe considerarse parámetros como: origen y disponibilidad de la enzima así como su estabilidad operacional y de almacenamiento, agregando el procedimiento de inmovilización y las características del soporte (superficie del electrodo). (Beleño, 2019)

Por tanto, en la Tabla 12, se describen los distintos métodos que existen para la transferencia de electrones entre la enzima y el transductor electroquímico, conduciendo así a diversos enfoques en el desarrollo de biosensores utilizando como bioreceptor a las enzimas.

Tabla 12. Biosensores enzimáticos de primera, segunda y tercera generación.

Biosensor	Fundamento	Ilustración	Ref.
Primera generación	La enzima es inmovilizada en la superficie del transductor y se supervisa al sustrato analito por medio de la medición del producto enzimático (es decir, H ₂ O ₂ , NADH, etc.) o por el monitoreo del consumo del cofactor, como el oxígeno.		(Beleño, 2019) (Naresh & Lee, 2021)

Biosensor	Fundamento	Ilustración	Ref.
Segunda generación	Se utiliza de un mediador (aceptor de electrones) que reacciona con el sitio activo de la enzima (reduciéndose), después reacciona con la superficie del electrodo, donde transfiere electrones (oxidándose) así produciendo una señal de corriente que es proporcional a la concentración del analíto. De tal forma, que se elimina la dependencia del oxígeno.		
Tercera generación	La transferencia de electrones de la enzima al electrodo se genera de forma directa sin mediadores o sustratos durante la transformación catalítica del sustrato al producto. La enzima redox trabaja como electrocatalizador facilitando la transferencia de electrones entre el electrodo y la molécula de sustrato.		

6.7 Enzimas

Las enzimas son proteínas, constituidas por aminoácidos unidos covalentemente, los cuales catalizan una diversidad de reacciones químicas. Sin embargo, su actividad catalítica depende del mantenimiento de su plegamiento, mejor dicho, de su estructura tridimensional, donde se generan cavidades, conocidas como “sitio activo”, que presentan afinidad por moléculas específicas que se transformaran en productos. La unión de algún grupo funcional químico con estas cavidades produce interacciones covalentes y no covalentes entre la proteína y el sustrato, así favoreciendo el cambio del sustrato a producto. Así al terminar la transformación del sustrato y liberarse el producto del sitio activo, la enzima vuelve a su estado original, lo que le permite involucrarse en un nuevo ciclo de catálisis, como se muestra en la Figura 3. (Ramírez & Ayala, 2014)

Así mismo, a causa de sus complejas estructuras moleculares, la distribución de los aminoácidos en el sitio activo de la enzima normalmente encontrado en el centro de la proteína, incita a que un único sustrato específico se le una haciendo a la biomolécula muy selectiva para un tipo de molécula de sustrato, (de forma muy parecida a una llave que se ajusta a un candado) así mostrando una alta selectividad por esta, esto posibilita que se pueda detectar de forma muy selectiva sustancias individuales en mezclas complejas. Esto descarta la necesidad de llevar acabo etapas que consumen tiempo y que requieran mano de obra especializada, justo como el pretratamiento de la muestra y la separación de interferencias, comúnmente necesarias en este tipo de muestras complejas. (Beleño, 2019)

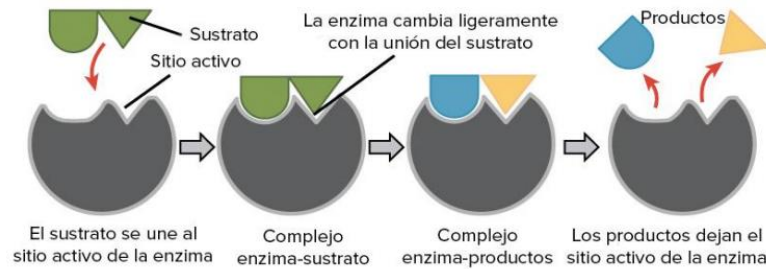


Figura 3. Representación esquemática de una reacción enzimática catalizada. (Beleño, 2019)

6.7.1 Tipos de enzimas

Existente distintos tipos de enzimas, las cuales se clasifican en virtud al tipo de reacción que desempeñan:

- 6.7.1.1 Oxidoreductasas: catalizan reacciones de óxido-reducción, o sea, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro.
- 6.7.1.2 Transferasas: catalizan la transferencia de un grupo químico, de un sustrato a otro.
- 6.7.1.3 Hidrolasas: catalizan reacciones de hidrólisis.
- 6.7.1.4 Liasas: catalizan adiciones de grupos a enlaces dobles o generación de enlaces dobles por eliminación de grupos.
- 6.7.1.5 Isomerasas: se encargan de la interconversión de isómeros.

A causa de la capacidad redox que presentan las oxidoreductasas tienden a ser las más usadas para actuar como bioreceptores en biosensores electroquímicos. (García, 2016)

Sin embargo, varios biosensores electroquímicos han sido probados para la determinación de antioxidantes utilizando la enzima tirosinasa como bioreceptor. Esta enzima también conocida como polifenol oxidasa perteneciente a la familia de las oxidasas, se distingue por su capacidad de catalizar la oxidación de fenoles, es por ello que en este trabajo se ha decidido utilizarla para llevar a cabo la detección de antioxidantes a causa de su selectividad para la detección de fenoles y polifenoles, agregando su gran uso en la investigación científica. (Martín, 2015)

6.7.2 Tirosinasa

La cuproproteína tirosinasa o polifenol oxidasa (TYR) (monofenol, o-difenol: oxígeno óxido-reductasa, EC 1.14.18.1), contiene cobre en su sitio activo y desempeña cuatro funciones básicas:

- 1) Transferencia electrónica.
- 2) Almacenamiento, transporte y consumo de oxígeno.
- 3) Almacenaje, transporte y recogida de ión metálico.
- 4) Catálisis.

Existen siete sitios activos distintos en las cuproproteínas (tipo-1, tipo-2, tipo3, tipo-4, CuA, CuB y CuZ). La enzima tirosinasa posee un centro activo tipo-3, formado por dos átomos de cobre, donde cada uno se coordina a tres residuos de histidina. (Ortiz, 2016)

6.7.2.1 Fuentes de Tirosinasa

La enzima tirosinasa puede ser hallada en bacterias, plantas, hongos, artrópodos y mamíferos (Tabla 13), y son responsables de la pigmentación y protección frente a la radiación, entre otras funciones. (Ortiz, 2016)

Tabla 13. Principales fuentes de la enzima Tirosinasa.

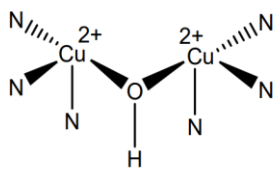
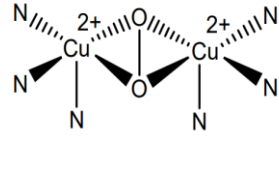
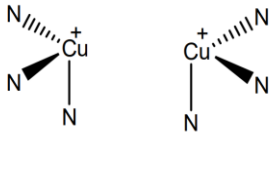
Fuentes		Ref.
Tirosinasa de bacterias	Bacterianas del género <i>Streptomyces</i> , <i>S. nigrifaciens</i> y <i>S. glaucescens</i> , <i>Bacillus</i> (<i>B. megaterium</i> y <i>B. thuringiensis</i>), <i>Pseudomonas melanogenum</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Thermomicrobium roseum</i> y <i>Marinomonas mediterránea</i> entre otras.	(Ortiz, 2016)
Tirosinasa de hongos	Procedente del champiñón <i>Agaricus bisporus</i> y del ascomiceto, <i>Neurospora crassa</i> .	
Tirosinasa de plantas	Tejidos vegetales, entre ellos: pera, manzana, aguacate, caqui, melocotón, mora, mandarina, patata, remolacha, menta, tabaco, café, álamo, hoja del árbol de caucho, lechuga, mango y melocotón de los trópicos.	
Tirosinasa de artrópodos	La tirosinasa o también llamada fenoloxidasa (PO) de insectos.	
Tirosinasa de mamíferos	La tirosinasa de mamíferos es una glicoproteína con diversos azúcares unidos en residuos de asparagina.	

6.7.2.2 Estados de oxidación del cobre del sitio activo

En la Tabla 14, se describen las tres formas enzimáticas existentes de tirosinasa, que dependen del estado de oxidación del cobre: metatirosinasa, oxirosinasa y desoxirosinasa.

Tabla 14. Estados de oxidación del sitio activo de Tirosinasa.

Estado de oxidación	Fundamento	Modelo	Ref.

<p>Metatirosinasa (Em)</p>	<p>Este término se refiere a la forma bicúprica de la enzima libre de oxígeno, en el cual los iones Cu (II) se coordinan por tres residuos de histidina y así ambos unidos a un hidroxilo.</p> <p>Esta forma enzimática es activa catalíticamente sobre o-difenoles.</p>		<p>(Ortiz, 2016)</p> <p>(Marín, 2013)</p>
<p>Oxitirosinasa (Eox)</p>	<p>En esta forma enzimática el oxígeno está enlazado en forma de peróxido a los dos iones Cu (II) incluyéndose en el mismo plano. Esta interviene sobre sustratos monofenólicos y difenólicos.</p> <p>Esta forma de la enzima es obtenida por medio de la adición del H₂O₂ a metatirosinasa o por medio de la unión reversible de una molécula de oxígeno a desoxitirosinasa.</p>		
<p>Desoxitirosinasa (Ed)</p>	<p>Forma enzimática donde el sitio activo consiste de dos iones Cu (I). Esta forma es un intermedio del ciclo catalítico, el cual no opera sobre monofenoles y o-difenoles. De manera que es necesario que la desoxitirosinasa se enlace al oxígeno para transformarse en oxitirosinasa, con los dos iones de cobre oxidados a Cu (II), para que así realice la oxidación de los sustratos.</p>		

6.7.2.3 Actividad catalítica

Las oxigenasas son enzimas que añaden uno o dos átomos de oxígeno por mol de sustrato, así dividiéndose en monooxigenasas y dioxigenasas. De tal forma que, tirosinasa es una monooxigenasa u oxidasa de función mixta, que cataliza la reducción de un átomo de oxígeno a agua, en tanto que, otro es transferido al sustrato. Esta enzima está distribuida en toda la escala filogenética y cataliza dos reacciones en donde participa el oxígeno molecular:

6.7.2.3.1 Hidroxilación de monofenoles a o-difenoles (actividad monofenolasa)

La forma oxi de la enzima interacciona con un monofenol y causa su hidroxilación, consiguiendo un o-difenol, el cual se oxida en el sitio activo originando a la o-quinona o puede ser liberado al medio, como se muestra en la Figura 4. Siendo así que, si o-difenol se oxida, se genera desoxitirosinasa, que en equilibrio se une rápidamente a una molécula de oxígeno, transformándose en oxitirosinasa. Por otro lado, si o-difenol se libera al medio, se genera metatirosinasa, que interacciona con otra molécula de o-difenol oxidándola a o-quinona, convirtiéndose en desoxitirosinasa, que después reacciona con oxígeno, originando oxitirosinasa. (Marín, 2013)

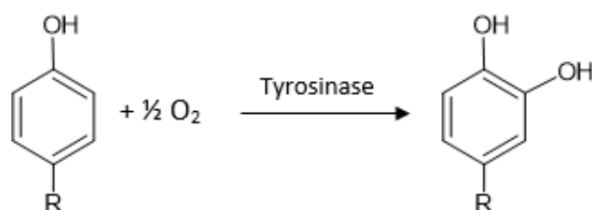


Figura 4. Mecanismo de reacción de la tirosinasa (actividad monofelasa). (Munteanu & Apetrei, 2022)

6.7.2.3.2 Oxidación de o-difenoles a o-quinonas, (actividad difenolasa)

El ciclo catalítico comienza con la forma metatirosinasa, llevando a cabo la oxidación de un sustrato o-difenólico a o-quinona en presencia de oxígeno, como se muestra el Figura 5. Siendo así que, el o-difenol es oxidado para generar la reducción del Cu(II) del sitio activo de metatirosinasa al estado Cu(I), así generando la forma desoxitirosinasa, proceso en el que se ven involucrados dos electrones y en el que se forma una molécula de o-quinona y otra de agua. La forma desoxitirosinasa reacciona de forma reversible con el oxígeno así generando oxirosinasa, con la que los cobres del sitio activo regresan al estado Cu(II). La oxirosinasa al reaccionar con una segunda molécula de o-difenol da origen a la metatirosinasa y o-quinona, de tal forma que así se cierra el ciclo catalítico. (Marín, 2013)

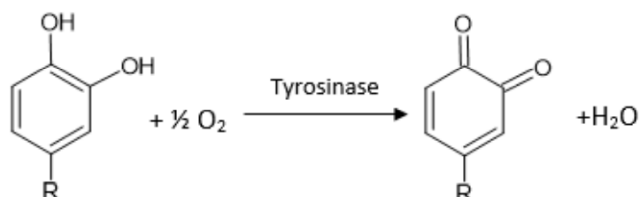


Figura 5. Mecanismo de reacción de la tirosinasa (actividad difenolasa). (Munteanu & Apetrei, 2022)

Tirosinasa se trata de una enzima con muy poca especificidad de sustrato y cuyos productos de reacción (o-quinonas) son moléculas muy inestables y reactivas. Agregando que esta no es activa a pH ácido, siendo un pH neutro el óptimo para que se genere una alta actividad enzimática. (Ortiz, 2016)

Es de gran interés la utilización de enzimas en procesos industriales cuando estas son adheridas a un soporte inerte. Por tanto, su inmovilización es una etapa importante en la rentabilidad operacional y económica de su utilización.

Los distintos métodos de inmovilización pueden mejorar las propiedades catalíticas de la enzima a causa de la estabilización producida por una disminución de las alteraciones conformacionales en función de la exposición a factores como, temperatura, pH y solventes, que pueden generar la inactivación de la enzima. Asimismo las enzimas inmovilizadas dan paso a ser utilizadas después de una serie de ciclos de reacción y además permiten una sencilla separación del producto final posterior a la reacción. Así sabiendo las ventajas que presenta la inmovilización de las enzimas y que existen diferentes metodologías y soportes disponibles, se prefiere

aplicar alguno de los métodos que sea el más adecuado desde el punto costo-beneficio. (Santos, y col., 2015)

Es por ello que deberán ser analizados los diferentes métodos de inmovilización así eligiendo al que más se apegue a las necesidades de la investigación.

6.8 Técnicas de inmovilización

La inmovilización del receptor biológico sobre una superficie sólida es uno de los pasos más importante en la fabricación de un biosensor, por lo que, de una correcta inmovilización dependerá el buen funcionamiento del dispositivo. (Royano, 2020) (Gómez, 2013) Sin embargo, la elección del método va a depender de la naturaleza del receptor biológico, del tipo de sistema transductor a utilizar, las propiedades fisicoquímicas del analito y las condiciones de trabajo del biosensor. (Beleño, 2019)

La inmovilización del elemento biológico se define como aquel enlace de moléculas a una superficie, que genera una disminución o pérdida de movilidad de las mismas. Así mismo, el objetivo principal de la técnica es mantener la actividad biológica y favorecer o al menos no alterar la cinética de la reacción biológica, debido a que factores como la precisión, la reproducibilidad de las medidas y el tiempo de vida del biosensor están influenciadas por la estabilidad de las biomoléculas inmovilizadas. (Gómez, 2013)

La idea más fácil de inmovilizar una biomolécula está en enlazarla directamente sobre la superficie del electrodo, aunque, esta opción no tiende a ser la que arroje los mejores resultados. Lo que se requiere es de una interface que pueda estar constituida por nanomateriales, estructuras tridimensionales que actúen de andamio para la biomolécula (como redes sol-gel) o interfaces combinadas, compuestas por una red tridimensional o polimérica que soporte a los nanomateriales que por su parte inmovilizarán la biomolécula receptora. (Royano, 2020)

Siendo así que existen distintos métodos para realizar la inmovilización (Figura 6), cada uno de ellos presenta una serie de ventajas y de inconvenientes que se describen en la Tabla 15, por lo que debe considerarse que en ciertas situaciones el protocolo de inmovilización más adecuado puede ser aquel que este conformado por la combinación de varios métodos de inmovilización. (Gómez, 2013)

Tabla 15. Métodos de inmovilización de la enzima.

Tipo de método	Método	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Ref.
Retención física	Atrapamiento	En la solución las enzimas son libres pero son inmovilizadas por atrapamiento ya que sus movimientos son limitados por la estructura de un gel. El atrapamiento tiene lugar en una matriz polimérica, la cual reduce algunos	-Contaminación limitada -De costo bajo -Requiere poca cantidad de enzima -No se modifica la enzima -Mayor estabilidad	-Difícil de implementar -Impide accesibilidad al sitio activo de la enzima -La enzima puede desprenderse del soporte	(Ayala, 2021) (Beleño, 2019) (Alarcón, 2017)

		movimientos rotacionales y de despliegue, sin embargo, esto no imposibilita el reconocimiento del sustrato, así como su acción catalítica.			(Cebrián, 2020)
	Microencapsulación	Basado en el encierro de la enzima en una membrana que es situada encima de la superficie del electrodo. Esta detiene a la enzima de forma segura mostrando una controlada porosidad, lo que posibilita una libre difusión entre el sustrato y los productos de la reacción.	<ul style="list-style-type: none"> -Íntima unión del biomaterial con el transductor -Sencillo -Encapsulan una gran diversidad de enzimas -Alta actividad y resistencia a cambios de pH y temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> -Problemas de difusión -Rotura de las capsulas -Problemas de reutilización 	
Unión química	Enlace covalente	Orientado en la activación de grupos químicos presentes en el soporte para que interaccionen con nucleófilos de las proteínas. Comúnmente el enlace se conforma por los grupos funcionales situados en la superficie de la matriz y los grupos funcionales que pertenecen a los aminoácidos residuales ubicados en la superficie de la enzima.	<ul style="list-style-type: none"> -Elevada estabilidad -Presenta estabilidad ante condiciones extremas -Reproducible -Efectivo -Durable -La unión es muy fuerte 	<ul style="list-style-type: none"> -Pérdida de la actividad enzimática, riesgo de desnaturalización -Técnica laboriosa -Elevado costo -Requiere protección del centro activo -Costosos 	
	Adsorción en la superficie.	Ocurre con el involucramiento de interacciones reversibles de la enzima con el material de soporte. Siendo principalmente involucradas fuerzas electroestáticas, como: las fuerzas intermoleculares de Van der Waals, iónicas e interacciones de puentes de hidrógeno, estas crean una unión	<ul style="list-style-type: none"> - Preparación sencilla -Sin desnaturalización de la enzima. -Asequible -Económico -Efectivo 	<ul style="list-style-type: none"> -Unión muy débil -Forma derivados poco estables -Proceso con control estricto - Pérdida de la actividad enzimática 	

		razonable independientemente de que la interacción sea débil.		
	Cross-linking (entrecruzamiento)	Sucede con la unión de un polímero con otro en la formación de enlaces covalentes o iónicos, sin embargo, esto en términos bioquímicos la interacción sería polímero – proteína, haciendo referencia a un atrapamiento dentro de las cadenas poliméricas.	-Moderado costo -Presenta estabilidad en condiciones extremas -Perdida de enzima muy mínima -Efectivo -Durable -Sencillo	-Tratamiento con sustancias tóxicas. -No regenerable -Resulta costoso -Afecta el desempeño de la enzima -No soportan cambios de pH ni de temperatura -Afectación del centro activo de la enzima

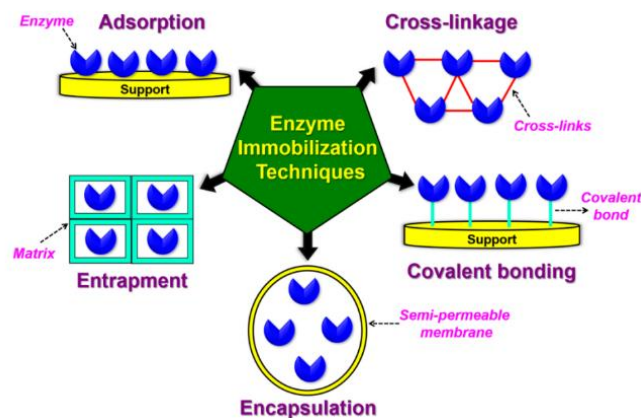


Figura 6. Técnicas de inmovilización. (Naresh & Lee, 2021)

Los distintos métodos de inmovilización tienen como fin mejorar la actividad y estabilidad enzimática sin que sea comprometida la transferencia de masa de los analitos por medio de la capa del bioreceptor. Además, el proceso debe ser práctico y barato para que permita una producción favorable de biosensores a base de enzimas para análisis. (Ayala, 2021)

Mientras tanto, el método de inmovilización que se ocupara, debe cumplir las siguientes características:

1. Debe permitir la libre difusión del sustrato hacia la enzima.
2. Debe existir adherencia en la superficie del electrodo, así previniendo que se fuguen las enzimas.
3. La pérdida de la actividad enzimática debe ser muy poca o nula.
4. Presentar una alta reproducibilidad.

A todo esto, la estabilidad de la enzima es un punto importante a analizar, puesto que a través de la inmovilización se determina su tiempo de vida y su sensibilidad, por lo que es determinada por su posición dentro de la matriz de la inmovilización, donde va a depender de factores, como:

1. Número de enlaces que tienen lugar en la matriz.
2. Ambiente en el que se ubica a la molécula de la enzima.
3. Estructuras químicas y físicas del agente inmovilizante.
4. Propiedades como si el agente está cargado, es hidrófilo, hidrofóbico, longitud de la matriz, etc. (Ayala, 2021)

Todos los métodos de inmovilización muestran ventajas e inconvenientes con respecto al resto. No existe un método ideal y general para la inmovilización de cualquier enzima. Por ello, la elección del método y condiciones de inmovilización se determina en base a la enzima concreta a inmovilizar y a la aplicación posterior que se va a dar a la preparación final obtenida. Al igual, factores como la naturaleza del sustrato, producto o tipo de reactor a utilizar tienden a ser determinantes en la elección del método de inmovilización. (Marín, 2013)

6.8.1 Propiedades de las enzimas inmovilizadas

Las enzimas al ser inmovilizadas pueden presentar cambios en sus propiedades, tales como en su actividad catalítica, estabilidad térmica, entre otras. Esto se debe, a que estas al interactuar con el soporte de inmovilización se producen cambios conformacionales en su estructura tridimensional así afectando su centro activo. Independientemente de la naturaleza de las interacciones entre el soporte y el sustrato, estas colaboran a que la interacción de la enzima inmovilizada con el sustrato se desarrolle en un microentorno distinto al de la disolución. A todo esto, resulta complicado determinar qué factor ocasiona el cambio en las enzimas. (Marín, 2013)

Por lo tanto, en la Tabla 16, se describen las afectaciones que pueden sufrir las enzimas en sus propiedades al ser inmovilizadas, mismas que deben ser consideradas al momento de construir un biosensor.

Tabla 16. Propiedades de las enzimas que pueden afectarse al ser inmovilizadas.

Propiedades de la enzima inmovilizada	Descripción	Ref.
Actividad catalítica	Tras la inmovilización de las enzimas su actividad catalítica se ve afectada. Esto se debe a que en ciertas ocasiones puede perderse la actividad enzimática a causa de factores donde, la enzima al ser inmovilizada se realice de tal modo que quede impedido el paso del sustrato al centro activo, ocasionando que algún grupo del soporte interactúe con un aminoácido del centro activo provocando que ocurra un cambio conformacional, dando lugar a una forma inactiva o desnaturalización de la enzima.	(Marín, 2013)

Especificidad por el sustrato	La inmovilización de las enzimas puede afectar la especificidad por su sustrato. Cuando es inmovilizada la enzima en algún soporte polimérico, su actividad disminuye hacia sustratos con alto peso molecular a causa de impedimentos estéricos. Por otro lado, cuando el sustrato presenta un peso molecular bajo no tiende a haber cambios en la actividad enzimática.	
Constantes cinéticas	Tras la inmovilización se presentan alteraciones en las constantes cinéticas de la enzima. El estudio cinético de la enzima tras la inmovilización es importante para comprender como le ha afectado el proceso y cuáles son sus características finales.	
Temperatura y pH óptimos	A determinados valores de temperatura y de pH se pierde la actividad catalítica a causa de la desnaturalización de la enzima. Siendo esto, la importancia que tiene el determinar los valores óptimos de temperatura y pH, lo que posibilita a la enzima a realizar su máxima actividad catalítica. Sin embargo, con el proceso de inmovilización los valores óptimos tanto de temperatura como de pH se ven alterados, ya que pueden variar sus valores a superiores, inferiores o incluso permanecer constantes.	
Estabilidad	De tras de la inmovilización se observa un aumento en la estabilidad de las enzimas. Esto puede presentarse gracias a una estabilización conformacional de la enzima (es decir, dando una mayor rigidez a su estructura y una prevención a la disociación de sus subunidades) debido a una disminución de los problemas de agregación intermolecular o a la creación de un microentorno favorable para la enzima.	
Estabilidad hacia reactivos	La inmovilización de las enzimas puede resultar favorable al aumentar su estabilidad frente a agentes desnaturalizantes, inhibidores específicos y disolventes orgánicos. Ya que la técnica ayuda a disminuir la inhibición sufrida por la enzima, ya sea excluyendo al agente inhibidor del microentorno de la enzima inmovilizada o reduciendo la afinidad de la enzima hacia el inhibidor.	
Estabilidad térmica	La actividad catalítica de las enzimas incrementa al aumentar la temperatura, sin embargo, a temperaturas excesivamente elevadas la enzima se desnaturaliza. Con la inmovilización se busca incrementar la estabilidad de una enzima frente a la temperatura operacional, pero no siempre es posible, incluso en determinados casos la estabilidad se mantiene o disminuye.	
Estabilidad operacional	La estabilidad operacional se vincula a la capacidad de reutilización de la enzima inmovilizada, haciendo hincapié al número de ciclos y duración de los mismos que es capaz de soportar manteniendo su actividad catalítica. Siendo que, sea un factor importante al momento de que la aplicación industrial de la enzima inmovilizada resulte con éxito, debido a que esto permite disminuir los costos de la producción. Este va a depender de la estabilidad térmica de la enzima, método de inmovilización, durabilidad del soporte y la presencia de inhibidores orgánicos.	

Estabilidad durante el almacenado	La estabilidad durante el almacenado es un parámetro estudiado cuando se quiere desarrollar un nuevo método de inmovilización. En ciertas ocasiones, la estabilidad de la enzima frente al tiempo de almacenamiento tiende a aumentar tras la inmovilización, por lo general no siempre es así.	
--	---	--

A todo esto, para hacer más eficiente el proceso de inmovilización de tirosinasa, en algún soporte, deben ser estudiados parámetros como: la concentración de la enzima, tiempo y pH de inmovilización y aspectos relacionados con la naturaleza del soporte y técnica de inmovilización elegido. Por otro lado, en el proceso de inmovilización es importante conocer el comportamiento y las características de la enzima a inmovilizar: pH y temperatura óptima de reacción, efecto de la reutilización, estabilidad térmica y frente al almacenado, así como el estudio de las constantes cinéticas mostradas por la enzima en su actuación sobre el sustrato ocupado. (Marín, 2013)

Después de explicar la importancia que presenta la inmovilización de las biomoléculas sobre la superficie de los electrodos (soporte), también es importante explicar los distintos tipos de electrodos que pueden ser empleados en la construcción de biosensores electroquímicos.

6.9 Electrodos

Un electrodo es un conductor eléctrico utilizado para hacer contacto con una pieza no metálica de un circuito (solución electrolítica en electroquímica). (Ayala, 2017)

Sin embargo, los electrodos y los enlaces que forman con las biomoléculas son aspectos indispensables para determinar el rendimiento y la eficacia del biosensor. Es por esto que, para la elección del soporte es fundamental el análisis de sus propiedades para así realizar el proceso de inmovilización y estabilización de biomoléculas.

Este debe presentar propiedades, como:

1. Alta selectividad hacia ciertas especies químicas.
2. Estabilidad química de dichas superficies a entornos químicos extremos.
3. Incremento en la sensibilidad y estabilidad de la señal. (Gómez, 2013)

6.9.1 Tipos de electrodos

En la Tabla 17, se describen los electrodos comúnmente utilizados en la construcción de biosensores enzimáticos.

Tabla 17. Electrodos ocupados como soporte para la inmovilización de biomoléculas.

Electrodo	Descripción	Ref.
-----------	-------------	------

Carbón Vitreo	Este tipo de electrodo presentan superficies biocompatibles con una gran diversidad de sustancias electroactivas. Además presentan una baja corriente residual en un amplio intervalo de potencial y grandes posibilidades en la formación de enlaces covalentes con una gran diversidad de sustancias.	(Menolasina, De Oliveira, & Travieso, 2013)
Platino	Metal con buenas propiedades eléctricas, presentando una alta actividad catalítica haciéndolo útil en reacciones de oxidación. Presentan una gran área superficial y características electrónicas únicas, así presentando una mayor área de superficie para la adsorción y una mejor actividad electrocatalítica.	(Khalil, Sánchez, & Videia, 2016)
Oro	Metal muy denso y blando, con baja reactividad químicamente, siendo inalterable por el aire, calor, humedad y por agentes químicos. Buen conductor de calor y de electricidad, presenta una elevada conductividad eléctrica y resistencia a la oxidación.	(Gómez, 2013)
Grafeno	Buen conductor tanto eléctrico como térmico, presentando mayor resistencia que el diamante y doscientas veces más que el acero. Muy denso, al grado que ni el gas helio (el átomo más pequeño) puede atravesarlo. Muy sensible a cualquier molécula que se deposite en su superficie.	(Gómez, 2013)

6.10 Electroquímica

La electroquímica es aquel conjunto de técnicas analíticas que utilizan la medición del potencial, carga o corriente para determinar o monitorear la reacción de una especie química (analito) en una interface entre un conductor de electrones (electrodo) y un conductor iónico (electrolito soporte) en el que hay un transporte de carga entre la especie química y la superficie del electrodo. (Díaz, 2019)

6.10.1 Celdas electroquímicas

Una celda electroquímica radica en dos conductores llamados electrodos, los cuales, están sumergidos cada uno en una solución electrolítica. Sin embargo, deben ser diferentes y estar separadas las soluciones en las que son sumergidos los dos electrodos para prevenir la reacción directa entre los reactivos. Para prevenir que se mezclen es necesario insertar un puente salino en las soluciones. Así la conducción de electricidad de una solución electrolítica hacia la otra sucede por el desplazamiento de iones de la sustancia química por la cual esté constituido dicho puente. (Díaz, 2019)

6.10.2 Tipos de celdas

Las celdas empleadas en electroquímica se clasifican en dos categorías:

6.10.2.1 Celdas galvánicas (pilas): siendo aquellas donde las reacciones en los dos electrodos tienen lugar de forma espontánea y generan un flujo de electrones que va del ánodo hacia el cátodo si se encuentran conectadas de forma externa con un conductor. Suelen ser empleadas en la transformación de la energía química en energía eléctrica. A esto se le conoce como reacción espontánea de la celda.

6.10.2.2 Celdas electrolíticas: estas celdas requieren de una fuente externa de energía eléctrica, aplicación externa del potencial de electrodo. Suelen ser utilizadas para ejecutar reacciones químicas a cambio de un gasto de energía eléctrica. Básicamente se conforman de un recipiente contenedor del electrolito y dos electrodos que funcionan, como ánodo y cátodo, siendo estos los que permiten el paso de corriente eléctrica.

Sin embargo, el término empleado para introducir los cambios químicos que acompañan a las reacciones faradaicas de los electrodos que están en contacto con el electrolito, se designa como electrólisis. En el flujo de la corriente, donde los electrones pasan del electrodo a una especie del electrolito, se define como catódica, por otro lado, el flujo de electrones que pasan de una especie del electrolito hacia el electrodo, se define como anódica. De tal manera que en las celdas galvánicas el cátodo es positivo con respecto al ánodo y en celdas electrolíticas, el cátodo es negativo con respecto al ánodo, como se muestra en la Figura 7. (Díaz, 2019)

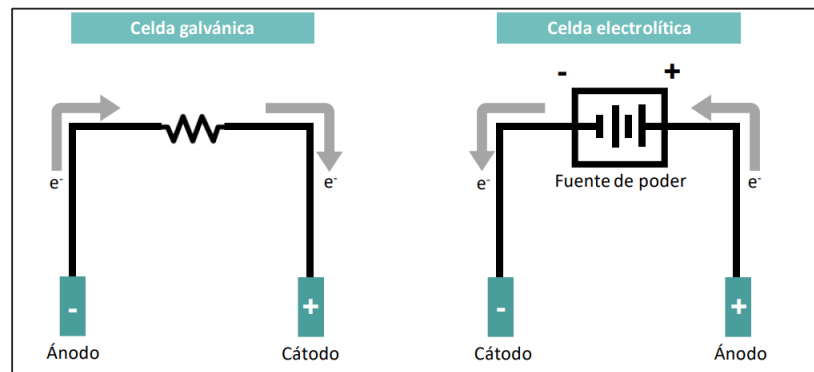


Figura 7. Tipos de celdas electroquímicas. (Díaz, 2019)

Por lo general en estas celdas puede hacerse un arreglo en el número de electrodos (Figura 8), lo cual dependerá del análisis que se requiera llevar a cabo. Estos arreglos son con celdas de dos o tres electrodos.

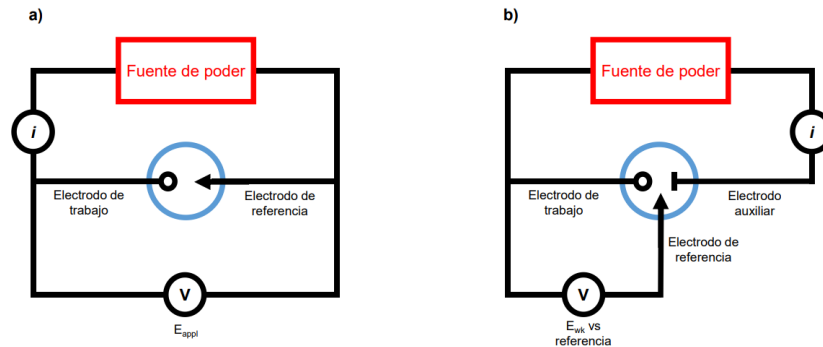


Figura 8. Celdas electroquímicas con arreglo, donde a) presenta arreglo con dos electrodos y b) presenta arreglo con tres electrodos. (Díaz, 2019)

Debe tomarse en cuenta la geométrica y el tamaño de los electrodos presentes en una celda electroquímica, ya que estos afectan de forma directa la resistencia de la solución entre los electrodos. Es así como el electrodo de trabajo al presentar un menor tamaño y este separado del electrodo de referencia, mayor es la resistencia y en caso contrario, la resistencia será menor. (Díaz, 2019)

6.10.3 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas se diferencian en la forma en cómo se aplica y se mide el potencial y la corriente en una celda electroquímica. Estas son utilizadas en la detección de compuestos orgánicos electroactivos, los cuales, destacan por su rápida respuesta al detectar cambios de corriente con respecto a la concentración del analito en la microcelda y también a su sencilla operación, todo esto a causa de que el equipo a emplear es manejable, pequeño (si se ocupan microceldas, el análisis se puede llevar a cabo con volúmenes pequeños en el orden de microlitros, facilitando la manera en que se utiliza la muestra) y los electrodos son relativamente baratos, agregando que su manipulación es sencilla. (Ayala, 2021)

En la Tabla 18, se describen las técnicas electroquímicas más aplicadas en la detección de compuestos en biosensores.

Tabla 18. Técnicas electroquímicas.

Técnica	Fundamento	Ref.
Voltamperometría cíclica	Basado en graficar la corriente en función del cambio del potencial aplicado al electrodo, de manera que mientras dura el análisis se va graficando el cambio que existe en la intensidad de corriente.	(Ayala, 2021) (Ayala, 2017)
Voltametría/Amperometría	Consisten en la aplicación de un potencial al electrodo de trabajo respecto del electrodo de referencia para cuantificar la corriente, siendo esta el resultado de la una oxidación o reducción electroquímica en el electrodo de trabajo.	(Sebastián, 2017)
Cronoamperometría	Aplica un potencial constante, partiendo de un potencial inicial	

	en el que no puede tener lugar la reducción, hasta un potencial final en el que sí puede producirse. Cuando se produce este salto de potencial, es cuando se inicia la electropolimerización, siendo este modo del cual se obtiene la variación de la intensidad en función del tiempo.	(Castrillejo, 2015)
Cronopotenciometría	Método electrolítico que consiste en el estudio del comportamiento del potencial de un electrodo indicador con el tiempo. De tal forma, que el electrodo al que se le deposita la muestra, le llega una intensidad de corriente eléctrica constante, al cual se le podrá medir la variación del potencial en función del tiempo.	(Castrillejo, 2015)

7. RESULTADOS: PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN BIOSENSOR

La inmovilización de las enzimas es un proceso por el cual se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio sobre algún medio o sustrato, para dar lugar a formas compuestas que retienen su actividad catalítica y propiedades de la propia enzima. Esta permite que las enzimas puedan ser reutilizadas repetidamente dependiendo del tipo de inmovilizado.

Sin embargo, es evidente el ahorro, tanto económico como ecológico, en las reacciones que se realizan en los distintos sectores de las industrias por el uso de enzimas inmovilizadas. Por lo que, las aplicaciones con mayor éxito, han sido aquellas donde se utilizan enzimas en su forma inmovilizada, ya que ayudan en el ahorro de añadir nuevas y, en problemas de estabilidad bajo efectos de temperatura y pH y la difícil separación del producto final de las enzimas no inmovilizadas.

Por otro lado, cuando se realiza la inmovilización la enzima sufre un cambio físico y químico, que va a depender del tipo de inmovilización empleado, siendo su estabilidad y la actividad enzimática los que sufren los mayores cambios. Por tal razón, seleccionar la forma de inmovilizar más adecuada para cada enzima es esencial para garantizar que tras la inmovilización se continúe manteniendo su efectividad. (Cebrián, 2020)

En esta investigación se ha propuesto la construcción de un biosensor, utilizando a la enzima tirosinasa como bioreceptor, la cual es inmovilizada por medio del método de entrecruzamiento. Esto se propone debido a que, de acuerdo a la literatura, el llevar a cabo la inmovilización de tirosinasa mediante la técnica por entrecruzamiento, a una concentración de 15 μL , se ha demostrado una mejora significativa en el rendimiento analítico del biosensor en términos de rango lineal, límite de detección y una mayor sensibilidad. Ya que, en el rendimiento se demuestran señales rápidas, grandes y estables, donde el tiempo de respuesta es de 20s. Por otro lado, la estabilidad estima una nula modificación de la actividad enzimática de tirosinasa, así mostrando una buena repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de almacenamiento. Agregando que la enzima tirosinasa presenta la capacidad de responder a un amplio espectro de compuestos fenólicos, lo que la hace útil en la determinación de antioxidantes, incluso con la capacidad de detectarlos a bajas concentraciones, por lo que, su uso resulta

ser considerablemente barato y no compromete la calidad de la medición de los antioxidantes en muestras reales.

Todo esto es causa a la baja concentración de enzima utilizada y por las ventajas que presenta el tipo de inmovilización empleado, ya que la inmovilización por entrecruzamiento es una técnica que se ha empleado para muchos tipos de enzimas. Con esta técnica las enzimas se inmovilizan unas con otras o mediante un agente de unión que ayude a generar enlaces entre ellas. La ventaja de este método es la sencillez de su elaboración. No obstante, el principal problema es su susceptibilidad a cambios en el pH y temperatura del medio, puesto que los enlaces resultantes de la inmovilización son de carácter intermolecular irreversibles, esto los hace capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura, sin embargo, no soportan el cambio, por lo que, si no, se controlan bien las condiciones, la extensión de los entrecruzamientos puede ser muy elevada lo que puede generar una reducción en la actividad catalítica de la enzima. (Cebrián, 2020)

Por otro lado, los reactivos entrecruzantes no distinguen si los grupos a unir pertenecen a moléculas diferentes de enzima o a una misma molécula. Así pueden formarse entrecruzamientos intramoleculares que puede producir un cambio estructural drástico de la enzima, con la consiguiente pérdida de actividad.

Es por ello que el entrecruzamiento de una enzima mediante glutaraldehído ha ayudado a perfeccionar la técnica, existiendo dos variantes: entrecruzamiento de enzimas dando lugar a cristales (CLEC) y entrecruzamiento de enzimas obteniéndose agregados moleculares (CLEA).

Donde, el (CLEC) en el cual se usa glutaraldehído ha demostrado que la enzima retenga su actividad enzimática y tengan una gran estabilidad operacional. Por otro lado, la técnica (CLEA) que consiste en precipitar una enzima que se encuentra en disolución acuosa mediante la adición de sales, disolventes orgánicos o polímeros no iónicos, dan lugar a la aparición de agregados de moléculas de enzima. Posteriormente, se origina el entrecruzamiento entre distintas moléculas de proteína a través de reactivos como glutaraldehído. Cuando la concentración de enzima es pequeña se logra facilitar la obtención de agregados entrecruzados mediante la adición de suero de albúmina bovina.

Siendo así que el método (CLEA) es más simple y económico que el método (CLEC), ya que no requiere de un complicado proceso de cristalización que además necesita partir de enzima muy pura. (Marín, 2013)

Además, en otros estudios en los que se ha utilizado una baja concentración de tirosinasa aplicando el método de inmovilización por entrecruzamiento, han expuesto una buena reproducibilidad sin necesidad de un pretratamiento, agregando un tiempo de vida del biosensor de hasta de cinco días y muy útil para el seguimiento en tiempo real de los compuestos fenólicos. (Gul, y col., 2017)

Al igual han demostrado, que el método de inmovilización por entrecruzamiento produce una matriz tridimensional en la que la tirosinasa está estrechamente pegado con el material del electrodo; lo que favorece la retención de la biomolécula en la

superficie del electrodo y también su comunicación eléctrica, lo que evita fugas de la enzima hacia la disolución. (Munteanu & Apetrei, 2022)

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Con base a la información obtenida en la revisión bibliográfica, en los siguientes apartados se enuncia el procedimiento propuesto para construir un biosensor electroquímico para la determinación de antioxidantes en nutraceuticos y en medicamentos.

8.1 Reactivos

En la construcción del biosensor, la fuente de la enzima tirosinasa son champiñones frescos del tipo *Agaricus bisporus*. Tirosinasa de hongos (EC 1.14.18.1, 5370 unidades mg^{-1}) (Tyr); Glutaraldehído 25% (GA); Albúmina de suero bovino (BSA); Reactivo de Folin-Ciocalteu (FC); Carbonato de sodio Na_2CO_3 , Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El grafito se obtiene de Aldrich, el aceite mineral se obtiene de Fluka, el negro de humo N220 (CB) de grado estándar industrial se obtuvo de Cabot Corporation. Los reactivos ocupados fueron de grado analítico y las soluciones se prepararon con agua destilada.

8.2 Equipo

Para el análisis se utiliza un potenciostato, entre las marcas utilizadas se encuentra Autolab ó PalmSens con resolución de 0.1% en el rango de corriente más bajo (1 pA). El sistema de tres electrodos consta de un electrodo de trabajo (puede ser pasta de carbón), un electrodo de referencia $\text{Ag}=\text{AgCl}$ (3M NaCl) y un electrodo auxiliar (puede ser platino). También se utiliza un espectrofotómetro UV Vis con cubeta rectangular de 25 mm de diámetro.

8.3 Preparación de electrodos de pasta de carbono

La pasta de carbón de grafito o la pasta de negro de carbón se prepara mezclando grafito o negro de carbón con aceite de parafina. En el caso de la pasta de grafito se utiliza un 30% de aceite de parafina y para el electrodo de pasta de negro de carbón (CBPE) se utiliza un 50% de aceite de parafina. Las pastas resultantes se empaquetan en el tubo hueco de teflón (electrodo de trabajo) (3 mm de diámetro) y se pule la superficie expuesta a la solución. El contacto eléctrico lo proporciona un hilo de cobre. Las pastas se mantienen a temperatura ambiente hasta su uso.

8.4 Extracción de Tirosinasa de Hongos (*Agaricus bisporus*)

La purificación de tirosinasa se adapta del trabajo de Gouzi y Benman sour (2007). Una cantidad de 150 g de champiñones se lavan minuciosamente con agua destilada, se secan a temperatura ambiente y se muelen en un molino que contenga 246 mL de acetona (99,5%) a +4 °C. La suspensión de pulpa se filtra a través de un tejido, prensado manualmente hasta obtener un residuo seco, y puesto en contacto con hielo

durante al menos 4 horas. Luego se muele la pulpa fría, se suspende en 192 mL de agua destilada y se deja durante la noche (15 h) a 5 °C. Luego de esto, la suspensión se filtra nuevamente a través de tejido. La última solución se filtra dos veces al vacío sobre papel de filtro cualitativo (125 mm de diámetro) utilizando un embudo Buchner para eliminar las partículas restantes. La solución enzimática semipurificada final se evalúa en cuanto a su contenido de proteína y actividad enzimática.

De acuerdo con el método de Bradford, la concentración de proteína debe ser de 0,4 mg/mL utilizando como referencia la albúmina de suero bovino. La actividad enzimática se determina usando DL-DOPA como sustrato, el producto (dopacromo) se detecta a 475 nm. Se tiene en cuenta que una unidad de tirosinasa se define como la cantidad de enzima que transforma un micromol de DOPA por minuto en las condiciones de operación. Esta tirosinasa semipurificada (SP-Tyr) se utilizó para la fabricación de los biosensores.

8.5 Preparación de biosensores

8.5.1 Inmovilización por entrecruzamiento

De acuerdo a lo reportado en la literatura, se sugiere iniciar con una cantidad de tirosinasa de 15 µL de solución de Tyr (170 UI/mL) y hacer una mezcla con 7.5 µL de BSA (1%) y 7.5 µL de glutaraldehído al 0.25%, esto es susceptible a cambios, por lo que es necesario una optimización para obtener la mejor respuesta analítica, así como la estabilidad del biosensor. Después de mezclar y antes de la coagulación de la mezcla (alrededor de 10 segundos), se esparcen suavemente 7.5 µL de esta mezcla para la preparación de los biosensores CPE-Tyr y CBPE-Tyr.

8.6 Mediciones usando amperometría y voltamperometría de barrido lineal

Las mediciones se realizarán utilizando un potencióstato. El análisis se realizará en una celda electroquímica que contenga 10 ml de tampón de fosfato 0.1 M pH 6.5. Para la voltamperometría de barrido lineal, el barrido va de -0.4 V a 0.4 V, a una velocidad de barrido de 0.05 V/s en solución sin agitar y en ausencia de oxígeno. Los experimentos amperométricos se realizan a potencial fijo (aprox. 150 mV vs. Ag=AgCl) y bajo agitación constante. La señal de la corriente medida se registra. Se construyen curvas de calibración de los compuestos estándar.

Para el análisis se usa una celda electroquímica usando una solución tampón de fosfato 0.1 M pH 6.5. La técnica para la caracterización del comportamiento electroquímico es voltamperometría de barrido lineal, el barrido va de -0.4 V a 0.4 V, a una velocidad de barrido de 0.05 V/s en solución sin agitar y en ausencia de oxígeno, esto último para evitar la oxidación del analito. Los experimentos amperométricos se realizan a potencial fijo (aprox. 150 mV vs. Ag=AgCl, susceptible a optimización) y bajo agitación constante. La señal de la corriente medida se registra, para finalmente construir curvas de calibración de los compuestos estándar.

8.7 Método Folin-Ciocalteu

El método Folin-Ciocalteu se utiliza como guía para comparar los resultados obtenidos con el análisis amperométrico. Una cantidad de 4 mL del sustrato fenólico y 2,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) a 1 mL de agua destilada. Después de 5 min se agrega 2.5 mL de carbonato de sodio al 20%, dejándose reposar la mezcla durante 1 hr. La determinación de polifenoles totales se realiza espectrofotométricamente a 725 nm. Se realizan curvas de calibración referidas a ácido caféico y la absorbancia cero se obtiene reemplazando la muestra de ácido caféico por agua destilada. (Nadifiyine, y col., 2013)

9. CONCLUSIÓN

Se propone la construcción de biosensores enzimáticos utilizando a la enzima tirosinasa con el método de inmovilización por entrecruzamiento, ya que así se puede tener uno de los mejores métodos de análisis para el campo de la investigación médica, debido a que representan una tecnología prometedora para el monitoreo y detección de antioxidantes en formulaciones farmacéuticas y productos nutracéuticos. El biosensor propuesto tiene la capacidad de detectar el contenido total de compuestos fenólicos al igual que un compuesto fenólico en específico, destacando sus ventajas como su sencilla fabricación y manejo, su bajo costo, la elevada sensibilidad y especificidad, además de ser reproducibles, presentar estabilidad a largo plazo y de respuesta rápida. Este biosensor podría ser de gran utilidad para la industria farmacéutica, en la sustitución de las técnicas analíticas, ya que los actuales procedimientos son lentos y requieren de instrumentación costosa como de operadores calificados.

10. RECOMENDACIONES

La técnica de inmovilización de enzimas en superficies de electrodos es muy estudiada y practicada, sin embargo, pueden existir algunas dificultades que requieren soluciones innovadoras. Para una correcta inmovilización de una enzima se deben tener en cuenta varios aspectos: compatibilidad con los materiales avanzados utilizados en el desarrollo del biosensor, cambios en las propiedades conductoras de la superficie del electrodo, evitar la inactivación de la enzima en el sitio catalítico. Por lo que, el proceso de inmovilización debe ser reproducible, simple, con un bajo costo y con el menor tiempo de procesamiento. Independientemente del método de inmovilización, las enzimas deben conservar su actividad biológica y no resorberse durante el uso operativo del biosensor. (Naresh & Lee, 2021)

Los biosensores son una herramienta analítica ideal para su utilización en distintas áreas, por tanto, su correcta inmovilización de la enzima sobre el soporte, así como los materiales utilizados serán esenciales para el mantenimiento de su actividad para lograr una buena estabilidad del dispositivo, así que, las mejoras que se lleven a cabo en este tipo de dispositivo propuesto, podría convertirlo en el futuro en una prometedora tecnología para el análisis de antioxidantes en productos nutracéuticos

y medicamentos. Por lo que, se sugieren la aplicabilidad de este biosensor en aplicaciones reales en las industrias farmacéuticas para la determinación de antioxidantes en productos nutracéuticos y medicamentos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, S., & Uddin, M. (2016). *Introduction to Food Biosensors*. Food Biosensors, 1-21. Obtenido de: <https://pubs.rsc.org/en/content/chapterhtml/2016/bk9781782623618-00001?isbn=978-1-78262-361-8&sercode=bk> (Acceso 27/04/2022).

Alarcón, D. A. (2017). *Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa para la degradación de contaminantes*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Obtenido de: https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/833/1/tesis_Alarc%C3%B3n_Pay%C3%A1n_Dulce_Biblioteca_ECL_EGM_Corregida_11_ene_2016.pdf (Acceso 03/06/2022).

Andrade, M., Chaug, M., Andino, F., & Rodríguez, D. (Julio - Diciembre de 2017) *Sobre las propiedades y los usos de la glutamina en la citorreducción tumoral*. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, 27 (2): 430-464. Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubalnut/can-2017/can172l.pdf> (Acceso 29/03/2022).

Ayala, A. G. (Junio de 2017). *Determinación de compuestos fenólicos empleando electrodos enzimáticos serigrafados*. Universidad Autónoma de Baja California; Instituto de Ingeniería. Obtenido de: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/2648/1/MXL120648.pdf> (Acceso 15/06/2022).

Ayala, A. G. (Agosto de 2021). *Cuantificación voltamétrica de contaminantes orgánicos de origen industrial*. Universidad Autónoma de Baja California; Instituto de Ingeniería. Obtenido de: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/8115/1/MXL122999.pdf> (Acceso 02/06/2022).

Badawy, M., Sobeh, M., Xiao, J., & Farag, M. (2021). *Androstenedione (a natural steroid and a drug supplement): a comprehensive review of its consumption, metabolism, health effects, and toxicity with sex differences*. Molecules, 26 (20): 6210. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/molecules-26-06210.pdf> (Acceso 20/03/2022).

Beleño, M. T. (Agosto de 2019). *Desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos para la vigilancia medioambiental*. Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería. Obtenido de: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/1435/1/MXL122271.pdf> (Acceso 10/05/2022).

Benítez, A., Villanueva, J., González, G., Alcántar, V., Puga, R., & Quintero, A. (2020). *Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP)*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 23: 1-9. Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2020/cqb201d.pdf> (Acceso 10/06/2022).

Bertók, T., Katrlík, J., Gemeiner, P., & Tkac, J. (January 2013). *Electrochemical lectin based biosensors as a label-free tool in glycomics*. Mikrochim Acta, 180(1): 1-13. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/Electrochemicallectinbasedbiosensorsasalabel-freetoolinglycomics.pdf> (Acceso 13/05/2022).

Bhattarai, P., & Hameed, S. (2020). *Basics of biosensors and nanobiosensors*. Peking University; Department of Biomedical Engineering. Obtenido de: https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527345108_c01.pdf (Acceso 19/05/2022).

Bohorquez, R. (2016). *Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de Diplostephium phylloides (Kunth) Wedd.* Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A; Facultad de Ciencia y Tecnología. Obtenido de: <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/591/Determinaci%C3%B3n%20de%20actividad%20antioxidante%20Displstephium%20philyciode.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Acceso 06/04/2022).

Cárdenas, A. I. (Junio de 2015). *Desarrollo metodológico de la técnica CUPRAC mediante determinaciones electroquímicas y preparación de un electrodo modificado químicamente para evaluar propiedades antioxidantes*. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica. Obtenido de: [file:///C:/Users/hp/Downloads/Desarrollo%20metodol%C3%B3gico%20de%20la%20t%C3%A9cnica%20cuprac%20mediante%20determinaciones%20electroqu%C3%ADmicas%20y%20preparaci%C3%B3n%20de%20un%20electrodo%20modificado%20qu%C3%ADmicamente%20para%20evaluar%20propiedades%20antioxidantes%20\(18\).pdf](file:///C:/Users/hp/Downloads/Desarrollo%20metodol%C3%B3gico%20de%20la%20t%C3%A9cnica%20cuprac%20mediante%20determinaciones%20electroqu%C3%ADmicas%20y%20preparaci%C3%B3n%20de%20un%20electrodo%20modificado%20qu%C3%ADmicamente%20para%20evaluar%20propiedades%20antioxidantes%20(18).pdf) (Acceso 10/04/2022).

Castrillejo, O. (Julio de 2015). *Desarrollo y aplicación de sensores poliméricos con nanopartículas de oro para la detección de antioxidantes en la industria de la alimentación*. Universidad de Valladolid; Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica. Obtenido de: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/14064/TFG-I-286.pdf?sequence=1> (Acceso 24/06/2022).

Cebrián, S. (Junio de 2020). *Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas*. Universitat Politècnica de Valencia. Obtenido de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/147843/Cebri%C3%A1n%20-%20Nuevos%20m%C3%A9todos%20y%20soportes%20para%20la%20inmovilizaci%C3%B3n%20de%20enzimas.pdf?sequence=1> (Acceso 08/06/2022).

Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (Junio de 2015). *Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana*. Rev Chil Nutr, 42 (2): 206-212. Obtenido de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf> (Acceso 03/03/2022).

Cortez, J. D., Faicán, M. A., Pirovani, M. E., & Piagentini, A. M. (2018). *Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu*. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 19 (2). Obtenido de: <https://www.redalyc.org/journal/813/81357541002/81357541002.pdf> (Acceso 17/04/2022).

Corzo, A. (Mayo de 2019). *Técnicas de análisis en química orgánica cromatografía*. Universidad Nacional de Santiago del Estero; Facultad de Ciencias Forestales. Obtenido de: <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/SD-44-Cromatografia-CORZO.pdf> (Acceso 21/04/2022).

Crapnell, R. D., Dempsey, N. C., Peeters, M., Tridente, A., & Banks, C. E. (2020). *Molecularly imprinted polymer based electrochemical biosensors: overcoming the challenges of detecting vital biomarkers and speeding up diagnosis*. Talanta Open 2. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/Molecularly_imprinted_polymer_based_electrochemica.pdf (Acceso 13/05/2022).

Csiszár, J., Horváth, E., Béla, K., & Gallé, Á. (2016). *Glutathione-related enzyme system: glutathione reductase (GR), glutathione transferases (GSTs) and glutathione peroxidases (GPXs)*. Springer International Publishing Switzerland. Obtenido de: <https://core.ac.uk/download/pdf/160025413.pdf> (Acceso 10/04/2022).

David, M., Florescu, M., & Bala, C. (2020). *Biosensors for antioxidants detection: trends and perspectives*. Biosensors, 10 (9): 112. Obtenido de: C:/Users/hp/Downloads/Biosensors_for_Antioxidants_Detection_Trends_and_P.pdf (Acceso 19/02/2022).

Díaz, J. C. (Julio de 2019). *Desarrollo y fabricación de un biosensor electroquímico para mediciones de glucosa en plataformas microfluídicas*. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica. Obtenido de: <https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/408/1/TESIS%20JAN-CARLO%20DIAZ%20GONZALEZ.%202019%20MAE%20a.pdf> (Acceso 03/03/2022).

Diez, L. (Febrero de 2018). *Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en olivas*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de: <http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/tesis/2016/161187.pdf> (Acceso 24/04/2022).

Fang, Z. (Junio de 2017). *Métodos analíticos para la determinación de vitamina C en alimentos*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ZHONGWEI%20FANG.pdf> (Acceso 24/04/2022).

Fayos, O. (2019). *Desarrollo y aplicación de técnicas analíticas y biotecnológicas para el estudio de compuestos nutraceuticos en pomiento (Capsicum spp.) y cebolla (Allium cepa L.)*. Universidad de Zaragoza. Obtenido de: <https://zaguan.unizar.es/record/78872/files/TESIS-2019-073.pdf> (Acceso 24/04/2022).

Fernández, L. (Mayo-Agosto de 2016). *Glucosamina y sulfato de condroitina en el tratamiento de la osteoartritis*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 47 (2): 93-99. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181245821004.pdf> (Acceso 30/03/2022).

Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). *Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles*. Materials, 14 (15): 4135. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/materials-14-04135-v2.pdf> (Acceso 15/03/2022).

Franco, E. (Junio de 2013). *Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial*. Universidad Autónoma de Barcelona; Facultad de Medicina. Obtenido de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/125864/edjf1de1.pdf?sequence=1> (Acceso 17/05/2022).

Garcés, K. (2019). *Transductor de fibra óptica con potencial uso como biosensor*. Universidad EIA; Ingeniería Biomédica. Obtenido de: https://repository.eia.edu.co/bitstream/handle/11190/2462/GarcesKatherin_2019_TRansductorFibraOptica.pdf?sequence=1&isAllowed=y (Acceso 17/05/2022).

García, S. (Julio de 2016). *Biosensores de PEDOT-PSS modificados para la detección de antioxidantes*. Universidad de Valladolid; Escuela de Ingenierías Industriales. Obtenido de: <https://core.ac.uk/download/pdf/211102503.pdf> (Acceso 03/05/2022).

Gómez, J. O. (Julio de 2013). *Resonadores piezoeléctricos como plataforma para el desarrollo de inmunosensores*. Universidad de Castilla la Mancha. Obtenido de: <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/3484/TESIS%20Oliver%20G%C3%B3mez.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Acceso 07/05/2022).

González, G., Triana, L., Smith, M., Tovar, A., Cabello, R., Uceró, C., . . . & López, M. (Julio-Diciembre de 2017). *Enzimas antioxidantes y marcadores de peroxidación lipídica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2*. Comunidad y Salud, 15 (2): 1-13. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/3757/375754623002.pdf> (Acceso 15/03/2022).

Gruszycki, M. R., Valenzuela, G. M., Báez, M., Leguiza, P. D., Gruszycki, A. E., & Alba, D. A. (2019). *Evaluación de la actividad antioxidante en extractos hidroalcohólicos de Portulaca oleracea L.* Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., 48(2): 425-435. Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v48n2/0034-7418-rccqf-48-02-425.pdf> (Acceso 15/04/2022).

Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., . . . Mair, A. L. (Febrero de 2017). *Probióticos y prebióticos*. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Obtenido de: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf> (Acceso 30/03/2022).

Guija, E., Inocente, M., Ponce, J., & Zarzosa, E. (2015). *Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante*. *Horiz Med*, 15 (1): 57-60. Obtenido de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf> (Acceso 15/04/2022).

Gul, I., Ahmad, M. S., Saqlan, S. M., Hussain, A., Wali, R., Farooqi, A. A., & Ahmed, I. (May-June 2017). *Polyphenol oxidase (PPO) based biosensors for detection of phenolic compounds: a review*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5 (03): 072-085. Obtenido de: https://jabonline.in/admin/php/uploads/216_pdf.pdf (Acceso 05/07/2022).

Gutiérrez, E. (Enero de 2014). *Desarrollo de un biosensor para la detección de antígenos asociados a cáncer en suero sanguíneo*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Obtenido de: <https://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/maestria/2020/evelin-gutierrez-moreno.pdf> (Acceso 13/05/2022).

Gutiérrez, O. (Julio de 2015). *Sensor enzimático de papel*. Universidad de Oviedo, Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo; Master en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Obtenido de: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32151/TFM_OLAYA%20AMOR%20GUTIERREZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y (Acceso 06/05/2022).

Hasan, A., Nurunnabi, M., Morshed, M., Paul, A., Polini, A., Kuila, T., . . . Jaffa, A. A. (2014). *Recent advances in application of biosensors in tissue engineering*. *BioMed Research International*. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/Recent_Advances_in_Application_of_Biosensors_in_Ti.pdf (Acceso 11/05/2022).

Hianik, T. (January 2017). *Aptamer-based biosensors*. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, 7: 11-19. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/Encyclopedy_Chemistry.pdf (Acceso 13/05/2022).

Hoti, G., Matencio, A., Rubin Pedrazzo, A., Cecone, C., Appleton, S., Khazaei Monfared, Y., . . . & Trotta, F. (2022). *Nutraceutical concepts and dextrin-based delivery systems*. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (8): 4102. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/ijms-23-04102-v2.pdf> (Acceso 28/03/2022)

Huet, C. (Febrero de 2017). *Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20HUET%20BRE%C3%91A.pdf> (Acceso 15/04/2022).

Igartua, I. (2015). *Mecanismos implicados en la potenciación sináptica inducida por la coaplicación de cafeína y taurina*. Instituto Ramón Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Obtenido de: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/669603/igartua_pascual_itziar.pdf (Acceso 30/03/2022).

Jamanca, N. C., & Alfaro, S. (2017). *Antioxidantes en los alimentos*. Universidad Nacional de Barranca. Obtenido de: https://repositorio.unab.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12935/17/NC_Antiox_Nicode mo.pdf?sequence=1&isAllowed=y (Acceso 12/03/2022).

Jiménez, A., M., S., & Martínez, M. (2012). *Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café*. AN. VET. (MURCIA), 28: 67-78. Obtenido de: [https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/37659/1/Optimizaci%c3%b3n%20del%20m%c3%a9todo%20captaci%c3%b3n%20del%20radical%202,2-difenil-1-picrilhidrazilo%20\(DPPH\)%20para%20evaluar....pdf](https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/37659/1/Optimizaci%c3%b3n%20del%20m%c3%a9todo%20captaci%c3%b3n%20del%20radical%202,2-difenil-1-picrilhidrazilo%20(DPPH)%20para%20evaluar....pdf) (Acceso 15/04/2022).

Jurado, J. M., Navarrete, A., Ranchal, A., & Mata, F. (2021). *Timing óptimo en la suplementación con creatina para la mejora del rendimiento deportivo*. Arch Med Deporte, 38(1): 48-53. Obtenido de: https://archivosdemedicinadeldeporte.com/articulos/upload/rev1_jurado_castro.pdf (Acceso 30/03/2022).

Karasakal, A. (2015). *Evaluation of antioxidant activities of brassica napus's seeds by CUPRAC, ABTS/Persulphate and DMPD methods*. Marmara Pharmaceutical Journal, 19: 153-158. Obtenido de: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/166074> (Acceso 16/04/2022).

Kaur, J., Choudhary, S., Chaudhari, R., Jayant, R. D., & Joshi, A. (January 2019). *Enzyme-based biosensors. Bioelectronics and Medical Devices*. Bioelectronics and Medical Devices. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/Enzyme-basedbiosensorsbookchapter.pdf> (Acceso 12/05/2022).

Kejík, Z., KapláneK, R., Masařík, M., Babula, P., A., M., Filipenský, P., . . . & Jakubek, M. (2021). *Iron complexes of flavonoids-antioxidant capacity and beyond*. Int. J. Mol. Sci., 22 (2): 646. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/Iron_Complexes_of_Flavonoids-Antioxidant_Capacity_.pdf (Acceso 20/03/2022).

Khalil, L., Sánchez, M., & VideA, M. (2016). *Caracterización electroquímica de platino nanoporoso sintetizado en microemulsiones bicontinuas con precursores hidro y liposolubles*. Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica. Obtenido de: <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/1774/1/Extenso-SMEQ2016.pdf> (Acceso 20/06/2022).

Korotkaya, E. V. (2014). *Biosensors: design, classification and applications in the food industry*. Foods and Raw Materials, 2 (2): 161-171. Obtenido de:

file:///C:/Users/hp/Downloads/Biosensors_Design_Classification_and_Applications_.pdf (Acceso 11/05/2022).

Li, L., & Yang, X. (2018). *The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Obtenido de: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/7580707/> (Acceso 25/03/2022).

López, P. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de Sambucus ebulus L. utilizando el método ORAC*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PAULA%20LOPEZ%20MENDEZ.pdf> (Acceso 15/04/2022).

Marfà, J., Pupin, R. R., Sotomayor, M., & Pividori, M. (June 2021). *Magnetic-molecularly imprinted polymers in electrochemical sensors and biosensors*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/Marf2021_Article_Magnetic-molecularlyImprinted.pdf (Acceso 13/05/2022).

Marín, M. E. (2013). *Inmovilización de tirosinasa sobre ésteres cinámicos de carbohidratos fotoentrecruzados*. Universidad de Murcia; Departamento de Química Orgánica. Obtenido de: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/116818/TMEMZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Acceso 26/05/2022).

Márquez, M. Á., Sandoval, H., Pérez, I., Ríos, C., & Diéguez, C. E. (2020). *Metabolismo y efecto de la deshidroepiandrosterona (DHEA) en el sistema nervioso central*. *Archivos de Neurociencias (Mex) INNN*, 25 (3). Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2020/ane203e.pdf> (Acceso 30/03/2022).

Martín, E. (Julio de 2015). *Aplicación de sensores y biosensores nanoestructurados para la detección de antioxidantes*. Universidad de Valladolid; Escuela de Ingenierías Industriales. Obtenido de: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/14019/TFG-I-271.pdf?sequence=1> (Acceso 01/05/2022).

Méndez, L., Gaxiola, R., Díaz, S., Esther, M., & Zenteno, T. (2015). *El cobre puede inducir estrés oxidativo en animales y plantas*. *Recursos Naturales y Sociedad*, 1 (3): 25-33. Obtenido de: http://www.cibnor.gob.mx/revistas/rns/pdfs/vol1num1/3_COBRE.pdf (Acceso 17/03/2022).

Menolasina, S., De Oliveira, M. I., & Travieso, C. (Septiembre-Diciembre de 2013). *Superficies de carbón vítreo modificadas con compuestos orgánicos y nanopartículas de oro como sensores de dopamina*. *Avances en Química*, 8 (3): 139-144. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/933/93330145006.pdf> (Acceso 19/06/2022).

Mesa, A. M., Zapata, S., Aarana, L. M., & Zapata, I. (2015). *Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de Ageratum conyzoides L.* *Boletín Latinoamericano*

y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 14 (1): 1-10. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85632845001.pdf> (Acceso 16/04/2022).

Mishra, S., Srivastava, D., & Sharma, N. (2021). *Technological interventions in the physicochemical analysis of food products: validation of nutraceutical content*. Biological Forum – An International Journal, 13(2): 695-707. Obtenido de: <https://researchtrend.net/bfij/pdf/101%20Technological%20Interventions%20in%20the%20Physicochemical%20Analysis%20of%20Food%20Products%20Validation%20of%20Nutraceutical%20Content%20Shailja%20Mishra.pdf> (Acceso 25/04/2022).

Molina, A. E. (Febrero de 2019). *Selenio: un elemento tóxico y esencial*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANDREA%20ESTEFANIA%20MOLINA%20MAISINCHO.pdf> (Acceso 23/03/2022).

Monošíka, R., Stred'anskýb, M., & Šturdíka, E. (2012). *Biosensors - classification, characterization and new trends*. Acta Chimica Slovaca, 5 (1): 109-120. Obtenido de: <https://sciendo.com/pdf/10.2478/v10188-012-0017-z> (Acceso 14/05/2022).

Moreno, M. T. (15 de Julio de 2021). *Nuevas técnicas electroquímicas para la determinación de la capacidad antioxidante en extractos alimentarios basadas en el método CUPRAC*. Universidad de Córdoba. Obtenido de: [file:///C:/Users/hp/Downloads/2021000002336%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/hp/Downloads/2021000002336%20(1).pdf) (Acceso 04/04/2022).

Muller, K. E. (2015). *Capacidad antioxidante y contenido de flavonoides entre las semillas de chia negra (salvia nativa) y chia blanca (salvia hispánica L.)*. Universidad Nacional del Altiplano; Facultad de Ciencias de la Salud. Obtenido de: http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2376/Muller_Tito_Kely_Eusebia.pdf?sequence=1 (Acceso 17/03/2022).

Munteanu, I., & Apetrei, C. (2022). *A review on electrochemical sensors and biosensors used in assessing antioxidant activity*. Antioxidants, 11 (3): 584. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/antioxidants-11-00584.pdf> (Acceso 22/02/2022).

Muñoz, Ó. A., Torres, G. A., Núñez, J. A., de la Rosa, L., García, R. J., Ayala, J. F., & Álvarez, E. (julio–diciembre de 2017). *Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales*. Propina, 20 (2): 23-28. Obtenido de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405888X17300037#bib0060> (Acceso 15/04/2022).

Murali, K., Srinivas, D., Sasi, B., & Jakeer, S. (2017). *Biosensors in food processing - a review*. Int. J. Pure App. Biosci. 5 (4): 1219-1227. Obtenido de: <http://www.ijpab.com/form/2017%20Volume%205,%20issue%204/IJPAB-2017-5-4-1219-1227.pdf> (Acceso 10/05/2022).

Nadifiyine, S., Haddam, M., Mandli, J., C. S., Blanchard, C. C., Marty, J. L., & Amine, A. (2013). *Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on to a carbon black paste electrode for phenol determination in olive oil*. Analytical Letters, 46: 2705–

2726. Obtenido de:
file:///C:/Users/hp/AppData/Local/Packages/microsoft.windowscommunicationsapps_8wekyb3d8bbwe/LocalState/Files/S0/1872/Attachments/Amperometric%20Biosensor%20Based%20on%20Tyrosinase%20Immobilized%20on%20to%20a%20Carbon%20Black%20Paste%20Electrode%20for%20P (Acceso 10/07/2022).

Naresh, V., & Lee, N. A. (2021). *A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors*. *Sensors*, 21 (4): 1109. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/sensors-21-01109-v3.pdf (Acceso 03/04/2022).

Neergheen, V. C., Wainwright, L., Yubero, D., Montero, R., Artuch, R., & Hargreaves, I. (2017). *Coenzyme Q10 in the treatment of mitochondrial disease*. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*, 5: 1-8. Obtenido de: <https://www.scielo.br/j/jiems/a/khmgpzmBsChfRQ4pgBnjYkL/?format=pdf&lang=en> (Acceso 10/03/2022).

Ortiz, C. V. (2016). *Análisis y discriminación entre sustratos e inhibidores de tirosinasa*. Universidad de Murcia; Facultad de Biología. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/TesisURLCarmenVanessaOrtizRuiz.pdf (Acceso 22/05/2022).

Pássaro, C. P., Rivera, C. M., Román, M. A., Cardona, L. M., Muñoz, L. M., Gómez, D. D., . . . & Rojas, L. C. (Octubre de 2016). *Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones*. Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA. Obtenido de: https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4694/guia_cromatograf%EDA.pdf?sequence=1 (Acceso 22/04/2022).

Pastor, C. J., Suárez, J. M., Povea, S., Álvarez, M., Villalón, I., Munuera, M., . . . & Sánchez, J. A. (2020). *Coenzyme Q10: Novel formulations and medical trends*. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (22): 8432. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/ijms-21-08432.pdf (Acceso 10/03/2022).

Poitevin, E. (2016). *Official methods for the determination of minerals and trace elements in infant formula and milk products: a review*. *Poitevin: Journal of AOAC International*, 99 (1). Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/JAOAC99-2016-minerals-norms-IF.pdf (Acceso 24/04/2022).

Poza, J., Pujol, M., Ortega, J., & Romero, O. (2018). *Melatonina en los trastornos de sueño*. *Neurología*. Obtenido de: <https://www.elsevier.es/en-revista-neurologia-english-edition--495-pdf-S217358082030184X> (Acceso 12/03/2022).

Ramírez, J., & Ayala, M. (1 de Diciembre del 2014). *Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?* *Revista digital universitaria*, 15 (12). Obtenido de: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/art91.pdf> (Acceso 20/05/2022).

Reguillo, M. D. (Febrero de 2018). *Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de:

<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA%20DEL%20CARMEN%20RE%20GUILLO%20MU%C3%91OZ.pdf> (Acceso 07/04/2022).

Rojas, S., Lopera, J., Uribe, A., Correa, S., Perilla, N., & Marín, J. (2015). *Consumo de nutraceuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles*. Revista Biosalud; 14(2): 91-103. Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v14n2/v14n2a09.pdf> (Acceso 27/03/2022).

Román, M., Alva, A., Pinzón, A., & Carvajal, K. (2016). *Papel inmunomodulador y antioxidante del zinc y el selenio en el tratamiento coadyuvante de infecciones respiratorias graves*. Revista de Educación Bioquímica (REB), 35(1): 3-10. Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2016/reb161b.pdf> (Acceso 17/03/2022).

Romero, M. L., Martínez, M. T., & Rodríguez, J. E. (2015). *Effect of storage temperature on enzyme activity and antioxidant capacity in Salvia officinalis L. shoots*. Revista Chapingo Serie Horticultura, 21(3): 199-213. Obtenido de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v21n3/v21n3a2.pdf> (Acceso 09/04/2022).

Royano, S. (Junio de 2020). *Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas*. Universidad Nacional de Educación a Distancia; Facultad de Ciencias. Obtenido de: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Sroyano/Royano_Martinez_Silvia_TFM.pdf (Acceso 18/05/2022).

Sánchez, L. M. (2016). *Desarrollo e implementación de métodos analíticos para la determinación y cuantificación de vitaminas A, E y C en jugos y productos lácteos usando cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta visible multivariable*. Universidad Industrial de Santander; Facultad de Ciencias. Obtenido de: <http://tangara.uis.edu.co/biblioweb/tesis/2016/161187.pdf> (Acceso 24/04/2022).

Sánchez, M. E. (Julio de 2013). *Antioxidantes; consumo de antioxidantes naturales en adultos mayores entre 65 y 75 años con dislipidemia*. Universidad Abierta Interamericana; Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Obtenido de: <http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/fulltext/files/TC112550.pdf> (Acceso 18/03/2022).

Santos, V. P., Mendonça, C. H., Santos, R. V., Mihos, F. C., Torres, A. G., Pereira, K. S., & Salgado, A. M. (2015). *Inmovilización del extracto enzimático de la tirosinasa de Agaricus Bisporus en membrana de nylon y esferas de quitosana*. AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos - CSPQ. Obtenido de: https://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/06_029/papers/04a/04a_1828_340.pdf (Acceso 28/05/2022).

Sebastián, J. L. (2017). *Desarrollo de aptasensores para la detección de bacterias enteropatógenas*. Universitat de Barcelona; Departamento de Ingenierías. Obtenido de: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/460682/JLSA_TESIS.pdf?sequence=1 (Acceso 22/06/2022).

Suarez, D., & Morales, Y. (Enero – Diciembre de 2018). *Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas*. Revista Semilleros: Formación Investigativa, 4 (1). Obtenido de: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf> (Acceso 21/04/2022).

Sut, S., Baldan, V., Faggian, M., Peron, G., & Dall'Acqua, S. (2016). *Nutraceuticals, a new challenge for medicinal chemistry*. Current Medicinal Chemistry, 23: 1-26. Obtenido de: file:///C:/Users/hp/Downloads/CMC_ReviewNutraceuticalsOK.pdf (Acceso 29/03/2022).

Torres, J. (Enero de 2020). *Ácidos peptidonucleicos (APNs) en el desarrollo de biosensores electroquímicos*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/JORGE%20TORRES%20CHAVES.pdf> (Acceso 14/05/2022).

Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera*. Universidad Tecnológica de Pereira; Facultad de Tecnología. Obtenido de: <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/28bb3599-16cd-4c41-9c48-0a0dc4a9b5e2/content> (Acceso 11/03/2022).

Trujillo, C. (Febrero de 2019). *Estudio de la actividad antioxidante en hierbas y frutos*. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química. Universidad Nacional de Educación a Distancia; Facultad de Ciencias. Obtenido de: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Ctrujillo/Trujillo_Hernandez_Cristina_TFM.pdf (Acceso 12/04/2022)

Valdivielso, H. V. (Julio de 2015). *Purificación y separación de ácido láctico lactobiónico obtenidos en fermentaciones de co-cultivos a partir de permeados de lactosuero*. Universidad de Oviedo; Master Universitario en Biotecnología Alimentaria. Obtenido de: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/32136/TFM_HectorVicenteValdivielso.pdf;jsessionid=0CECF2649B5B52681F2E79B5447EB8DC?sequence=4 (Acceso 21/04/2022).

Vallejo, Y., Barrios, L., & Anaya, J. (2021). *La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica*. Revista de Química PUCP, 35 (2): 19-25. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/23788-Texto%20del%20art%C3%ADculo-95185-1-10-20210908.pdf> (Acceso 21/04/2022).

Vargas, A. (Abril de 2017). *Respuesta antioxidante a la exposición a cadmio en mioblastos de mamíferos marinos y mamíferos terrestres*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Obtenido de: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/481/1/delaguila_a.pdf (Acceso 10/04/2022).

Velasco, A. M. (Febrero de 2018). *Aptámeros, su aplicación en ciencias de la salud*. Universidad Complutense; Facultad de Farmacia. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANA%20MARIA%20VELASCO%20CALLE.pdf> (Acceso 12/05/2022).

Waitzberg, D., & Garla, P. (2014). *Contribución de los ácidos grasos omega-3 para la memoria y la función cognitiva*. *Nutr Hosp.*, 30(3): 467-477. Obtenido de: <https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v30n3/01revision01.pdf> (Acceso 30/03/2022).

Yule, A., Macedo, M., & Tirapegui, J. (2019). *Glutamine as an anti-fatigue amino acid in sports nutrition*. *Nutrients*, 11 (4): 863. Obtenido de: <file:///C:/Users/hp/Downloads/nutrients-11-00863.pdf> (Acceso 30/03/2022).

Zaripova, V., Petrova, I., & Lezhnina, Y. (2019). *Biosensors application for the life systems quality in a smart city*. *E3S Web of Conferences* 135, 03006. Obtenido de: https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/pdf/2019/61/e3sconf_itese18_03006.pdf (Acceso 18/05/2022).