

Inmunosensores para la detección de antibióticos en alimentos

Silvia Díaz-Barcelay¹ , Dariangel Batista Sarduy¹ , Iyolexis Calzada Medina² , Arístides Camilo Valdés González¹ 

¹Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, Infanta #1158 e/ Llinás y Clavel, La Habana, Cuba. Código postal 10300. ²Centro Nacional de Cirugía de Mínimo Acceso, Párraga #215 e/ San Marino y Vista Alegre, La Víbora La Habana, Cuba. Código postal 10500.
Email de autor para correspondencia: *camiloaristides@yahoo.es

Recibido: 22 diciembre 2023. **Aceptado:** 25 marzo 2023

RESUMEN

La detección de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal ha cobrado importancia debido al uso intensivo de estos medicamentos en la ganadería y la avicultura. El paso de estos a la cadena alimentaria está relacionado con problemas de salud en humanos y fenómenos de resistencia bacteriana a antibióticos. Para minimizar estas afectaciones el Codex *Alimentarius* establece la cantidad máxima de residuos de antibióticos permitidos en productos destinados para el consumo humano. Esto plantea la necesidad de desarrollar métodos sensibles y económicos para su monitoreo. Los biosensores han cobrado importancia como una estrategia novedosa para la detección de antibióticos debido a su rápida respuesta, alta sensibilidad y bajo costo. La presente revisión intenta describir y discutir los principales trabajos en inmunosensores destinados a la detección de antibióticos en carnes.

Palabras clave: Inmunosensores; residuos de antibióticos; anticuerpos; bioafinidad; carnes.

ABSTRACT

The detection of antibiotic residues in food has gained importance with the intensive use of these medications in livestock farming and poultry farming. The passage of these into the food chain is related to health problems in humans and phenomena of bacterial resistance to antibiotics. To minimize these effects, the Codex *Alimentarius* establishes the maximum amount of antibiotic residues allowed in products intended for human consumption. This raises the needed to develop sensitive and economical methods for its monitoring. Biosensors have gained importance as a novel strategy due to their rapid response, high sensitivity and low cost. The present review attempts to describe and discuss the main works on immunosensors intended for the detection of antibiotics in meat.

Keywords: Immunosensors; antibiotic residues; antibody; bioaffinity; meat.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos, de origen natural o sintético, son productos utilizados ampliamente en ganadería para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como profiláctico y como promotor de crecimiento en la crianza intensiva de animales de carne, en particular aves y cerdos [1, 2]. Cuando son utilizados en exceso o no se tiene en cuenta el tiempo de retiro los residuos de antibióticos permanecen en el organismo del animal y pasan a la cadena alimentaria en diferentes productos como leche, vísceras y carnes, entre otros. El uso extensivo de dosis subterapéuticas en la crianza, facilita la presión selectiva de bacterias resistentes [3]. Esto crea un desbalance ecológico que tiende a la difusión de genes de resistencia a antibióticos en los microorganismos y a la disminución de la efectividad de los tratamientos, en particular en humanos. Otro efecto negativo incluye el fallo de los tratamientos y el incremento de las tasas de morbilidad y mortalidad, a la par de un aumento de los costos para la sociedad [4].

La importancia de este problema se puede observar en la ocurrencia de numerosos fenómenos de resistencia a antibióticos que han tenido lugar en diferentes partes del mundo, como el brote de *Salmonella* sp. en USA en 2009 con más de 240 infectados. Por su parte, un estudio en Canadá mostró una fuerte correlación entre bacterias resistentes a ceftiofur en pollos y las infecciones en todo el país [4].

En Cuba también se han reportado fenómenos de resistencia bacteriana a ciprofloxacino y

otros fármacos [5]. En general la población más expuesta es la asociada a los centros de crías y sacrificio de animales para carnes de consumo humano, los cuales actúan como portadores de las bacterias resistentes y las propagan en su entorno.

Para reducir el riesgo de este fenómeno, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través del Codex *Alimentarius*, implementó los Límites Máximos de Residuos (LMR) permisibles para los antibióticos en alimentos, los cuales, en general, se encuentran en el orden de los $\mu\text{g}/\text{Kg}$ [6].

Para el control de residuos de antibióticos en diferentes matrices se han desarrollado numerosos métodos. Entre los primeros se encuentran los ensayos de inhibición microbiana. Si bien estos métodos permiten el análisis de un gran número de muestras, simplicidad en el manejo y bajo costo, presentan como desventaja su poca selectividad, necesitan de cultivos celulares y presentan un tiempo de incubación de varias horas [7, 8]. De igual forma son muy empleados los métodos de inmunoensayos, en particular los Ensayos de inmuno-absorción unido a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés: Enzyme Linked Immunosorbent Assay). A pesar de que es una técnica con elevada especificidad, sensibilidad, simplicidad y que permite el análisis de un gran número de muestras de forma simultánea, tiene los inconvenientes de la baja estabilidad de los reactivos biológicos empleados, la

disponibilidad limitada de algunos de ellos. Además, se requiere de varias etapas de incubación y lavado que prolongan el tiempo del ensayo y producen falsos positivos [9, 10].

Una de las técnicas más empleadas para la determinación de residuos de antibiótico en diferentes matrices son las cromatografías, en particular la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la acoplada a espectrometría de masas en *tándem* (LC-MS/MS), que son las técnicas por excelencia para la confirmación de los residuos de antibióticos. Las cromatografías son métodos bien establecidos, confiables, capaces de reconocer y cuantificar residuos de medicamentos con alta selectividad, sensibilidad y con elevada precisión y exactitud. Sin embargo, como cualquier método analítico, no están exentos de limitaciones: requieren de un personal calificado, son demoradas, el pre-tratamiento de las muestras resulta complejo y muy costoso, entre otros [10, 11].

Una herramienta analítica que ha venido cobrando fuerza en los últimos tiempos son los biosensores, los cuales permiten detectar y cuantificar la presencia de residuos de antibióticos en tiempo real, de forma simple, barata, rápida, con excelente sensibilidad y especificidad. Se pronostica que los biosensores jugarán un papel muy importante en aplicaciones analíticas en un futuro muy cercano [12, 13], en particular en la detección de residuos de antibióticos en alimentos derivados de animales como la carne y en el control de la seguridad alimentaria. En los

últimos años se han realizado varias revisiones sobre los inmunosensores y transductores para la detección de analitos de interés en alimentos [14, 15, 16, 17] y una actualización en el estado del arte en este tema es apropiada.

Por tanto, esta revisión cubre tres aspectos principales en el diseño y desarrollo de un biosensor para la detección de residuos de antibióticos. En primer lugar, se da una idea general sobre la definición y estructura de los biosensores. Posteriormente se evalúan diferentes tipos de elementos de reconocimiento, incluidas enzimas, células, ADN, aptámeros, polímeros de impresión molecular (PIMs) y anticuerpos. Finalmente, se analizan diferentes grupos de antibióticos empleados en profilaxis y crecimiento de animales destinados a consumo de la población y se discuten algunos de los principales desarrollos en inmunosensores destinados a la detección de los mismos. También evaluamos las ventajas y limitaciones de varios tipos de estrategias de detección para evaluar el diseño más racional y sensible para la determinación de residuos de antibióticos.

Biosensores

Los biosensores son dispositivos de análisis que incorporan un elemento de reconocimiento biológico y/o biomimético asociado a un sistema de transducción que permite amplificar, almacenar y registrar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, suministrando información directa, continua, reversible y en

tiempo real sobre la concentración del analito [12, 18, 19]. En general, un biosensor cuenta de tres partes fundamentales (Figura 1): la fase sensora, el transductor y la electrónica asociada. La fase sensora, la fundamental, consta a su vez del *elemento de reconocimiento*, un *soporte sólido* y en ocasiones de una *membrana* que le imparte selectividad y ayuda a la inmovilización del elemento de reconocimiento. El *elemento de reconocimiento* (también conocido como reactivo o sistema de reconocimiento) juega el papel fundamental en la estructura y propiedades del biosensor. Es el encargado de interactuar y reconocer selectivamente al analito, para lo cual debe tener sitios de interacción complementarios en forma, tamaño y grupos funcionales. Por su parte el transductor convierte la señal que resulta del dominio de salida del sistema de reconocimiento en una señal eléctrica que puede ser apropiadamente procesada, con una

sensibilidad definida y una especificidad elevada [18, 20, 21].

Clasificación de los biosensores

Para una mejor comprensión, los biosensores se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, en particular uno de los más comunes los agrupa de acuerdo a su método de transducción y al tipo de elemento de reconocimiento [22–24] (Figura 2).

Uno de los componentes más importantes de un biosensor es el elemento de bioreconocimiento o bioreceptor, capaz de proporcionar un proceso de detección sensible y selectivo. En esta sección, se presentan diferentes tipos de bioreceptores, incluidos enzimas, células, ADN, aptámeros, PIMs y anticuerpos, utilizados frecuentemente en biosensores de antibióticos.

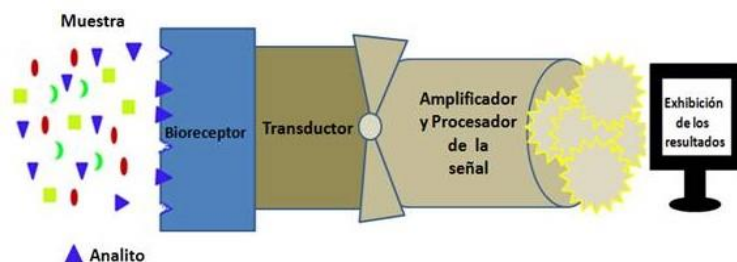


Figura 1. Componentes básicos que conforman un biosensor.

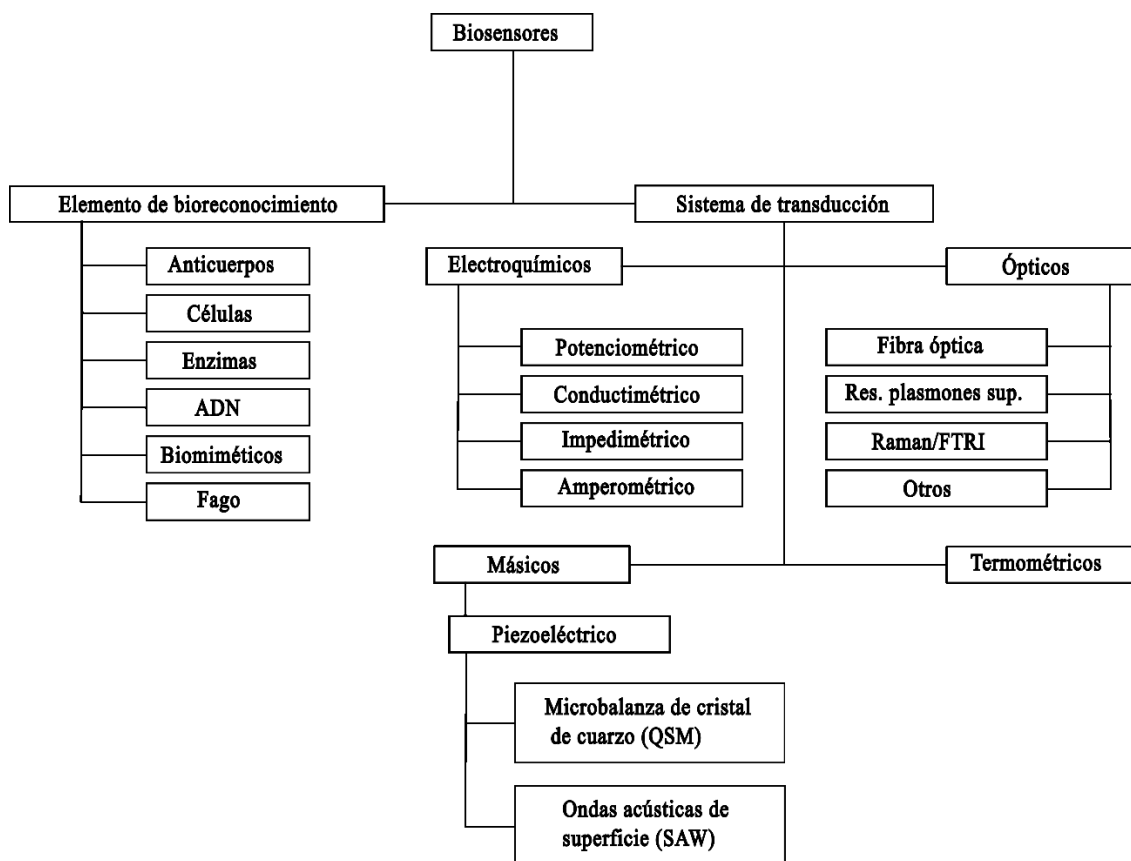


Figura 2. Representación esquemática de la clasificación de los biosensores.

Biocatalíticos (Enzimas, células y tejidos)

Las enzimas son proteínas que reconocen y transforman una molécula específica en un producto sin ser consumidas en la reacción. En ocasiones puede ser necesaria la presencia de cofactores para que puedan regenerarse y estar activas de nuevo. Su estabilidad y vida media depende de diversos factores como el pH, temperatura, entre otros. Son los elementos de reconocimiento más empleados en biosensores, siendo las más utilizadas las oxidoreductasas [23].

Los biosensores enzimáticos utilizan enzimas específicas para el reconocimiento y transformación del analito. Posteriormente su

concentración puede ser determinada indirectamente midiendo la formación o el consumo de una especie química de la reacción utilizando un segundo sistema de reconocimiento. Este tipo de sensores son ampliamente utilizados en la detección de glucosa (el más conocido), colesterol, urea, peróxido de hidrógeno, alcohol, así como en la detección de contaminantes ambientales como los organofosforados [25]. De igual forma, han sido ampliamente utilizados en seguridad alimentaria y en el monitoreo de bioprocesos industriales [26].

Por su parte, las células completas, tejidos y orgánulos subcelulares son sistemas

multienzimáticos que también pueden ser empleados como elementos de reconocimiento molecular en biosensores. Su ventaja principal es que las enzimas se encuentran en su medio natural, mientras que sus desventajas se asocian a problemas de difusión de sustratos y productos a través de la membrana celular [13].

Bioafinidad

Los sensores de bioafinidad se basan en la interacción del elemento de reconocimiento con el analito de interés sin que este se transforme. En cambio, se produce una reacción de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor [13, 23]. Debido a que en esta interacción no ocurre consumo de sustratos ni generación de productos, para su señalización se suele marcar el receptor, el analito o incluso una especie que compita con el analito por la unión al receptor. Normalmente son utilizados como marcadores compuestos fluorescentes, nanopartículas o enzimas que intervengan en una reacción complementaria fácilmente transducible [12].

Entre los mecanismos de bioafinidad más comúnmente utilizados en la construcción de biosensores se pueden encontrar los siguientes:

- ✓ Reconocimiento basado en ácidos nucleicos (genosensores y aptasensores).
- ✓ Receptores artificiales (PIMs: polímeros de impresión molecular).
- ✓ Interacción antígeno-anticuerpo (inmunosensores).

Ácidos nucleicos (Genosensores)

Los biosensores de ADN basados en procesos de reconocimiento de ácidos nucleicos son dispositivos que combinan, como agente de reconocimiento biológico, una hebra de ADN con un transductor apropiado [27]. En este tipo de dispositivos, la selectividad está gobernada por el elemento de reconocimiento, mientras que su sensibilidad dependerá del transductor. Los genosensores utilizan el evento de hibridación para detectar una secuencia de ADN objetivo mediante transducción óptica, piezoeléctrica o electroquímica [28] siendo esta última la que ofrece las mejores ventajas de simplicidad, rapidez, costo relativamente bajo y alta sensibilidad, y son adecuados para el desarrollo de dispositivos portátiles y económicos [29].

Aptasensores

Los aptámeros son hebras sintéticas de ácido nucleico que pueden diseñarse para reconocer aminoácidos, oligosacáridos, péptidos y proteínas, y aunque químicamente se relacionan más con las sondas de ácido nucleico, en la práctica presentan un comportamiento similar a los anticuerpos, pero con algunas ventajas respecto a estos últimos: presentan baja toxicidad, no son inmunogénicos, tamaño pequeño, y fácil de conjugar a nanopartículas y fármacos [13, 30]. Por otra parte, tienen las propiedades de los ácidos nucleicos, como el pleomorfismo estructural y la simplicidad química, que

reducen la eficiencia del ensayo y también aumentan su costo de producción. Los aptasensores se han aplicado con éxito en diagnósticos clínicos para detectar enfermedades infecciosas y oncológicas, y en la detección de sustancias en el organismo como fármacos, drogas de abuso y biomarcadores [30].

PIMs

Los polímeros de impresión molecular (PIM) son matrices sintéticas que se comportan como receptores biomiméticos artificiales, capaces de reconocer e interaccionar de forma específica con el analito para el cual han sido sintetizados. Dicho reconocimiento se basa en la creación, durante el proceso de polimerización, de cavidades que son complementarias, en tamaño, forma y sitios funcionales al analito que fue empleado como molde en la síntesis de los polímeros.

Las principales ventajas del uso de PIMs son su bajo costo de fabricación, su reconocimiento específico independiente del entorno externo, su alta relación superficie-volumen y su alta estabilidad. Pero presentan inconvenientes como baja densidad de sitios impresos, eliminación incompleta de la plantilla, tiempo de unión lento y baja conductividad. Esta última se ha minimizado con el empleo de nanomateriales como el grafeno o nanopartículas de oro por citar algunas [31].

Inmunosensores

Los inmunosensores son un tipo de biosensor que utiliza como elemento de reconocimiento un anticuerpo (Ac) monoclonal, policlonal o un fragmento del anticuerpo, basado en la alta especificidad y afinidad que estos presentan en su interacción con el antígeno (Ag). Los inmunosensores surgieron a partir de los primeros métodos inmunoenzimáticos, en particular los ensayos de inmuno-adsorción unidos a enzimas (ELISA) en el cual se emplea una enzima unida al anticuerpo para señalar la interacción Ac-Ag [32, 33]. En muchos de los inmunosensores modernos se emplea un reactivo fluorescente en vez de una enzima para realizar esta señalización, lo cual resulta en un incremento de la sensibilidad y le aporta mayor sencillez al dispositivo.

Los anticuerpos también se denominan inmunoglobulinas y son glicoproteínas sintetizadas por los linfocitos B. Todas las moléculas de anticuerpos comparten las mismas características estructurales básicas, pero muestran una variabilidad importante en las regiones que se unen a los antígenos. Éstos, como se puede ver en la Figura 3, están formados por dos cadenas polipeptídicas ligeras (L) y dos pesadas (H) iguales entre sí. Las uniones entre cadenas se realizan mediante puentes disulfuro. Ambas cadenas presentan una serie de unidades homólogas que se repiten denominados dominios de inmunoglobulinas. Presentan una región Fab que corresponde a la región N terminal y está formado por la región variable (V), situada en los dominios de cada cadena (VL y VH), un sitio de unión a los

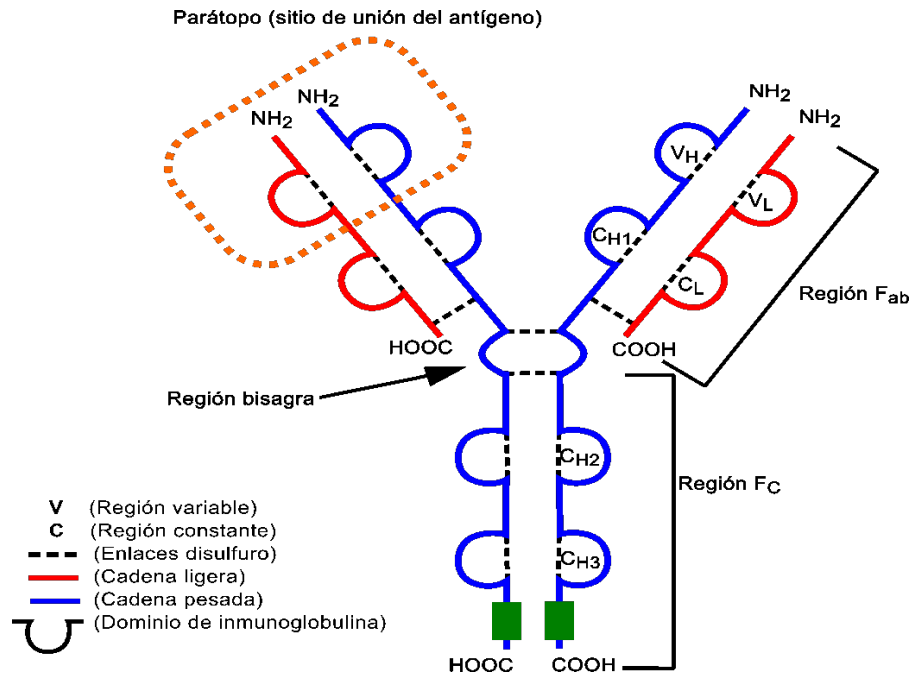


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de una molécula de anticuerpo IgG secretada.

antígenos (parátipo) y la región Fc o cristalizable que corresponde al extremo C-terminal, formado por la unión de ambas cadenas constantes (CH y CH).

Para la fabricación del inmunosensor hay que seleccionar el tipo de anticuerpo a utilizar, teniendo en cuenta los criterios que aparecen descritos en diferentes bibliografías [34]. Estos anticuerpos, según la técnica de producción, pueden ser monoclonales, policlonales y recombinantes. Los anticuerpos policlonales son una mezcla heterogénea de anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B en respuesta a un solo antígeno. Debido a esto, los anticuerpos policlonales tienen afinidades diferentes hacia múltiples sitios o epítopos en el antígeno, pero resultan inespecíficos y se producen en cantidades limitadas. Por su parte, los anticuerpos monoclonales son generados

mediante hibridomas, que son células híbridas producidas mediante la fusión de una célula de mieloma (un tipo de cáncer de células plasmáticas) y un clon de linfocitos B. Por tanto, los anticuerpos monoclonales tienen afinidad monovalente y solo reconocen el mismo epítipo de un antígeno. Estos tienen como ventaja una elevada especificidad, moderada estabilidad, y una vez establecida su producción se mantiene de forma continua e ilimitada y con bajos costos de producción. Sin embargo, su utilidad puede verse limitada para el desarrollo de inmunosensores, ya que pequeñas modificaciones en la estructura del epítipo, del pH o de la fuerza iónica del medio pueden afectar notablemente la interacción antígeno-anticuerpo, resultando mucho menos significativa estas variaciones cuando se emplean anticuerpos policlonales. Además, los

anticuerpos policlonales presentan mayor sensibilidad, la producción es más rápida y menos costosa, pero presentan menor especificidad que los monoclonales [32, 33]. Por último, los anticuerpos recombinantes son la última generación de anticuerpos producidas utilizando técnicas de biología molecular y/o tecnología de ADN recombinantes [35].

Formatos de ensayo en inmunosensores

Para la selección del tipo de formato a utilizar hay que tener en cuenta el tamaño, naturaleza, el peso del analito que se quiere detectar, las características de la interacción con el elemento de reconocimiento y la disponibilidad de inmunoreactivos, entre otros. Los formatos de ensayos más frecuentemente utilizados son: el ensayo directo (A), el sándwich (B), el competitivo (C) y el ensayo de inhibición (D) (Figura 4) [32, 33].

En los inmunosensores competitivos, tanto el analito en la muestra como el homólogo del analito marcado con la enzima, compiten por

los sitios de unión de un anticuerpo específico que se encuentra inmovilizado, en una cantidad limitada, sobre el soporte sólido. De esta forma, cuanto mayor sea la concentración de analito en la muestra, menor cantidad de homólogo del analito marcado se unirá al anticuerpo, siendo la señal medida inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra [32, 36].

En los inmunosensores de inhibición, también considerados como métodos competitivos indirectos, se inmoviliza un hapteno conjugado (antígeno modificado) sobre el soporte sólido y paralelamente se incubaba una concentración conocida del anticuerpo con el analito contenido en la muestra. Posteriormente la mezcla se pone en contacto con el hapteno modificado unido al soporte sólido, de manera que solo los anticuerpos libres se unen a la superficie, generando una respuesta inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra [33].

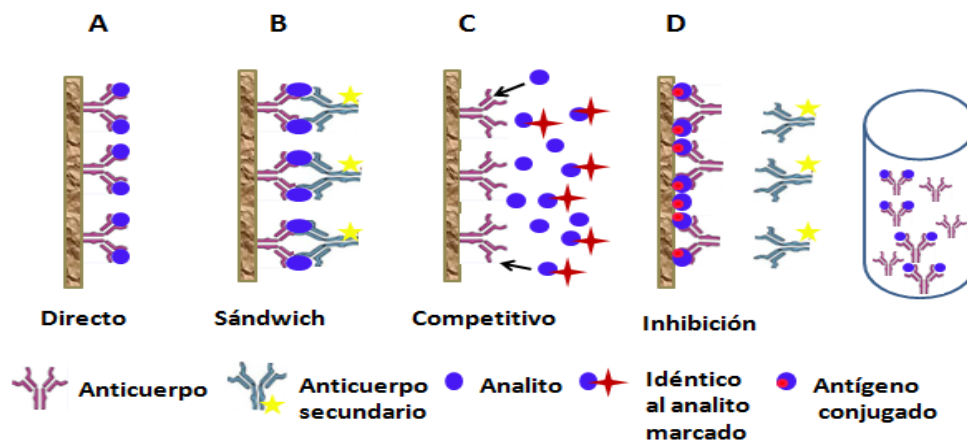


Figura 4. Representación esquemática de los principales formatos de ensayos en inmunosensores.

En los inmunosensores tipo “sándwich”, el anticuerpo inmovilizado interacciona con el antígeno de interés (analito contenido en la muestra) y posteriormente se adiciona un segundo anticuerpo marcado (con una enzima, un fluoróforo o un compuesto radiactivo), que se une a este a través de un epítipo diferente. En esta configuración, cuanto mayor sea la concentración de analito en la muestra, mayor anticuerpo marcado se unirá, siendo la medida obtenida directamente proporcional a la concentración del compuesto de interés. Este formato de inmunoensayo se emplea para analitos de elevado peso molecular, que presentan más de un epítipo. En general, el esquema “sándwich” proporciona un límite de detección de un orden de magnitud más bajo que el formato competitivo [33, 36].

Transducción en inmunosensores

Como se comentó anteriormente, el transductor es el elemento que convierte la señal que resulta de la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica que puede ser apropiadamente procesada, con una sensibilidad definida y una especificidad elevada. Entre los más utilizados actualmente se encuentran los electroquímicos, seguidos de los ópticos y los piezoeléctricos [36, 37].

Como su nombre indica, los transductores electroquímicos transforman la interacción del receptor y el analito en una señal electroquímica [38]. Con este tipo de transductores, la interacción del analito con el

receptor puede darse en condiciones de corriente nula (potenciometría) o ser el resultado de un estímulo eléctrico aplicado a la muestra (voltamperometría) [39]. Estos inmunosensores incluyen los transductores conductimétricos, potenciométricos, amperométricos, impedimétricos y voltamétricos, entre otros [13]. Los inmunosensores electroquímicos son muy utilizados por presentar bajo costo en su desarrollo y producción, rápido resultado de análisis, alta sensibilidad, facilidad de miniaturización y portabilidad. Ellos pueden ser considerados como una alternativa más avanzada en la estrategia de detección analítica [32].

En los inmunosensores ópticos, producto de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, se producen modificaciones en las propiedades de la luz, como absorción, fluorescencia, dispersión o el índice de refracción, proporcional a la concentración de la especie que se sensa [13, 37].

Los traductores ópticos presentan varias ventajas sobre los electroquímicos ya que el nivel de sensibilidad es mayor, no presentan interferencias electromagnéticas, no necesitan electrodos de referencia, presentan menor tamaño y pueden operar en ambientes agresivos. Además, los transductores ópticos pueden detectar múltiples sustancias en paralelo y son los más utilizados en interacciones inmunológicas o de hibridación de secuencias de nucleótidos [37].

Por su parte, los transductores másicos detectan pequeños cambios de masa producidos sobre la superficie sensora, debido a la interacción analito-sistema de reconocimiento. Los dispositivos sensibles a la masa más comunes utilizan cristales piezoeléctricos, microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM) (basados en la medida del cambio de frecuencia de un plato oscilador de cuarzo y ondas acústicas de superficie (SAW) basados en la modificación de la velocidad de propagación de una onda acústica [40].

Inmunosensores para la detección de residuos de antibióticos en carnes

El empleo de medicamentos, tanto para el crecimiento como la profilaxis en animales destinados al consumo humano, entre una amplia gama de familias de antibióticos (tetraciclinas, betalactámicos y aminoglucósidos, entre otros) [3], pueden generar residuos peligrosos en alimentos (carnes, huevos, pollo, leche, etc.), por lo que deben ser monitoreados para certificar la inocuidad y seguridad de éstos. Para garantizar que los residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal estén por debajo del LMR, es necesario contar con métodos de cuantificación sensibles y selectivos para su seguimiento y control. Sin embargo, aunque las técnicas analíticas cumplen con estos requerimientos, se necesitan equipos costosos, personal capacitado y mucho tiempo para el pretratamiento de las muestras.

Para superar las limitaciones de los métodos

convencionales mencionadas anteriormente, se han realizado enormes esfuerzos para el desarrollo de nuevas metodologías. En este sentido, los biosensores constituyen un enfoque innovador para el monitoreo rápido, sensible e *in situ* de diferentes analitos en el sector alimentario y otros campos analíticos. En particular, se han utilizado con éxito para la detección de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal [13]. Algunos de estos estudios se resumen en la Tabla 1.

Una de las familias de antibióticos más empleado en veterinaria han sido los aminoglucósidos, compuestos policatiónicos que contienen un aminociclitol con aminoazúcares cíclicos unidos por enlaces glicosídicos. Dentro de ellos se encuentran la estreptomina, dihidroestreptomina, gentamicina, neomicina, kanamicina, entre otros [41].

Para el análisis de residuos de este grupo de antibióticos, cabe destacar el inmunosensor desarrollado por Ferguson y colaboradores [42] para la detección de estreptomina y dihidroestreptomina, el cual emplea un formato de inhibición con transducción óptica de resonancia de plasmones superficiales. El dispositivo se aplicó a la detección de dichos antibióticos en miel, leche, riñón y músculo de cerdo y presentó un límite de detección (LD) de 30 µg/kg, 15 µg/kg, 50 µg/kg y 70 µg/kg respectivamente, muy por debajo de los valores de LMR recomendados por el Codex *Alimentarius* [6]. El porcentaje de recuperación fue del 79% hasta 100% para las muestras enriquecidas con el LMR y de 80%-110% para

Tabla 1. Inmunosensores para la detección de residuos de antibióticos en carne.

Muestra	Analito	Transductor	Intervalo lineal	Límite de detección	Ref.
Miel, leche riñón y músculo de cerdo,	Estreptomicina Dihidroestreptomicina	Óptico: RPS	-	30 µg/Kg 15 µg/Kg 50 µg/Kg 70 µg/Kg	[42]
Miel, leche, maní riñón y carne de cerdo	Estreptomicina	Electroquímico Voltamétrico	0.05 – 50 pg/mL	5pg/mL	[44]
Carne de res, cerdo y pollo	Neomicina	Electroquímico Amperométrico	10 - 250 ng/mL	6.76 ± 0.17 ng/mL	[45]
Carne de cerdo	Kanamicina	Electroquímico Amperimétrico	0.02–14 ng/mL	6.31 pg/mL	[46]
Carne de cerdo	Kanamicina	Electroquímico Voltamétrico	0.050 – 16 ng/mL	15 pg/mL	[47]
Carne de cerdo	Cloranfenicol	Óptico RPS	0.5–160 mg/mL	0.5 ng/mL	[50]
Carne de res, cerdo y pollo	Cloranfenicol	Electroquímico Amperimétrico	(50–950 pg/mL	45±5.0 pg/mL	[52]
Carne de res, cerdo y pescado	Cloranfenicol	Electroquímico Espectroscopia de impedancia	0.1–1000 ng/mL	0.06 ng/mL	[53]
Miel, leche, huevo y carne de pollo	Cloranfenicol	Masa Piezoeléctrico	0.5–100.0 ng/mL	0.2 ng/mL	[54]
Huevo, pescado y carne de pollo	Fluoroquinolonas Norfloxacino	Óptico RPS	0.1 -10 0.1-100 0.1-10 µg/Kg	0.29 0.3 0.13 µg/Kg	[56]
Carne de cerdo	Enrofloxacino	Electroquímico Voltamétrico	0.005-0.01 µg/mL	0.003 µg/mL	[58]
Miel, huevo y carne de cerdo	Norfloxacino	Electroquímico Voltamétrico	1 µg/L -10 mg/L	0.3837 µg/L	[60]
Pavo	Cetiofur	Electroquímico Espectroscopia de Impedancia	0.01 y 100 ng/mL	10 ng/mL	[61]
Leche, leche en polvo, yogur, carne de res, pescado y langosta	Cefalexina	Electroquímico Voltamétrico	1–800 ng/mL	45.7 ng/mL	[64]
Carne de cerdo y leche	Cefalosporinas Aminoglucósidos Sulfonamidas	Óptico Fluorescencia	-	0.51 a 4.3 µg/Kg	[65]
Carne de cerdo	1-Aminohidantoina	Electroquímico Voltamétrico	0.001–1000 µg/L	1.35X10 ⁻⁷ µg/L	[70]

las muestras enriquecidas con 0.53 de LMR. Además, mostró buena especificidad, estabilidad y es reusable. Este tipo de dispositivos tiene la ventaja que no se necesita marcaje, además presenta una alta sensibilidad, pero tienen como inconveniente que la instrumentación es compleja, son costosos y están expuestos a la interferencia de la matriz [32, 33]. Por otra parte, el método ELISA convencional propuesto por Ramatla y colaboradores [43] para una detección similar, presentó menor LD (20 ppb) para estreptomicina en carne, en comparación con este estudio.

En otro estudio, Liu B *et al.* [44] desarrollaron un inmunosensor electroquímico para la detección de estreptomicina, empleando un nanocompuesto de organosílice para fijar anticuerpos monoclonales antiestreptomicina sobre un electrodo de carbón vítreo mediante un proceso sol-gel. Para ello, inmovilizaron peroxidasa de rábano picante (HRP) y conjugados de estreptomicina-albúmina sobre nanopartículas de oro inmovilizadas, a su vez, sobre nanopartículas mesoporosas de sílice. El residuo de antibiótico se detecta mediante un ensayo competitivo entre la estreptomicina de la muestra y el conjugado estreptomicina-albúmina inmovilizada empleando voltametría diferencial de pulso como método de detección. El inmunosensor mostró un límite de detección de 5 pg/mL, intervalo lineal de 0.05 -50 pg/mL y porcentaje de recuperación del 94 al 114 %, mostrando excelente sensibilidad y precisión. El estudio exhibió una alta reactividad cruzada entre la dihidroestreptomicina y la

estreptomicina debido a su similitud estructural. Las muestras exploradas fueron leche, miel, riñón y músculo de cerdo.

Por su parte, Zhu y colaboradores [45] desarrollaron un inmunosensor para Neomicina (Neo) inmovilizando sobre un electrodo de carbón vítreo nanopartículas de oro y de poli-[2,5 - di - (2 - tienil) - 1 H-pirrol - 1 - (ácido p-benzoico)] (pDPB) y sobre estas últimas se le inmovilizó, de forma covalente, anticuerpos monoclonales antineomicina. La sonda se utilizó para detectar Neo en un formato tipo sándwich, en el que el anticuerpo secundario se unió a nanotubos de carbono de pared múltiple y nanopartículas de oro marcados con hidrazina (Hyd-MWCNT(AuNP)-Ab(2)). La hidrazina en el conjugado sirvió como catalizador para la reducción del peróxido de hidrógeno, siendo este, según los autores, el primer inmunosensor amperimétrico que se diseñó con estas características. Se obtuvo un intervalo lineal entre 10 ng/mL y 250 ng/mL con límite de detección de 6.76 ± 0.17 ng/mL. El inmunosensor se aplicó con éxito para detectar el contenido de Neo en muestras de carne en tiempo real.

En un desarrollo similar [46], un inmunosensor electroquímico para kanamicina emplea un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de grafeno soluble en agua (WGS)/quitosano/azul de Prusia (PB-CTS) y oro nanoporoso (NPG) sobre el cual se ancló un anticuerpo para kanamicina. La mezcla quitosano/azul de Prusia se empleó como mediador de transferencia de electrones mientras que el grafeno y el oro favorecieron un

aumento de la electroactividad de esta primera. En las condiciones óptimas, la señal amperométrica del azul de Prusia disminuyó linealmente con la concentración de kanamicina. El inmunosensor propuesto exhibió un límite de detección de 6.31 pg/mL, con un intervalo lineal de 0.02–14 ng/mL y una elevada sensibilidad favorecida por los nanomateriales utilizados. Los autores consideraron que la electroactividad del azul de Prusia se vio favorecida debido a los efectos sinérgicos de la lámina de grafeno soluble en agua y el oro nanoporoso.

De igual forma, Yu S. y colaboradores [47] diseñaron un inmunosensor voltamétrico, también libre de marcaje, para la detección de kanamicina. En este diseño, un electrodo de carbón vítreo se cubrió con una capa de grafito y tionina de glutaraldehído seguido de la unión de conjugados de nanopartículas de óxido ferroférico mesoporoso hibridado con plata, al cual se le inmovilizan anticuerpos antikanamicina para la detección de residuos del antibiótico. El inmunosensor propuesto exhibió buen desempeño, bajo límite de detección (15 pg/mL) con un amplio intervalo lineal de 0.050 a 16 ng/mL, tiempo de respuesta de 3 min, alta estabilidad y buena selectividad. El inmunosensor se evaluó en muestras de carne de cerdo. La elevada sensibilidad que presentó el dispositivo se atribuyó al uso de nanopartículas híbridas de Ag y Fe₃O₄ (FeO·Fe₂O₃), así como al sinergismo del grafito y la tionina que potenciaron la transferencia de electrones.

Otro grupo de compuestos que se emplean en

tratamiento veterinarios son los anfenícoles, los cuales son de amplio espectro y presentan actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Incluye tres fármacos: tianfenicol, florfenicol y el representante de este grupo, el cloranfenicol [48]. En el pasado, el cloranfenicol fue ampliamente utilizado tanto en forma profiláctica como terapéutica para el tratamiento de enfermedades en animales destinado al consumo humano. Debido a la anemia aplásica y otros daños que este fármaco puede causar en humanos, en 1994 se clasificó como riesgo para la salud y desde entonces se ha prohibido su uso en la producción ganadera [10, 48], incluyendo Cuba [49]. No obstante, por su importancia y peligrosidad existen algunos desarrollos para la detección de cloranfenicol que vale la pena mencionar.

Para este antibiótico, Dong y colaboradores [50] inmovilizaron conjugados de cloranfenicol-albúmina sobre la superficie de un chip sensor y detectaron el compuesto mediante ensayos competitivos indirectos con detección mediante resonancia de plasmones superficiales (RPS). El dispositivo se aplicó a muestras de carne de cerdo y pescado con LD de 0.5 ng/mL (más baja que el LD de 6 ng/L que presenta el kit de ELISA propuesto por Zhang y colaboradores [51] para la detección de este antibiótico en músculo de pollo) amplio intervalo lineal (0.5–160 mg/mL) y un tiempo de ensayo total menor a dos horas.

En otro inmunosensor para este mismo antibiótico se inmovilizaron anticuerpos anticloranfenicol acetil transferasa en un dendrímero modificado con nanopartículas de

sulfuro de cadmio y depositadas sobre un polímero conductor (poli 5, 2': 5', 2''-tertiofeno-3'-de ácido carboxilo) para mejorar la sensibilidad del sensor. Para la detección se utilizó el formato competitivo por los sitios de unión de los anticuerpos entre cloranfenicol marcado con hidrazina y el que se encuentra libre en la muestra. El inmunosensor exhibió un intervalo lineal entre 50 pg/mL y 950 pg/mL y un límite de detección de 45 pg/mL, siendo aplicado a la detección de cloranfenicol en muestras de carne con excelente sensibilidad [52].

En otro estudio, [53] diseñaron un biosensor electroquímico no marcado que emplea un electrodo de carbón vítreo cubierto de quitosano con nanoesferas de oro sobre las cuales se inmovilizan anticuerpos monoclonales anticloranfenicol. La detección del analito se efectuó mediante voltametría de pulso diferencial. En condiciones óptimas el inmunosensor mostró un límite de detección bajo (0.06 ng/mL) y un intervalo lineal amplio de 0.1–1000 ng/mL. El dispositivo se aplicó a la detección de cloranfenicol en muestras de carnes (res, cerdo y pescado) enriquecidas con tres niveles diferentes del antibiótico (10, 20, 50 µg/g) con recobrados entre el 85 y el 93%. El amplio intervalo lineal y el bajo límite de detección del inmunosensor atribuye a la elevada área superficial específica de las nanoesferas de oro con cavidades, lo que podría aumentar la superficie de detección.

No menos interesante es el inmunosensor piezoeléctrico para detectar residuos de cloranfenicol desarrollado por Karaseva [54],

basado en una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) de baja frecuencia (10 mHz) empleando un polímero electro-generado. La detección se llevó a cabo a través de un formato competitivo entre el conjugado proteína-hapteno, inmovilizado sobre la superficie del sensor, y el analito presente en la muestra con anticuerpos monoclonales anticloranfenicol. El inmunosensor presentó límite de detección de 0.2 ng/mL y un intervalo lineal de 0.5–100.0 ng/mL. Se aplicó a la detección de residuos de cloranfenicol en diferentes matrices (carne, miel, huevo y leche) con excelentes resultados. El dispositivo permite la detección directa sin marcaje, aunque comparado con los de QCM de alta frecuencia presentan menor sensibilidad [32].

Un grupo de antibióticos sintéticos ampliamente empleados en veterinaria lo constituyen las quinolonas, derivados de la quinolina, el núcleo aromático presentes en los alcaloides y otros antipalúdicos clásicos. Actúan contra gérmenes Gram-negativos y Gram-positivos y, algunos actúan sobre *Mycoplasma*. Presentan cuatro generaciones y en particular las fluoroquinolonas como el porciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, enrofloxacina, entre otras, son ampliamente empleadas en las infecciones bacterianas en animales, aves y pescados [41, 55].

Para este grupo se han desarrollado una gran variedad de sensores. Entre estos destaca el de Huet y colaboradores [56] los cuales, emplean un chip comercial para resonancia de plasmones superficiales carboximetil dextrano

(CM5) sobre el cual inmovilizaron diferentes fluoroquinolonas. Paralelamente y mediante ingeniería genética sintetizaron otro anticuerpo de cadena pesada simple mutada de sarafloxacino. A través de un sistema en flujo y mediante un formato de inhibición se exploró la unión de los anticuerpos obtenidos a los diferentes sensores. El anticuerpo combinado norfloxacino/flumequina y el sensor con una fluoroquinolona modificada en su superficie resultaron los óptimos para la detección de flumequina y de 12 quinolonas más. La señal obtenida mediante RPS resultó proporcional a la concentración del antibiótico en la muestra. El biosensor fue capaz de detectar norfloxacino, utilizada como referencia, en un intervalo de 0.1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en extractos de huevo y de 0.1–100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en carne de ave. Los límites de detección se estimaron en 0.13, 0.29 y 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para norfloxacino en carne de pollo, huevo y pescado, respectivamente. El sensor se reutilizó hasta 200 determinaciones. Algo novedoso en este desarrollo es la producción de anticuerpos policlonales capaces de reconocer varios compuestos que presentan diferentes estructuras químicas. Un desarrollo muy similar, con algunas modificaciones, fue presentado por Pan y colaboradores [57].

Por su parte, Aymard y colaboradores reportaron un sensor voltamétrico para la detección de enrofloxacino en carnes [58] que utiliza dos electrodos de carbono serigrafados sobre los que se inmovilizaron anticuerpos antienrofloxacino capaces de unirse al enrofloxacino, y con menor afinidad a conjugados de difloxacino–ferroceno. Un

electrodo con el conjugado unido a los anticuerpos antiquinolona se emplea como control negativo. En el segundo se produce la competencia entre el conjugado y la enrofloxacino de la muestra por los sitios de unión de los anticuerpos inmovilizados. La medición se realizó a través de voltametría diferencial de pulso. El inmunosensor presentó un límite de detección de 0.003 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un intervalo de trabajo entre 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al utilizar un sistema dual de electrodos, no es necesario realizar mantenimiento, ni pretratarlos antes del experimento. Son altamente reproducibles, de bajo costo y pueden ser aplicados en zonas de difícil acceso o para usos portátiles. Además, el volumen de muestra es reducido y permite disminuir el tiempo total de medición [59].

En este mismo sentido, Liu y colaboradores [60] desarrollaron un inmunosensor electroquímico para la determinación de norfloxacino en alimentos de origen animal. Emplearon un electrodo de carbón vítreo sobre el cual inmovilizaron un dendrímero de poliamidoamina encapsulado en partículas de oro (PAMAM-Au) y sobre este fueron inmovilizados anticuerpos monoclonales antienrofloxacino. El analito (enrofloxacino presente en la muestra) y el antígeno marcado (enrofloxacino unido con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP)), compiten ambos por su unión al anticuerpo antienrofloxacino. Las nanopartículas de oro encapsuladas en el dendrímero de poliamidoamina desempeñan una doble función, no solo aceleran el proceso de transferencia de electrones de la detección,

sino que también aumenta la eficiencia del anticuerpo inmovilizado. El antígeno marcado con la enzima HRP cataliza la reacción del sustrato hidroquinona con ayuda de H_2O_2 . Sobre la base de la amplificación de la señal de PAMAM-Au, la intensidad de la señal se relacionó linealmente con la concentración de norfloxacin en un intervalo de 1 $\mu\text{g/L}$ –10 mg/L , con límite de detección de 0.3837 $\mu\text{g/L}$ y recuperación de 91.6–106.1 %. El biosensor fue probado en muestras de huevo, leche y carne de cerdo. Según los autores, podría proporcionar un protocolo adecuado para la detección de norfloxacin en alimentos de origen animal con alta sensibilidad, buena precisión y estabilidad.

Los antibióticos betalactámicos presentan un anillo central llamado anillo betalactámico que da nombre al grupo. Su acción bactericida la efectúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana y la transpeptidación en las etapas finales de la síntesis del peptidoglicano. Dentro de este grupo se incluyen las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos e inhibidores de betalactamasa [41]. Este grupo de antibiótico es ampliamente utilizado en tratamiento en bovinos [10].

Dentro de esta familia, el ceftiofur, un antibiótico cefalosporínico de amplio espectro indicado para uso en bovinos, porcinos, ovinos y caninos, para tratar infecciones respiratorias, urogenitales, de piel, tejidos blandos y mastitis presenta particular interés. Para la detección de residuos de ceftiofur en muestras de carne se desarrolló un biosensor electroquímico [61] que utiliza un inmunoensayo autoensamblado y

espectroscopia de impedancia electroquímica para sondear los cambios capacitivos interfaciales a medida que el ceftiofur se une a la superficie del sensor. El sensor se aplicó a la detección ceftiofur en carne de pavo con tiempos de respuesta de 15 minutos y límite de detección de 0.01 ng/mL . El inmunosensor, comparado con otros biosensores [62], presenta pequeño tiempo de respuesta, una preparación de muestras simple y no necesita marcado. Sus limitaciones están asociadas a la espectroscopia de impedancia electroquímica, procedimiento complejo que no resultan adecuados para la detección de moléculas pequeñas [63].

Por su parte, Yu y colaboradores [64] desarrollaron un inmunosensor para el diagnóstico de cefalexina mediante el uso de un electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared simple funcionalizado con grupos carboxilos y quitosano sobre el cual se inmoviliza un conjugado de ovoalbúmina-cefalexina. A través de un formato competitivo, la cefalexina de la muestra compite con la cefalexina del electrodo por la unión al anticuerpo primario anticefalexina. Posteriormente se adiciona un anticuerpo secundario marcado con la enzima peroxidasa que se une al primer anticuerpo anticefalexina. La cuantificación de la muestra se realizó mediante voltametría diferencial de pulso. El límite de detección fue de 45.7 ng/mL con porcentajes de recuperación de 80.15% al 94.04%. A pesar del empleo de nanomateriales en el diseño del sensor no se logró una elevada sensibilidad. El dispositivo se aplicó en diferentes matrices como leche y derivados y

carne.

En un enfoque similar, se desarrolló un biosensor para el análisis rápido y automatizado de cefalosporinas, aminoglucósidos y sulfonamidas en carne de cerdo y leche [65]. Para ello, sobre portaobjetos de polímero en 3D, se inmovilizaron los conjugados ovoalbúmina con haptenos (antibióticos). Los anticuerpos monoclonales contra cefalexina, ceftiofur, gentamicina, neomicina y sulfonamida compiten por la unión de los analitos presentes en la muestra con los haptenos conjugados inmovilizados produciéndose la detección simultánea de los respectivos analitos. La unión del anticuerpo se detectó mediante un segundo anticuerpo marcado con un fluoróforo. Se obtuvieron límites de detección muy por debajo de los respectivos límites máximos de residuos (LMR) y oscilaron entre 0.51 y 4.00 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ con porcentajes de recuperación en un intervalo de 81.6-113.6%. Además, el coeficiente de variación (CV) intraensayo e interensayo fueron inferior al 12.9% mostrando buena exactitud y precisión [65].

Otra familia de antibióticos ampliamente utilizados en la cría del ganado, animales acuáticos y aves en la prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas, además de como promotor del crecimiento lo constituyen los nitrofuranos [66, 67]. Los fármacos que pertenecen a este grupo son sintéticos y actúan a nivel de los ácidos nucleicos al impedir la lectura codónica ADN-ARN mensajero [68]. Se ha demostrado que algunos de estos antibióticos y sus metabolitos presentan efectos

cancerígenos y mutagénicos, lo que ha contribuido a la prohibición de algunos de sus medicamentos [69]. En Cuba se prohíbe el empleo de furazolidona y nitrofurazona en los animales cuyos productos son utilizados para el consumo humano [49] por lo que es necesario su monitoreo.

En este sentido, Wang *et al* [70] desarrollaron un inmunosensor electroquímico competitivo para la detección de nitrofurantoina donde el compuesto a sensar es la 1-aminohidantoína (AHD), el cual se forma por la metabolización de la nitrofurantoina (NFT). Para ello utilizaron una red metal-orgánicas de cerio con nanopartículas de oro (Ce-MOF@Au) como sustrato de fijación de un anticuerpo monoclonal anti-AHD, y nanopartículas bimetalicas de Au y Pt (Au@PtNps) cargadas con azul de metileno y el hapteno (OVA-AHD) como señalización del reconocimiento. El residuo de antibiótico (AHD), se detecta por competencia de este con el hapteno (OVA-AHD) por los sitios en el anticuerpo inmovilizado ocurriendo una modificación en la señal de voltamperometría de onda cuadrada. Con este sistema se obtuvo un límite de detección de 1.35-10.7 $\mu\text{g}/\text{L}$. El complejo Ce-Mof@Au proporciona una superficie de unión mayor para los anticuerpos y promueve la transferencia de electrones, mientras que Au@PtNps puede unir más azul de metileno y antígeno para amplificar aún más la señal del sensor. Este inmunosensor presentó mayor sensibilidad en comparación con el método ELISA desarrollado por Liu [71] para la detección de nitrofuranos (LD de 0.01 $\mu\text{g}/\text{L}$).

CONCLUSIONES

Esta investigación proporciona una revisión general de inmunosensores en la detección de residuos de diferentes antibióticos en alimentos derivados de animales, fundamentalmente carnes del sector ganadero y avícola. Estos demostraron tener límites de detección por debajo de los LMR establecidos por el Codex [6], presentándose como una opción prometedora de los métodos tradicionales en cuanto a sensibilidad y selectividad.

Se presenció un predominio de los inmunosensores electroquímicos, sobre todo los que emplean transductores voltamétricos y amperimétricos, con el empleo de diseños novedosos basados en la incorporación de diversos nanomateriales como grafenos, nanotubos de carbonos, nanopartículas de oro y otros. Estos materiales mejoran el comportamiento electroquímico de los electrodos, favoreciendo la conductividad, estabilidad química, el área de superficie de reconocimiento del sensor y la transferencia electrónica, incrementando, además, la velocidad de la respuesta, la selectividad y la sensibilidad de estos dispositivos.

Además, dentro de los inmunosensores ópticos, predominaron los basados en resonancia de plasmones superficiales. Estos, a pesar de su complejidad estructural, presentan un amplio intervalo de trabajo dinámico, pueden detectar concentraciones muy bajas y tienen una buena sensibilidad.

Plataformas como las presentadas aquí podrían en un futuro ser los suficientemente robustas y

baratas para permitir su producción en masa y su aplicación a gran escala en la determinación de antibióticos en muestras reales.

Contribución del autor/es

Silvia Díaz Barcelay, aportó la idea, hizo la búsqueda, participó en la redacción y revisó la versión final.

Aristides Camilo Valdés González, contribuyó a la idea, participó en la redacción y discusión de los resultados y revisó la versión final.

Dariangel Batista Sarduy, participó en la redacción y discusión de los resultados y revisó la versión final.

Iyolexis Calzada Medina, participó en la discusión de los resultados y revisó la versión final.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- [1]. Paredes Vilca F de G. Determinación de residuos de antibióticos por el método microbiológico en canales de bovinos faenados en el camal particular de Azoguiné de la ciudad de Puno - 2018. Univ Nac Altiplano [Internet] 2018. Disponible en: <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3441783>
- [2]. Pérez Gracia MT. La pandemia silenciosa: resistencia bacteriana a los antibióticos:

[Inauguración Curso Académico 2021-2022] 2021. Disponible en: http://repositorioinstitucional.ceu.es/bitstream/10637/13083/1/Pandemia_Perez_2021.pdf

[3]. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Rep* 2012;127(1):4-22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3234384/pdf/phr12700004.pdf>

[4]. Marshall BM, Levy SB. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(4):718-33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21976606/>

[5]. Marin Mendez M, Rodríguez Julian AR, Minier Pouyou L, Zayas Tamayo E, Soler Santana R, Marin Mendez M, *et al.* Caracterización de agentes bacterianos aislados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *MEDISAN* 2020;24(2):235-51. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192020000200235

[6]. Alimentarius C. Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. *CX/MRL* 2-2021. Disponible en: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXM%2B2%252FM>

[RL2s.pdf](#)

[7]. Kumar H, Bhardwaj K, Kaur T, Nepovimova E, Kuča K, Kumar V, *et al.* Detection of Bacterial Pathogens and Antibiotic Residues in Chicken Meat: A Review. *Foods* 2020;9(10):1504. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7588929/>

[8]. Mitchell JM, Griffiths MW, Mcewen SA, Mcnab WB, Yee AJ. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. *J Food Prot* 1998;61(6):742-56. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22016143?via%3Dihub>

[9]. Midhun N, Sonia Bai JK, Chakrapani KV, Haripriya G, Pathuri C, Ramalakshmi NS. Enzyme linked immunosorbent assay-lab diagnosis: A review. *Indian J Microbiol Res* 2021;8:10-4. Disponible en: <https://www.ijmronline.org/journal-article-file/13543>

[10]. Zambrano PELR, Espinoza JA, Conte-Junior CA, de la Torre CAL. Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal mediante cromatografía líquida. *Vigil Sanit Debate Rio Jan* 2018;6(2):122-36. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/5705/570562984014/570562984014.pdf>

[11]. Patil M. Chrominfo: Advantages and Disadvantages of HPLC [Internet]. *Chrominfo* 2019. Disponible en: <https://chrominfo.blogspot.com/2019/03/advan>



[tages-and-disadvantages-of-hplc.html](#)

[12]. Martín Hernández MI. Implementación y desarrollo de biosensores amperométricos en el ámbito biomédico 2015. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/26285>

[13]. Rumayor VG, Iglesias EG, Galán OR, Cabezas LG. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Inf Vigil Tecnológica Madr 2005. Disponible en: https://www.ugr.es/~cjl/VT1_Aplicaciones_de_biosensores_en_la_industria_agroalimentaria.pdf

[14]. Mungroo N, Neethirajan S. Biosensors for the Detection of Antibiotics in Poultry Industry—A Review. Biosensors 2014;4(4):472-93. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6374/4/4/472>

[15]. Gaudin V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. Biosens Bioelectron 2017;90:363-77. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566316312337>

[16]. Pollap A, Kochana J. Electrochemical Immunosensors for Antibiotic Detection. Biosensors 2019;9(2):61. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6374/9/2/61>

[17]. Majdinasab M, Mishra RK, Tang X, Marty JL. Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors. TrAC Trends Anal Chem 2020;127:115883. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993620301126>

[18]. Perumal V, Hashim U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. J Appl Biomed 2014;12(1):1-15. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1214021X13000082>

[19]. Thevenot DR, Tóth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Pure Appl Chem 1999;71(12):2333-48. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199971122333/html>

[20]. Neethirajan S, Ragavan V, Weng X, Chand R. Biosensors for Sustainable Food Engineering: Challenges and Perspectives. Biosensors 2018;8(1):23. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6374/8/1/23>

[21]. Ruiz Dávila LW. Influencia del material transductor en la construcción de un microelectrodo biosensor enzimático amperométrico para la determinación IN VITRO de trifosfato de adenosina (ATP) [Internet] [bachelorThesis]. Quito: UCE. 2015. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6077>

[22]. Canalejas Tejero V. Desarrollo de superficies nanoestructuradas para biosensores ópticos y sensores biomiméticos [Internet] [phd]. E.T.S.I. Telecomunicación (UPM) 2016. Disponible en: <https://oa.upm.es/44322/>

[23]. Mello LD, Kubota LT. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and



drink industries. Food Chem 2002;77(2):237-56. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814602001048>

[24]. Torres Mena OI. Generación de un biosensor óptico basado en silicio cristalino para la determinación de Ospina 5 en modelo murino 2020;RAABUAP:13577. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/13577>

[25]. Vakurov A, Simpson CE, Daly CL, Gibson TD, Millner PA. Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase. Biosens Bioelectron 2004;20(6):1118-25. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566304002957>

[26]. Vaidya AM, Annapure US. Chapter 38 - Enzymes in Biosensors for Food Quality Assessment. En: Kuddus M, editor. Enzymes in Food Biotechnology [Internet]. Academic Press 2019. p. 659-74. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132807000384>

[27]. Liu A, Wang K, Weng S, Lei Y, Lin L, Chen W, *et al.* Development of electrochemical DNA biosensors. TrAC Trends Anal Chem 2012;37:101-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016599361200146X>

[28]. Lucarelli F, Palchetti I, Marrazza G, Mascini M. Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in

water and wastewater samples. Talanta 2002;56(5):949-57. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914001006555>

[29]. Beleño Cabarcas MT. Desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos para la vigilancia medioambiental. 2019. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12930/1435>

[30]. Sevidanes Quincy M. Biosensores basados en aptámeros: Tipos y aplicaciones en biomedicina. 2022. Disponible en: <https://idus.us.es/handle/11441/143953>

[31]. Yáñez-Sedeño P, Campuzano S, Pingarrón JM. Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers: A review. Anal Chim Acta 2017;960:1-17. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267017300223>

[32]. Cervera Chiner L. Aplicación y validación de la tecnología de inmunosensores piezoeléctricos de alta frecuencia (HFF-QCM) para la detección de pesticidas y antibióticos en miel [Internet] [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica de València 2020. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/152488>

[33]. Ruiz-Valdepeñas Montiel V. Desarrollo de plataformas electroquímicas para biosensado directo de analitos de relevancia alimentaria y clínica en muestras de elevada complejidad 2020. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14352/11072>

[34]. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-García F. Monoclonal Versus Polyclonal

Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J* 2005;46(3):258-68. Disponible en: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/46/3/258/738903>

[35]. Cevallos Cedeño RE. Desarrollo de métodos inmunoquímicos para la determinación de sustancias tóxicas en alimentos y aguas [Internet] [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica de València; 2020. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/149570>

[36]. Oliver Gómez MJ. Resonadores piezoeléctricos como plataforma para el desarrollo de inmunosensores. 2013. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10578/3484>

[37]. Treviño Castrillo J. Desarrollo de un biosensor de resonancia de plasmón superficial para la determinación de hormonas pituitarias en muestras biológicas [Internet] [doctoralThesis]. 2009. Disponible en: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/137>

[38]. Kimmel DW, LeBlanc G, Meschievitz ME, Cliffel DE. Electrochemical Sensors and Biosensors. *Anal Chem* 2012;84(2):685-707. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac202878q>

[39]. Cazes J. Analytical Instrumentation Handbook. CRC Press; 2004. 1066 p. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9780849390395/analytical-instrumentation-handbook-jack-cazes>

[40]. Ortega F, de Apodaca O. Biosensores y Biochips, herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. *Discursos*. 2006. Disponible en: <https://ranf.com/wp-content/uploads/academicos/discursos/numero/fidel.pdf>

[41]. Peña Machado M. Fármacos que actúan sobre los principales agentes biológicos que afectan al hombre. En: *Farmacología Clínica*. ENCIMED; 2013. p. 410-41. Disponible en: <https://library.co/document/zwvex9wv-f%C3%A1rmacos-act%C3%BAan-principales-agentes-biol%C3%B3gicos-afectan-hombre.html>

[42]. Ferguson JP, Baxter GA, McEvoy JDG, Stead S, Rawlings E, Sharman M. Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor. *Analyst* 2002;127(7):951-6. Disponible en: https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2002/an/b200757f?casa_token=DdiVuvZG9F0AAA:aY_rCPiuXzyoMAVArUUIC3tcUkKXP G21VAPXT8c-z7NEZmo88k-JuCdcV4yAWAFDm55liFRfzqMP5Y

[43]. Ramatla T, Ngoma L, Adetunji M, Mwanza M. Evaluation of Antibiotic Residues in Raw Meat Using Different Analytical Methods. *Antibiotics* 2017;6(4):34. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6382/6/4/34>

[44]. Liu B, Zhang B, Cui Y, Chen H, Gao Z, Tang D. Multifunctional Gold-Silica Nanostructures for Ultrasensitive Electrochemical Immunoassay of Streptomycin Residues. *ACS Appl Mater Interfaces*

2011;3(12):4668-76. Disponible en:
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/am201087r>

[45]. Zhu Y, Son JI, Shim YB. Amplification strategy based on gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for neomycin immunosensors. *Biosens Bioelectron* 2010;26(3):1002-8. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566310005270>

[46]. Zhao BY, Wei Q, Xu C, Li H, Wu D, Cai Y, *et al.* Label-free electrochemical immunosensor for sensitive detection of kanamycin. *Sens Actuators B Chem* 2011;155(2):618-25. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925400511000360>

[47]. Yu S, Wei Q, Du B, Wu D, Li H, Yan L, *et al.* Label-free immunosensor for the detection of kanamycin using Ag@Fe₃O₄ nanoparticles and thionine mixed graphene sheet. *Biosens Bioelectron* 2013;48:224-9. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566313002911>

[48]. Riquelme Vilches SA. Desarrollo, validación e implementación de una metodología confirmatoria para la identificación y cuantificación simultánea de florfenicol, cloranfenicol y tiafenicol en productos farmacéuticos de uso veterinario por LC-MS/MS 2011. Disponible en:
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105390>

[49]. Instituto de Medicina Veterinaria.

Resolución número 47/12. 2015.

[50]. Dong Z, Huang G, Xu S, Deng C, Zhu J, Chen S, *et al.* Real-time and label-free detection of chloramphenicol residues with specific molecular interaction. *J Microsc* 2009;234(3):255-61. Disponible en:
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2818.2009.03175.x?casa_token=so5gcSNFRY4AAAAA%3AAqgdMoiH97djT6azcwuxnaFp25jts_mFxCYtOtN310tTili5XG9HaaU8OpBYJLNpmb3_BYQkYQ3NZYGG

[51]. Zhang S, Zhang Z, Shi W, Eremin SA, Shen J. Development of a Chemiluminescent ELISA for Determining Chloramphenicol in Chicken Muscle. *J Agric Food Chem* 2006;54(16):5718-22. Disponible en:
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf060275j>

[52]. Kim DM, Rahman MdA, Do MH, Ban C, Shim YB. An amperometric chloramphenicol immunosensor based on cadmium sulfide nanoparticles modified-dendrimer bonded conducting polymer. *Biosens Bioelectron* 2010;25(7):1781-8. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566309007027>

[53]. Zhang N, Xiao F, Bai J, Lai Y, Hou J, Xian Y, *et al.* Label-free immunoassay for chloramphenicol based on hollow gold nanospheres/chitosan composite. *Talanta* 2011;87:100-5. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003991401100854X>

[54]. Karaseva NA, Ermolaeva TN. A piezoelectric immunosensor for

chloramphenicol detection in food. *Talanta* 2012;93:44-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914011011155>

[55]. Majdinasab M, Mitsubayashi K, Marty JL. Optical and Electrochemical Sensors and Biosensors for the Detection of Quinolones. *Trends Biotechnol* 2019;37(8):898-915. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(19\)30004-6](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(19)30004-6)

[56]. Huet AC, Charlier C, Singh G, Godefroy SB, Leivo J, Vehniäinen M, *et al.* Development of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for (fluoro)quinolones in egg, fish, and poultry meat. *Anal Chim Acta* 2008;623(2):195-203. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267008010829>

[57]. Pan M, Li S, Wang J, Sheng W, Wang S. Development and Validation of a Reproducible and Label-Free Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Enrofloxacin Detection in Animal-Derived Foods. *Sensors* 2017;17(9):1984. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8220/17/9/1984>

[58]. Aymard C, Kanso H, Serrano MJ, Pagán R, Noguer T, Istamboulie G. Development of a new dual electrochemical immunosensor for a rapid and sensitive detection of enrofloxacin in meat samples. *Food Chem* 2022;370:131016. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814621020227>

[59]. Shi Q, Teng Y, Zhang Y, Liu W. Rapid

detection of organophosphorus pesticide residue on Prussian blue modified dual-channel screen-printed electrodes combining with portable potentiostat. *Chin Chem Lett* 2018;29(9):1379-82. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1001841717304928>

[60]. Liu B, Li M, Zhao Y, Pan M, Gu Y, Sheng W, *et al.* A Sensitive Electrochemical Immunosensor Based on PAMAM Dendrimer-Encapsulated Au for Detection of Norfloxacin in Animal-Derived Foods. *Sensors* 2018;18(6):1946. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8220/18/6/1946>

[61]. Stevenson HS, Shetty SS, Thomas NJ, Dhamu VN, Bhide A, Prasad S. Ultrasensitive and Rapid-Response Sensor for the Electrochemical Detection of Antibiotic Residues within Meat Samples. *ACS Omega* 2019;4(4):6324-30. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.8b03534>

[62]. Peng C, Li Z, Zhu Y, Chen W, Yuan Y, Liu L, *et al.* Simultaneous and sensitive determination of multiplex chemical residues based on multicolor quantum dot probes. *Biosens Bioelectron* 2009;24(12):3657-62. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566309002929>

[63]. Kivirand K, Min M, Rincken T. Challenges and Applications of Impedance-Based Biosensors in Water Analysis. En: *Biosensors for Environmental Monitoring* [Internet]. IntechOpen 2019. Disponible en:

<https://www.intechopen.com/chapters/69216>

[64]. Yu W, Sang Y, Wang T, Liu W, Wang X. Electrochemical immunosensor based on carboxylated single-walled carbon nanotube-chitosan functional layer for the detection of cephalexin. *Food Sci Nutr* 2020;8(2):1001-11. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.1382>

[65]. Xiao J, Wei N, Wu S, Li H, Yin X, Si Y, *et al.* The Simultaneous Detection of Multiple Antibiotics in Milk and Pork Based on an Antibody Chip Biosensor. *Biosensors* 2022;12(8):578. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/8/578>

[66]. Jia J, Zhang H, Qu J, Wang Y, Xu N. Immunosensor of Nitrofurantoin Antibiotics and Their Metabolites in Animal-Derived Foods: A Review. *Front Chem* 2022;10:813666. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.813666/full>

[67]. Xia X, Li X, Zhang S, Ding S, Jiang H, Li J, *et al.* Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008;1208(1):101-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967308014167>

[68]. Errecalde JO. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO 2004. Disponible en: <https://www.fao.org/3/y5468s/y5468s.pdf>

[69]. Yan C, Teng J, Liu F, Yao B, Xu Z, Yao L, *et al.* Signal amplified enzyme-linked immunosorbent assay with gold nanoparticles for sensitive detection of trace furaltadone metabolite. *Microchem J.* 2020;159:105414. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X20320440>

[70]. Wang B, He B, Guo R, Jiao Q, Liang Y, Wang J, *et al.* A competitive-type electrochemical immunosensor based on Ce-MOF@Au and MB-Au@Pt core–shell for nitrofurantoin residues detection. *Bioelectrochemistry* 2021;142:107934. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567539421001973>

[71]. Liu W, Zhao C, Zhang Y, Lu S, Liu J, Xi R. Preparation of Polyclonal Antibodies to a Derivative of 1-Aminohydantoin (AHD) and Development of an Indirect Competitive ELISA for the Detection of Nitrofurantoin Residue in Water. *J Agric Food Chem* 2007;55(17):6829-34. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf070620k>