



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias de la Ingeniería - Programa de Doctorado en Ciencias de la  
Ingeniería mención Ingeniería Eléctrica

**Determinación de concentración de antibióticos en leche  
bovina mediante algoritmos de análisis espectral de  
señales de nanobiosensores.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería  
Mención Ingeniería Eléctrica

Pablo Andrés Gutiérrez Roa  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2021

Profesor Guía: Sergio Torres Inostroza  
Dpto. de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería  
Universidad de Concepción



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE INGENIERIA

# DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE BOVINA MEDIANTE ALGORITMOS DE ANÁLISIS ESPECTRAL DE SEÑALES DE NANOBIOSENSORES

Por: Pablo Andrés Gutiérrez Roa



Tesis presentada a la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Concepción  
para optar al grado académico de Doctor en Ciencias de la Ingeniería  
Mención Ingeniería Eléctrica

Noviembre 2021  
Concepción, Chile

**Profesor Guía: Sergio Torres Inostroza**  
**Comisión: Pablo Coelho**  
**Sebastián E. Godoy**



© 2021, Pablo Andrés Gutiérrez Roa

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento



a mis padres, Marta Roa y Nicanor Gutiérrez

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor Sergio Torres, quien con sus conocimientos y apoyo me guió a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

También quiero agradecer a la Universidad de Concepción, la Facultad de Ingeniería y docentes del Departamento de Ingeniería Eléctrica, especialmente a Sebastián Godoy y Pablo Coelho brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda.

Agradezco también el apoyo de CONICYT, actual ANID por financiar mis estudios.

Por último, quiero agradecer a todos mis compañeros de doctorado, Laura Viafora, Anselmo Jara, Guillermo Machuca y Wagner Ramírez por su apoyo académico y emocional.

A mi familia, por apoyarme aún cuando mis ánimos decaían. En especial, quiero hacer mención de mis padres Marta Roa y Nincanor Gutiérrez, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías.

A Karol, por su compañía, paciencia e incondicional apoyo.

Muchas gracias a todos.

## Resumen

### Resumen

En esta tesis se presenta el desarrollo de un sistema biosensor que integra nanotecnología, optomecánica y un algoritmo de detección espectral para la cuantificación sensible de residuos de antibióticos en leche cruda de vaca. En primer lugar, se diseñaron y sintetizaron nanobiosensores uniéndose químicamente nanopartículas de oro (AuNP) con biorreceptores aptámeros altamente selectivos para cuatro antibióticos ampliamente utilizados en el campo de la medicina veterinaria, a saber, kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina y sulfadimetoxina. Cuando las moléculas de los antibióticos están presentes en la muestra de leche, la interacción con los aptámeros induce la agregación aleatoria de AuNP. Este fenómeno modifica el espectro de absorción inicial de la muestra de leche sin antibióticos, produciendo características espectrales que indican tanto la presencia de antibióticos como, en cierta medida, su concentración. En segundo lugar, se diseñó y construyó un dispositivo electro-opto-mecánico que realiza la adquisición automática de datos espectrales de alta resolución en un rango de longitud de onda de 400 a 800 nm. En tercer lugar, los espectros adquiridos se procesaron mediante un algoritmo de aprendizaje automático que está integrado en el hardware de adquisición para determinar la presencia y los rangos de concentración de los antibióticos. Nuestro enfoque superó las técnicas estandarizadas de vanguardia (basadas en la relación 520/620 nm) para la detección de antibióticos, tanto en velocidad como en sensibilidad.

**Keywords** – Biosensores, nanotecnología, espectro, support vector machine algorithms.

## Abstract

In this thesis we present the development of a biosensor system that integrates nanotechnology, optomechanics and a spectral detection algorithm for sensitive quantification of antibiotic residues in raw milk of cow. Firstly, nanobiosensors were designed and synthesized by chemically bonding gold nanoparticles (AuNPs) with aptamer bioreceptors highly selective for four widely used antibiotics in the field of veterinary medicine, namely, Kanamycin, Ampicillin, Oxytetracycline and Sulfadimethoxine. When molecules of the antibiotics are present in the milk sample, the interaction with the aptamers induces random AuNP aggregation. This phenomenon modifies the initial absorption spectrum of the milk sample without antibiotics, producing spectral features that indicate both the presence of antibiotics and, to some extent, its concentration. Secondly, we designed and constructed an electro-opto-mechanic device that performs automatic high-resolution spectral data acquisition in a wavelength range of 400 to 800 nm. Thirdly, the acquired spectra were processed by a machine-learning algorithm that is embedded into the acquisition hardware to determine the presence and concentration ranges of the antibiotics. Our approach outperformed state-of-the-art standardized techniques (based on the 520/620 nm ratio) for antibiotic detection, both in speed and in sensitivity

**Keywords** – Biosensors, nanotechnology, spectrum, support vector machine algorithms.

# Índice general

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>Resumen</b>	<b>II</b>
<b>Abstract</b>	<b>III</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Inocuidad alimentaria y multiresistencia en el mundo. . . . .	1
1.2. Normativa chilena. . . . .	1
1.3. Propuesta . . . . .	2
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>4</b>
2.1. Métodos de detección actuales. . . . .	4
2.2. Nanobiosensores como alternativa. . . . .	4
2.3. Plasmón de resonancia superficial. . . . .	5
2.4. Física del plasmón superficial en AuNPs. . . . .	5
2.4.1. Modelo aproximación dipolar. . . . .	6
2.4.2. Funcionamiento de las NPs como biosensor. . . . .	9
2.4.3. Efecto del medio en los espectros. . . . .	9
2.4.4. Efectos del tamaño de las NPs. . . . .	10
2.4.5. Efecto de la forma de las NPs. . . . .	12
2.5. Nanobiosensores con nanopartículas de oro para la detección de antibióticos. . . . .	13
<b>3. Metodología</b>	<b>14</b>
3.1. Nanobiosensores y antibióticos . . . . .	14
3.2. Leche, una matriz compleja . . . . .	15
3.3. Adquisición y procesamiento espectral . . . . .	18
3.3.1. Hardware y software . . . . .	18
3.4. Algoritmo de detección de antibióticos . . . . .	20
3.4.1. Reducción de la dimensionalidad de la señal . . . . .	20
3.4.2. Diseño del algoritmo de detección de antibióticos. . . . .	24
3.5. Descripción de base de datos. . . . .	25
<b>4. Análisis</b>	<b>29</b>



---

<b>5. Discusión</b>	<b>31</b>
<b>6. Conclusión</b>	<b>33</b>
<b>Referencias</b>	<b>34</b>
<b>Apéndices</b>	<b>38</b>
<b>A. Test</b>	<b>38</b>
A1. Anexo 1: Síntesis de Biosensor basado Nanopartículas de Oro y aptámeros. . . . .	38
A1.1. Síntesis de AuNPs . . . . .	38
A1.2. Resultados . . . . .	40
A1.2.1. Síntesis de AuNPs. . . . .	40
A1.3. Construcción de Biosensores. . . . .	41
A1.3.1. Materiales y métodos . . . . .	41
A1.4. Biosensor para Oxitetracilina y ensayos de detección. . . . .	42
A1.4.1. Curva de calibración para la determinación de Oxitetracilina en agua (Protocolo basado en <a href="#">Kim et al. (2010)</a> ). . . . .	42
A1.4.2. Clasificadores . . . . .	43
A1.4.3. Resultados . . . . .	43
A1.5. Biosensor para Sulfadimetoxina y ensayos de detección. . . . .	44
A1.5.1. Curva de calibración para la determinación de Sulfadimetoxina en agua (protocolo basado en <a href="#">Chen et al. (2013)</a> ): . . . . .	44
A1.5.2. Clasificadores. . . . .	45
A1.5.3. Resultados. . . . .	45
A1.6. Biosensor para Kanamicina y ensayos de detección. . . . .	46
A1.6.1. Curva de calibración para la determinación de Kanamicina en agua (protocolo basado en <a href="#">Song et al. (2011)</a> ): . . . . .	46
A1.6.2. Clasificadores. . . . .	46
A1.6.3. Resultados. . . . .	46
A1.7. Biosensor para ampicilina y ensayos de detección. . . . .	47
A1.7.1. Curva de calibración para la determinación de Ampicilina en agua (protocolo basado en <a href="#">Song et al. (2012)</a> ): . . . . .	47
A1.7.2. Clasificadores: . . . . .	47
A1.7.3. Resultados. . . . .	47
A2. Prototipo de Hardware integrado de optomecánica y optoelectrónica	48
A2.1. El hardware optomecánico. . . . .	48
A2.2. El hardware optoelectrónico. . . . .	50
A2.3. El hardware de electrónica de control. . . . .	51
A2.4. La integración del Hardware, Software y Firmware. . . . .	52

A2.5.	Determinación del espectro de reflexión o transmisión del biosensor en antibióticos individuales y mezclas en agua. . . . .	53
A2.5.1.	Instrumentación. . . . .	53
A2.5.2.	Procedimiento de medición. . . . .	54
A2.5.3.	Resultados. . . . .	55
A2.5.4.	Evolución Temporal. . . . .	57
A3.	Parámetros bioanalíticos de los biosensores en leche cruda. . . . .	58
A3.1.	Evaluación de procedimientos de tratamiento de las muestras de leche. . . . .	58
A3.1.1.	Biosensor Covalente. . . . .	58
A3.2.	Evaluación agregación nanopartículas de oro en leche. . . . .	59
A3.2.1.	Materiales y métodos. . . . .	59
A3.2.2.	Resultados. . . . .	60
A3.3.	Evaluación actividad Biosensor en leche. . . . .	60
A3.3.1.	Materiales y métodos. . . . .	61
A3.3.2.	Resultados. . . . .	61
A3.4.	Evaluación actividad Biosensor en leche clarificada. . . . .	62
A3.4.1.	Materiales y métodos. . . . .	62
A3.4.2.	Resultados. . . . .	63
A3.4.3.	Determinación de Ampicilina por HPLC. . . . .	64
A3.4.4.	Materiales y métodos. . . . .	64
A3.4.5.	Resultados. . . . .	64
A4.	Memoria algoritmos clasificación en agua. . . . .	65
A4.1.	Hipótesis de Trabajo. . . . .	66
A4.2.	Objetivo Principal. . . . .	66
A4.3.	Métodos utilizados en clasificación. . . . .	66
A4.4.	Datos disponibles. . . . .	67
A4.5.	Resultados. . . . .	67
A4.6.	Resultados para antibióticos. . . . .	68
A4.7.	Método propuesto de clasificación para Oxitetraciclina. . . . .	70
A5.	Pruebas en suero de leche artificial. . . . .	71

# Índice de cuadros

4.0.1. Tasa de precisión, resultados de validación cruzada SVM (uno contra todos) para 20 coeficientes de expansión. Se muestra la tasa promedio obtenida para la validación cruzada, repitiendo el entrenamiento con todas las combinaciones de los diferentes conjuntos.	30
A3.1. Concentración de proteínas remanentes y porcentaje de eliminación de proteínas mediante los métodos utilizados.	64
A4.1. Método: Área bajo la curva.	67
A4.2. Método: Pendiente entre 2 puntos.	68
A4.3. Método: Razón entre 2 puntos.	68
A4.4. Método: Distancia euclidiana.	68
A4.5. Método: Distancia Mahalanobis.	68
A4.6. Método: Área bajo la curva Entre: 655 y 700[nm] $N^{\circ}$ de muestras: 18.	69
A4.7. Método: Pendiente entre 2 puntos Entre: 475 y 510[nm] $N^{\circ}$ de muestras: 18.	69
A4.8. Método: Razón entre 2 puntos Entre: 490 y 585[nm] $N^{\circ}$ de muestras: 18.	69
A4.9. Método: Distancia Euclidiana Entre: 690 y 700[nm] $N^{\circ}$ de muestras: 18.	69
A4.10. Método: Distancia de Mahalanobis Entre: 420 y 525[nm] $N^{\circ}$ de muestras: 18.	70
A5.1. Concentración de principales componentes de la matriz de la leche.	72

# Índice de figuras

2.4.1. Esquema de la interacción del campo eléctrico de la luz con las NPs.	6
2.4.2. (a) Amplitud de oscilación de un oscilador lineal en función de la frecuencia de una excitación externa. (b) Espectro de absorción óptica correspondiente a NPs de 10[nm] de diámetro en un cristal de silicio. . . . .	6
2.4.3. Simulación del coeficiente de extinción para una nanoesfera de oro de 13[nm] ante una onda plana incidente realizado con el toolbox de matlab MNPBEM17. . . . .	8
2.4.4. Espectro de absorción experimental de una solución de NPs metálicas de oro de 13[nm] de diámetro. . . . .	8
2.4.5. Espectros en función del índice de refracción del medio. . . . .	10
2.4.6. Espectros dependientes del tamaño de las NPs. . . . .	11
2.4.7. Efecto dipolar (arriba), efecto cuadrupolar (abajo). . . . .	11
2.4.8. Comparación de los espectros de absorción para NPs de distintas formas . . . . .	12
2.4.9. Espectro típico de NPs esféricas (izquierda), espectro típico de nanorods (derecha) . . . . .	13
3.1.1. Imagen microscópica de nanopartículas de oro no agregadas. Estas imágenes fueron obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión para caracterización visual y morfológica (Microscopio JEOL JEM 1200EX II, Laboratorio de Microscopía Electrónica, Universidad de Concepción). . . . .	15
3.1.2. Imagen microscópica de nanopartículas de oro agregadas . . . . .	16
3.1.3. Espectro de absorción de AuNP agregados y no agregados. Cuando se produce la agregación, se produce un cambio en el peak de intensidad del espectro de absorción con el correspondiente cambio colorimétrico. . . . .	16

3.3.1.Etapas de desarrollo del dispositivo propuesto. a) Primer prototipo de laboratorio; (b) diseño industrial para abordar los inconvenientes del prototipo de laboratorio; (c) microrreactores y colimadores ópticos; (d) contenedor prototipo y (e) componentes internos clave: (I) un espectrómetro Ocean Optics STS VIS-NIR, (II) fibras ópticas P600 que transmiten desde el espectro ultravioleta al visible, (III) un Ocean Optics HL-2000- Fuente de luz HP-FHSA, (IV) placas de 96 pocillos para colocar las muestras a medir y (V) una unidad de desplazamiento bidimensional de alta precisión para mover la microplaca y colocar la muestra a medir debajo del radiómetro. . . . .	19
3.3.2.Diagrama de bloques del sistema óptico de adquisición de datos. En primer lugar, se mide un pozo de referencia para estimar el espectro agregado del contenedor, el agua y el NBS disuelto. Los datos de referencia son almacenados por el software desarrollado. En segundo lugar, cada muestra se mide de la misma manera y la absorbancia NBS se obtiene restando la referencia de la absorbancia de la muestra. . . . .	21
3.4.1.Polinomio orden 10. . . . .	22
3.4.2.Polinomio orden 20. Ajuste del espectro de absorción medido $r_j(\lambda)$ mediante funciones de Legendre del primer tipo. A medida que aumenta el número de funciones básicas, mejor es el ajuste de la aproximación $\hat{r}_j(\lambda)$ . La aproximación se muestra con (a) diez funciones de base y (b) veinte funciones de base. . . . .	23
3.4.3.Error cuadrático medio (RMSE) del ajuste entre el espectro de absorción medido $r_j(\lambda)$ y la aproximación realizada con las funciones de Legendre $\hat{r}_j(\lambda)$ para la kanamicina. Se requieren $N = 20$ funciones base para asegurar un RMSE por debajo del 1%. . . . .	24
3.4.4.El espectro medido a partir de una muestra $r_j$ con presencia de antibiótico y nivel de concentración desconocidos ingresa al algoritmo. El esquema Support Vector Machine (SVM) determina si un antibiótico está presente o no. Si el antibiótico está presente en la muestra, el árbol se conecta en cascada hasta que uno de los SVM considera que la concentración de antibiótico es cero o no, luego si está por sobre o por debajo del LMR. . . . .	25
3.5.1.Kanamicina . . . . .	27
3.5.2.Ampicilina . . . . .	27
3.5.3.Oxitocina . . . . .	28
3.5.4.Sulfadimetoxina. Espectros de absorción medidos para los cuatro antibióticos utilizados en este trabajo. Se muestran las repeticiones disponibles para cada antibiótico y cada una de las concentraciones. Aunque las curvas muestran separabilidad, no es posible estimar concentraciones mediante inspección visual. . . . .	28
A1.1.Diagrama representativo del proceso de síntesis de AuNPs. . . . .	39

A1.2. Equipos y software para caracterización espectroscópica. A) Equipo Epoch (Biotek) y notebook HP con software Gen5 3.00. B) Interfaz gráfica del software Gen5 3.00 utilizado para la caracterización espectroscopias de soluciones utilizadas. . . . .	40
A1.3. Proceso de síntesis de AuNPs utilizadas. A) Sistema de reflujo montado bajo campana con solución de $HAuCl_4$ 1[mM] bajo agitación a 100°C y solución de citrato de sodio 38,8[mM] presente en cuello lateral. B) Cambio de color de la solución borgoña, característico de la síntesis de AuNPs, al agregar citrato de sodio 38,8[mM]. C) La solución de AuNPs presente en balón a temperatura ambiente. . . . .	41
A1.4. Caracterización de AuNPs utilizadas en este proyecto. A) Histograma de AuNPs obtenidas mediante DLS, observándose un tamaño promedio de 19[nm] aproximado. B) Potencial Z de AuNPs utilizadas en este estudio, las cuales presentan carga negativa con una magnitud de 40[mV] aproximado. C) Imagen TEM de AuNPs utilizadas en este estudio, se observa que los núcleos poseen un tamaño aproximado de 15[nm] y forma esférica características de AuNPs. D) Caracterización espectroscópicas de AuNPs sintetizadas y efecto de pH de solución de síntesis. Se observa que la mayor absorción se obtiene con síntesis realizadas a pH 5,3 y 5,6. . . . .	42
A1.5. Curva de calibración para biosensor para Oxitettraciclina. A) Espectro de absorbancia de biosensor para oxitettraciclina en presencia de distintas concentraciones de Oxitettraciclina posterior a 30[ <i>min</i> ] de incubación con 1[M] de NaCl. Paso óptico de 1[ <i>cm</i> ]. B) Curva calibración construida utilizando como clasificador el área bajo curva de los espectros de absorción obtenidos. C) Zona de comportamiento lineal de la curva de calibración. Error estándar: 0,26982; pendiente: 0,0093; límite de detección: 84[ <i>ppb</i> ]; $R^2$ de medias: 0,9713. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3). . . . .	44
A1.6. Curva de calibración para biosensor para Sulfadimetoxina. A) Espectrograma del biosensor para la determinación de Sulfadimetoxina, en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico en agua. Se incluye los controles respectivos. 0,5[ <i>cm</i> ] de paso óptico. B) Curva de calibración para la determinación de Sulfadimetoxina en agua mediante biosensor basado en AuNPs. Error estándar: 0,1543; pendiente: 0,1729; ímite de detección: 8,9[ <i>ppb</i> ]; $R^2$ de medias: 0,9235. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3). . . . .	45

A1.7. Curva de calibración para biosensor para Kanamicina. A) Espectrograma del biosensor para la determinación de Kanamicina, en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico en agua. Se incluye los controles respectivos. 1[ <i>cm</i> ] de paso óptico. B) Curva de calibración para la determinación de Kanamicina en agua mediante biosensor basado en AuNPs. Error estándar: 0,08797; pendiente: 0,04731; límite de detección: 2,7[ <i>ppb</i> ]; $R^2$ de medias: 0,8393. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3). . . . .	47
A1.8. Curva de calibración para biosensor para Ampicilina. A) Espectrograma del biosensor para la determinación de Ampicilina, en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico en agua. Se incluye los controles respectivos. 1[ <i>cm</i> ] de paso óptico. B) Curva de calibración para la determinación de Ampicilina en agua mediante biosensor basado en AuNPs. Error estándar: 0,01604; pendiente: 0,0003; límite de detección: 80,2[ <i>ppb</i> ]; $R^2$ de medias: 0,8393. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3). . . . .	48
A2.1. Prototipo de Hardware optomecánico/optoelectrónico. a) Vista superior de mesa desplazadora, podemos observar la fibra óptica de medición posicionándose en la microplaca de 96 pocillos, también se visualiza el radiómetro junto a la fuente de iluminación. b) Vista posterior de la mesa desplazadora, fibra óptica de iluminación sobre la microplaca de 96 pocillos. . . . .	49
A2.2. Micro placa: de 96 pocillos. Esta es la utilizada para la medición.	49
A2.3. Fibra óptica que trabaja en el espectro ultra violeta y visible. . .	50
A2.4. Radiómetros VIS Y UV. . . . .	50
A2.5. Fuente de Iluminación. . . . .	51
A2.6. Raspberry Pi como unidad de control. . . . .	51
A2.7. Diagrama de control Hardware Software y Firmware. Flujo de Datos del prototipo. . . . .	52
A2.8. Esquema de trabajo del sistema. El usuario a través del software comanda el prototipo para obtener espectros de los pocillos. . . .	53
A2.9. Sistema de prototipo optoelectrónico integrado. En la imagen se puede apreciar el sistema motorizado automático que permite desplazar la placa de micro-reactores sobre las fibras de iluminación y transmisión, en donde el radiómetro será el encargado de digitalizar la señal de transmisión de los microfluidos proporcionados por el sistema mecánico de control de micro-volúmenes. . . . .	54
A2.10. Procedimiento para obtener los espectros de transmitancia en forma automática con el prototipo desarrollado: a) Sistema Microfluidos. b) Sistema optoelectrónico automatizado. c) Sistema Integrado (Software + Sistema Optoelectrónico) d) Sistema EPOCH. . . . .	55

A2.11	Biosensor para Kanamicina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados. . . . .	56
A2.12	Biosensor para Ampicilina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados. . . . .	56
A2.13	Biosensor para Oxitetraciclina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados. . . . .	57
A2.14	Biosensor para Sulfadimetoxina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados. . . . .	57
A2.15	Evolución temporal de 40 minutos (a una resolución de 1 minuto) de la transmitancia (sin calibrar) del biosensor para detectar Ampicilina en las proporciones (izquierda) 0[ppb] y (derecha) 4[ppb] (Límite máximo residual MLR). . . . .	58
A3.1.	Diagrama representativo de los tipos de enlaces e interacciones en proceso de reconocimiento Biosensor-antibiótico. En el panel superior de la imagen (electrostático) se muestran las interacciones electrostáticas entre cargas de las AuNPs con los grupos fosfato del ADN (línea verde), junto con las otras posibles interacciones que pueden ocurrir en el proceso de reconocimiento aptamero/antibiótico. En el panel inferior de la imagen (covalente), se muestra el aptámero unido covalentemente con la AuNPs (circulo amarillo), impidiendo que estas se desacoplen. Esto permitiría que el aptámero secuestre al antibiótico en la superficie de los AuNPs, afectando su agregación de manera específica, evitando así efectos en la agregación de las AuNPs de manera inespecífica. . . . .	59
A3.2.	Agregación de AuNPs en leche. A) Espectrograma de mezcla de AuNPs agregadas y sin agregar con leche. La imagen interior muestra microreactores que contienen leche, leche más AuNPs agregadas y leche más AuNPs. B) Espectrograma de mezcla de AuNPs con leche con posterior incubación de solución <i>NaCl</i> que propicia la agregación de NPs (Solución reveladora). Imagen interior muestra microreactores que contienen leche, leche más AuNPs mas solución reveladora y leche más AuNPs sin solución reveladora. . .	60
A3.3.	Actividad biosensor covalente para ampicilina en agua y leche. Espectrograma de biosensores para la determinación de ampicilina. Panel superior: Biosensor covalente 15(A), 30(B) y 45(C) para ampicilina en presencia de 2, 1 y 0, 6[M] de <i>NaCl</i> en agua. Panel inferior: Biosensor covalente 15(D), 30(E) y 45(F) para ampicilina en presencia de 2, 1 y 0, 6[M] de <i>NaCl</i> en Leche. Ensayo realizado con 1[cm] de paso óptico. . . . .	62



A3.4.Obtención de clarificado de leche a partir de método Carrez y acetato de etilo. A) Obtención de clarificado de leche a partir de método Carrez. B) Obtención de clarificado de leche a partir de método acetato de etilo. 1) Fase correspondiente a acetato de etilo. 2) Fase correspondiente a componentes insolubles en leche post tratamiento (lipidos, proteínas). 3) Suero de leche (Clarificado). . . . .	63
A3.5.Actividad biosensor covalente para ampicilina en clarificado de leche. Espectrograma de biosensores para la determinación de ampicilina en clarificado por Carrez (A) y por acetato de etilo (B). Ensayo realizado con 1[ <i>cm</i> ] de paso óptico. . . . .	64
A3.6.Cromatograma HPLC-UV. Detección de ampicilina. A) Cromatograma de muestra de reactivos derivatizantes en agua (Blanco). . . . .	65
A3.7.Cromatograma HPLC-UV. Detección de ampicilina. B) Cromatograma de muestra de ampicilina derivatizada en agua. Flecha negra muestra peak asociado a la presencia de ampicilina. . . . .	65
A4.1.Metodología propuesta para la clasificación de curvas de respuesta óptica para biosensor de Oxitetraciclina con una concentración de 2[M] de <i>NaCl</i> , agitadas y con un tiempo de revelado mayor o igual a 30 minutos. . . . .	70
A5.1.Espectros de las muestras de suero artificial con presencia de NPs.	72
A5.2.Cambios en el espectro de las muestras de suero con NPs a distintas concentraciones de calcio (las fracciones de la leyenda indican la fracción de la concentración de calcio normal de la leche). . . . .	73
A5.3.Cambios en el espectro de las muestras de suero con NPs a distintas concentraciones de sodio (las fracciones de la leyenda indican la fracción de la concentración de sodio normal de la leche). . . . .	73
A5.4.Métrica del ratio 620/520 para las distintas cocentraciones. . . . .	74

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Inocuidad alimentaria y multiresistencia en el mundo.

El crecimiento de la población mundial ha requerido que la industria alimentaria aumente su productividad y mejore la seguridad alimentaria. El consumo de leche antes o después del procesamiento térmico tiene varios riesgos para la salud asociados con la presencia de contaminantes como micotoxinas termorresistentes y residuos de antibióticos. Los antibióticos se utilizan principalmente en las granjas lecheras para el tratamiento de la mastitis y otras enfermedades infecciosas, [Máttar et al. \(2009\)](#). La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que existe una amplia evidencia científica de que los animales productores de alimentos (leche, carne y huevos) son un reservorio de bacterias resistentes a los antimicrobianos, [Bennani et al. \(2020\)](#). La multiresistencia puede llegar a la población humana a través de la cadena alimentaria, debido a un flujo continuo de genes de resistencia que podrían transferirse a la microbiota intestinal humana [Verraes et al. \(2014\)](#).

### 1.2. Normativa chilena.

El crecimiento de la población mundial ha requerido que la industria alimentaria aumente su productividad y mejore la seguridad alimentaria. El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y el Ministerio de Salud (MINSAL) son las instituciones encargadas de velar por la inspección y control sanitario de los productos

farmacéuticos veterinarios. El MINSAL implementa un plan nacional para el control de la presencia de residuos de antibióticos en productos lácteos, denominado “Programa de vigilancia de residuos de medicamentos veterinarios”. Este programa supervisa los Límites Máximos de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios potencialmente presentes en productos chilenos, [ACHIPIA \(2016\)](#). La leche contaminada con residuos de antibióticos en niveles superiores a los LMR debe descartarse antes de ser industrializada, evitando que estos contaminantes ingresen a la cadena alimentaria humana y su correspondiente impacto en la seguridad alimentaria y la salud pública. En vista de esto, es fundamental mejorar el seguimiento y el control de los residuos de antibióticos en la leche y los productos lácteos, evitando así la propagación y aparición de resistencia a los antibióticos, [Sachi et al. \(2019\)](#); [Tang et al. \(2017\)](#).

### 1.3. Propuesta

Se presenta el desarrollo de una solución tecnológica al problema de detección de residuos de antibióticos en la leche cruda. Este trabajo fue desarrollado como objetivo del proyecto FONDEF código ID16I10221 titulado “Desarrollo de Biosensores Optoelectrónicos y Algoritmos de correlación para cuantificar el espectro emitido por nanopartículas de oro que detectan la presencia de residuos de antibióticos en leche cruda”. Dicho proyecto fue llevado a cabo por un amplio equipo multidisciplinario formado por investigadores del Departamento de Ingeniería Eléctrica de la Universidad de Concepción y de la Facultad de Ingeniería y Tecnología de Universidad San Sebastián, en el cual el autor de esta tesis tuvo participación activa ([Gutiérrez et al. \(2020\)](#)).

Los métodos actuales para la detección y/o determinación de antibióticos en la leche se dividen en dos categorías principales. El primer grupo consta de métodos de cribado, que son económicos y fáciles de usar. Sin embargo, estos métodos son cualitativos (por ejemplo, pruebas microbiológicas) o semicuantitativos (por ejemplo, inmunoensayos) y se caracterizan por tener baja sensibilidad y baja especificidad, [Cháfer-Pericás et al. \(2010\)](#). Los kits Charm<sup>®</sup> y Delvotest<sup>®</sup> se encuentran entre los más utilizados por la industria láctea para la detección rápida (8-30 min) y sensible de residuos lácteos. Estos permiten la detección semicuantitativa de varias familias de anticuerpos, [Ahmed et al. \(2017\)](#). El segundo

grupo de métodos de confirmación se basa principalmente en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), necesaria para la cuantificación y validación de las pruebas de detección gracias a su excelente sensibilidad y especificidad, [Moudgil et al. \(2019\)](#). Estos métodos no son adecuados para el análisis de leche común en terreno, debido a los complejos y costosos materiales, y la necesidad de personal calificado y experimentado en técnicas cromatográficas. En este contexto, se intenta buscar una combinación de portabilidad y alto rendimiento analítico. Una solución de esas características sería perfecta para ser implementada en programas de monitoreo en terreno en el campo o lecherías para la detección y cuantificación sensible de residuos de antibióticos en la leche cruda. En esta tesis, se aborda el desarrollo de una solución tecnológica al problema de la detección óptica de residuos de antibióticos presentes en la leche cruda mediante un nanobiosensor (NBS) basado en el fenómeno del plasmón de resonancia superficial (Surface Plasmon Resonance SPR), que es prometedor para la detección en terreno al mejorar el rendimiento analítico en comparación con los kits de detección de antibióticos.

El dispositivo propuesto integra componentes optomecánicos y optoelectrónicos (fuente de luz, fibra óptica y radiómetro) para medir la variación en el espectro de absorción de la leche que es inducida por la interacción entre el NBS y las moléculas de antibiótico. Es importante destacar que el dispositivo implementa un algoritmo de aprendizaje automático para analizar simultáneamente señales ópticas de múltiples muestras (en una placa de micropocillos) y determinar las concentraciones de antibiótico correspondientes.

# Capítulo 2

## Marco Teórico

### 2.1. Métodos de detección actuales.

Actualmente, los “kits de detección” se utilizan en las plantas lecheras para realizar pruebas rápidas de residuos de antibióticos en la leche, que incluyen Delvotest<sup>®</sup> [Althaus et al. \(2003\)](#) (método microbiológico estándar) y otros métodos bioanalíticos basados en la unión a receptores de proteínas selectivos (p. Ej., SNAP R betalactámicos tests), que proporcionan resultados en tiempos cortos y con alta especificidad. Sin embargo, estos métodos son semicuantitativos y no están desarrollados para la detección simultánea de múltiples grupos de antibióticos (detección múltiple). Finalmente, la categoría de métodos instrumentales son los de mayor rendimiento analítico, siendo reconocida como la técnica oficial de confirmación para las pruebas de cribado. Los métodos de confirmación se basan en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a la espectrometría de masas, la cual se recomienda por su capacidad para realizar separación, identificación y análisis cuantitativo de analitos con alta sensibilidad y selectividad a muy bajas concentraciones. Sin embargo, se requieren métodos instrumentales costosos y laboriosos para llevar a cabo el análisis de HPLC.

### 2.2. Nanobiosensores como alternativa.

El desarrollo de sistemas biosensores ha abierto una nueva y prometedora forma de utilizar técnicas rápidas, sensibles y sencillas para la detección de contaminantes en el ámbito medioambiental y agroalimentario, [Vigneshvar et al.](#)

(2016). Los biosensores de base nanotecnológica (nanobiosensores; NBS) se caracterizan por su alta especificidad y sensibilidad que permite la detección de un amplio espectro de analitos en muestras complejas. Un número creciente de artículos ha descrito el desarrollo exitoso de estos sistemas para la detección de antibióticos utilizando aptámeros como biorreceptores, [Song et al. \(2012\)](#); [Dapra et al. \(2013\)](#); [Jeong and Rhee Paeng \(2012\)](#); [Kim et al. \(2014\)](#). Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios cortos con estructura tridimensional que proporcionan un reconocimiento de alta afinidad y alta especificidad para analitos que no son nucleótidos, [Shangguan et al. \(2007\)](#).

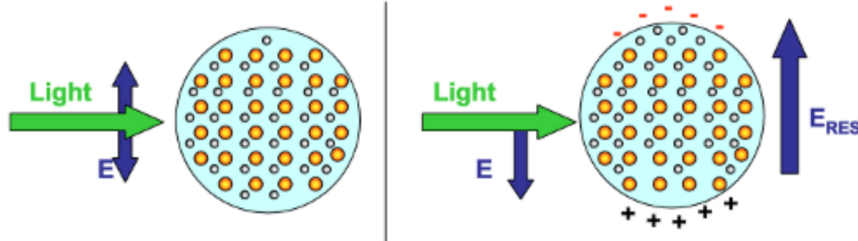
### 2.3. Plasmón de resonancia superficial.

Los NBS ópticos basados en el fenómeno del Plasmón de Resonancia Superficial (Surface Plasmon Resonance, SPR) son uno de los sistemas de sensores sin etiquetas más prometedores, [Unser et al. \(2015\)](#); [Nie et al. \(2014\)](#). El SPR es una propiedad óptica inherente de las nanopartículas de metales nobles, como el oro y la plata, que resulta de las oscilaciones colectivas de las nubes de electrones y permite implementar la detección óptica en el rango visible siguiendo el cambio del espectro de absorción/emisión. Esta propiedad depende de las dimensiones y la geometría de las nanopartículas. Por lo tanto, es posible diseñar NBS ópticas cuya interacción con un analito dado, provoca que las nanopartículas agreguen y, en consecuencia, absorber o dispersar la luz en diferentes regiones espectrales que pueden ser detectadas y cuantificadas instrumentalmente, [Guo \(2012\)](#).

### 2.4. Física del plasmón superficial en AuNPs.

La resonancia del plasmón superficial en nanopartículas (NPs) metálicas consiste en una oscilación colectiva de los electrones de conducción en la superficie de un metal excitados por el campo eléctrico de la luz ([García \(2011\)](#)).

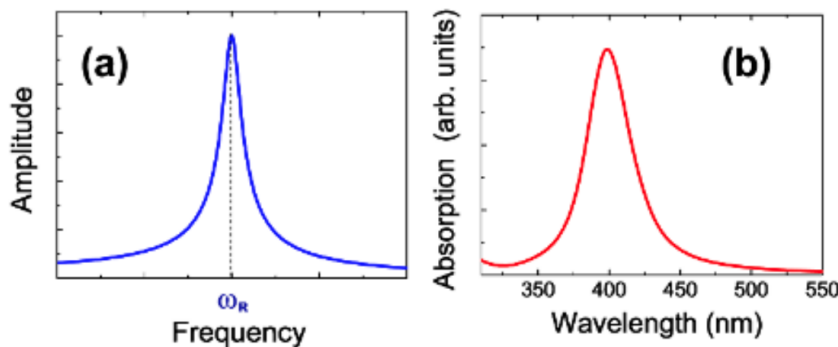
**Figura 2.4.1:** Esquema de la interacción del campo eléctrico de la luz con las NPs.



### 2.4.1. Modelo aproximación dipolar.

Según el modelo de la aproximación dipolar, el campo eléctrico de la luz que incide sobre las NPs metálicas, induce en estas una polarización de los electrones libres. Producto de esta polarización aparece una fuerza restauradora sobre los mismos electrones, de tal forma que, si la luz cesa, los electrones vuelven a su posición inicial perdiéndose la polarización. Este modelo hace una analogía con el funcionamiento de un oscilador lineal, el cual genera una fuerza restauradora cuando un resorte es deformado producto de una fuerza externa. Al igual que el oscilador lineal, las NPs de determinadas características geométricas, poseen frecuencias de resonancia. Por ejemplo, si se hace incidir luz blanca sobre las NPs, solo la luz de un determinado color o frecuencia hará que los electrones oscilen con un máximo de amplitud. El resto de las frecuencias prácticamente no interactuarán con las NPs. Este sistema no se puede caracterizar midiendo la amplitud de oscilación de los electrones como se haría con un oscilador lineal, sin embargo, es posible esperar que las NPs exhiban un espectro de absorción óptica como el que se ve en la figura 2.4.2.

**Figura 2.4.2:** (a) Amplitud de oscilación de un oscilador lineal en función de la frecuencia de una excitación externa. (b) Espectro de absorción óptica correspondiente a NPs de 10[nm] de diámetro en un cristal de silicio.



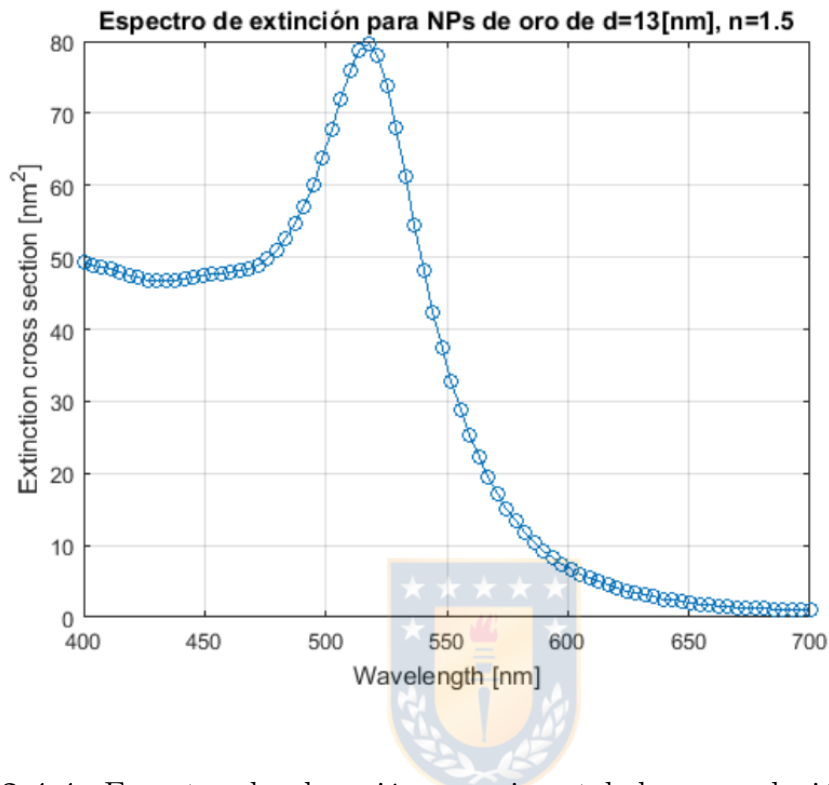
Desde el punto de vista matemático, el efecto clásico del plasmón superficial en NPs metálicas fue descrito por Mie (1908) mediante la resolución de las ecuaciones de Maxwell para una onda plana incidente sobre una esfera metálica rodeada de por un medio dieléctrico, tomando la función dieléctrica del metal. La teoría de Mie provee de una solución analítica exacta para este caso mediante una expansión multipolar. Para nanoesferas cuyo diámetro sea mucho menor que la longitud de onda incidente, solo el termino dipolar de la expansión contribuye en la extinción. Bajo estas condiciones, el coeficiente de extinción queda determinado por la ecuación 2.4.1 (Nehl and Hafner (2008)).

$$\sigma = \frac{18\pi V \varepsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\varepsilon_2}{(\varepsilon_1 + \varepsilon_2)^2 + \varepsilon_2^2} \quad (2.4.1)$$

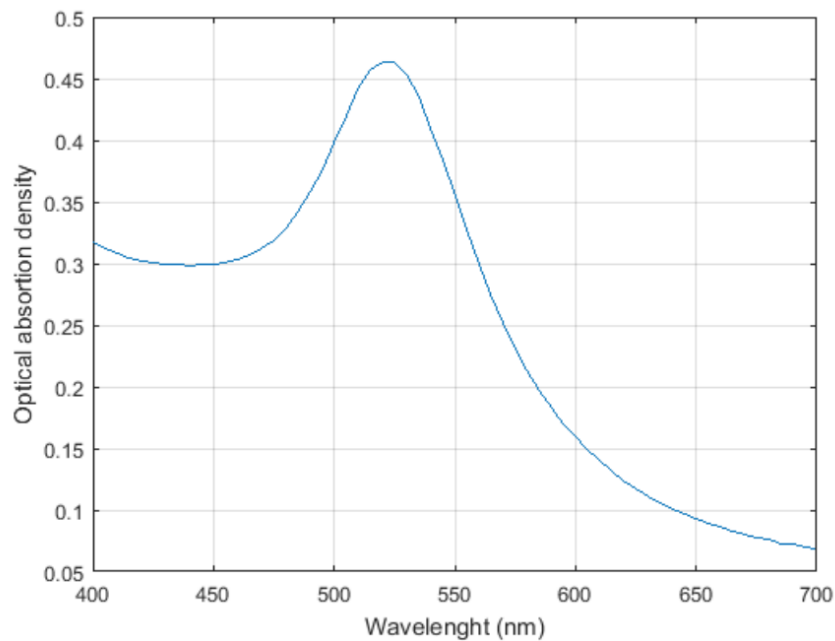
En esta ecuación,  $\sigma$  es el coeficiente de extinción,  $V$  es el volumen de la NPs,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $\varepsilon_m$  es la constante dieléctrica del medio y  $\varepsilon_1 + i\varepsilon_2$  es la función dieléctrica del metal. Existen múltiples herramientas para realizar simulaciones de los espectros de absorción que se generan con las NPs. En este informe se muestra una simulación hecha con el toolbox de Matlab MNPBEM17 (Hohenester and Trügler (2012)). En la figura 2.4.3 se tiene una simulación hecha para condiciones parecidas al caso experimental que se puede ver en la figura 2.4.4, para NPs esféricas de oro de 13[nm] de diámetro. Se puede apreciar que tanto en la simulación como en el caso experimental que se obtiene un peak cerca de los 520[nm].



**Figura 2.4.3:** Simulación del coeficiente de extinción para una nanoesfera de oro de 13[nm] ante una onda plana incidente realizado con el toolbox de matlab MNPBEM17.



**Figura 2.4.4:** Espectro de absorción experimental de una solución de NPs metálicas de oro de 13[nm] de diámetro.

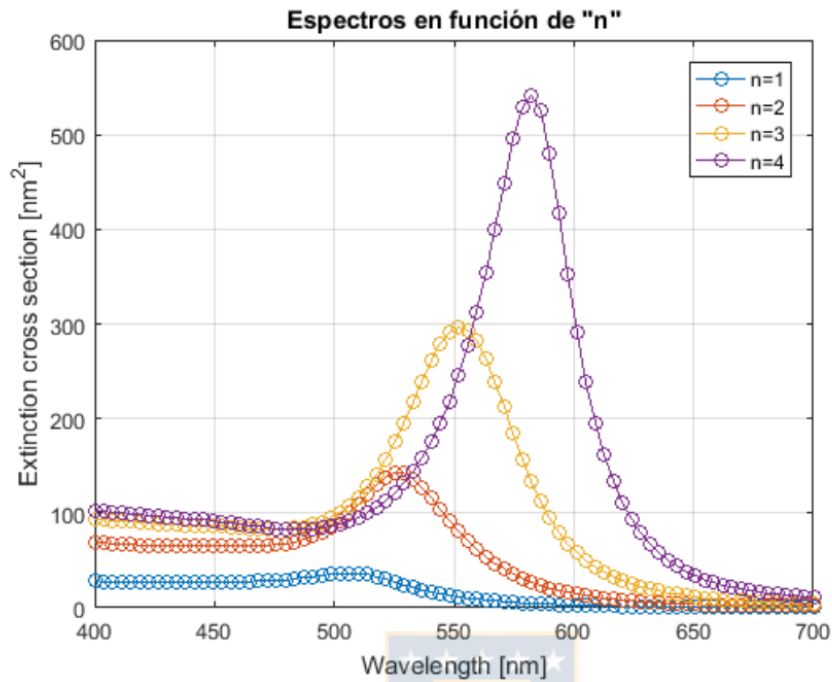


### 2.4.2. Funcionamiento de las NPs como biosensor.

La frecuencia de resonancia de las NPs depende fuertemente del tamaño, forma y propiedades dieléctricas de las mismas y del medio en el cual se encuentran. Las NPs metálicas además poseen tendencia a agregarse por lo que, en el proceso de funcionalización, estas deben ser estabilizadas mediante distintos métodos entre los cuales se pueden distinguir el electrostático, estérico, por ligando, por disolventes y electrostérica (Friederici et al. (2013)). Siempre que las NPs estén estabilizadas se obtendrán espectros como los que se ven en las figuras 2.4.3 y 2.4.4. Al perderse las estructuras estabilizadoras (por ejemplo, recubrimientos de citrato y aptámeros) las NPs agregan formando estructuras de distintas morfologías y tamaños. Esta agregación tiene efectos en la forma de los espectros. Este mecanismo de agregación de las NPs y la consiguiente alteración de los espectros es el que se utiliza para la detección de los antibióticos.

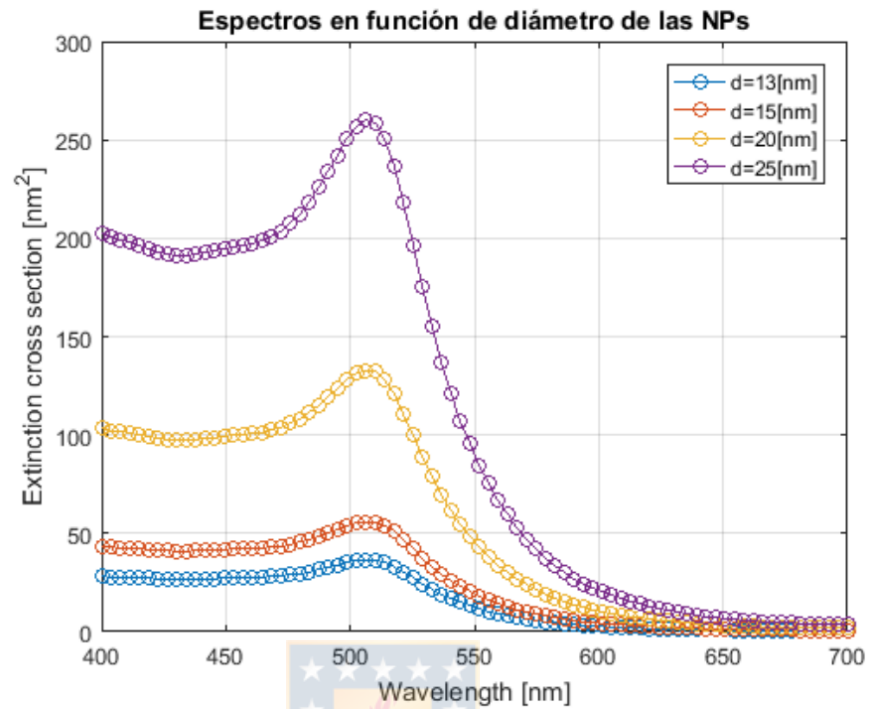
### 2.4.3. Efecto del medio en los espectros.

Como se puede ver en la ecuación 2.4.1, los espectros son dependientes de las funciones dieléctricas tanto de las NPs como del medio. En la figura 2.4.5 se pueden apreciar los espectros para distintos índices de refracción del medio en el cual están inmersas las NPs. Se puede ver un corrimiento hacia el rojo del peak a medida que el índice de refracción aumenta.

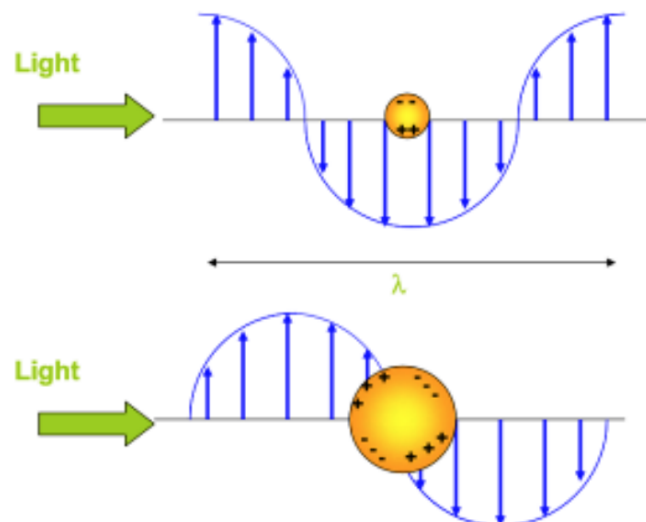
**Figura 2.4.5:** Espectros en función del índice de refracción del medio.

#### 2.4.4. Efectos del tamaño de las NPs.

La ecuación 2.4.1 es válida para el caso en que las NPs son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz incidente. Se puede apreciar que los espectros son dependientes del tamaño de las NPs. En la figura 2.4.6 se puede apreciar que el ancho de los espectros aumenta a medida que el diámetro de las NPs disminuye. Esto se debe a que los bordes de las NPs son responsables de la amortiguación de energía de los electrones que oscilan en resonancia, es decir, el efecto clásico que ocurre a un oscilador lineal en presencia de mayor amortiguamiento. Por otra parte, el peak no cambia mucho al variar el diámetro de las NPs.

**Figura 2.4.6:** Espectros dependientes del tamaño de las NPs.

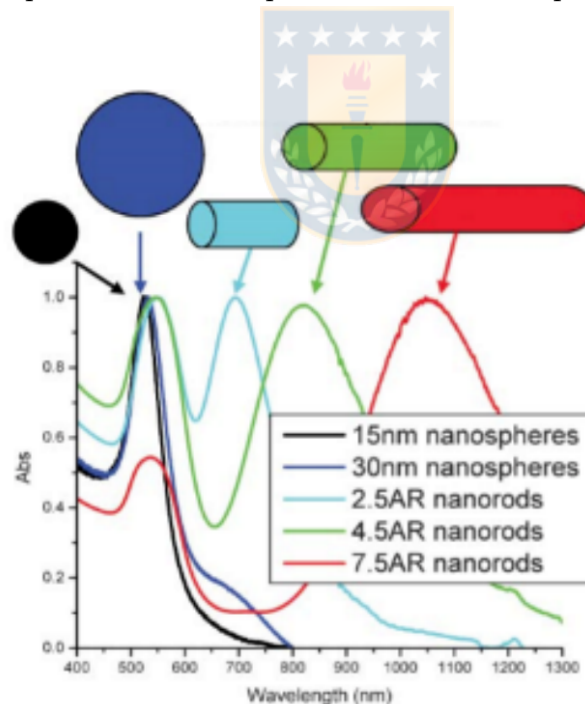
Como se dijo anteriormente, la ecuación 2.4.1 es aplicable para casos donde las NPs son de tamaños mucho menores que la longitud de onda de la luz incidente y donde la mayor contribución a la oscilación de los electrones al interior de las NPs es debido al término dipolar de la expansión multipolar. Para los casos donde esto no se cumple, el campo eléctrico de la luz puede inducir cuadrupolos o mayores modos de oscilación como se ve en la figura 2.4.7 (García (2011)).

**Figura 2.4.7:** Efecto dipolar (arriba), efecto cuadrupolar (abajo).

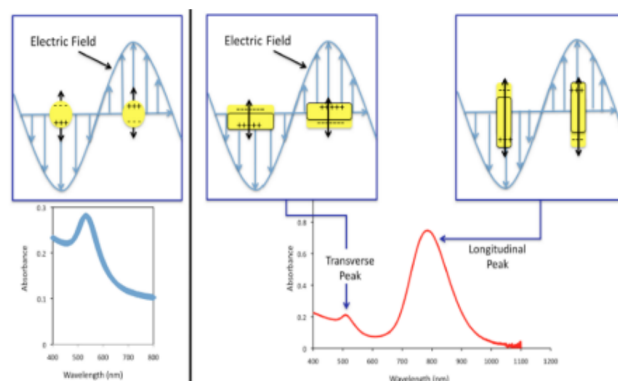
### 2.4.5. Efecto de la forma de las NPs.

Cuando las NPs agregan, lo hacen de forma totalmente aleatoria, por lo que la simulación de espectros para estos casos es compleja. Sin embargo, se puede hacer simulaciones de otras formas, como por ejemplo los nanorods, que es un caso donde las NPs pierden su simetría modificando su relación de aspecto. En la figura 2.4.8 (Eustis and El-Sayed (2006)) se puede observar una simulación que muestra los espectros que se pueden conseguir con distintas formas de NPs. Se puede ver que en los espectros de los nanorods aparece un segundo peak y que a medida que aumenta el largo de estos, el segundo peak tienen un corrimiento hacia el rojo. Estos peak tienen su explicación clásica considerando que las distintas orientaciones de los nanorods son los causantes de dos frecuencias de resonancia bien definidas, como se ve en la figura 2.4.9.

**Figura 2.4.8:** Comparación de los espectros de absorción para NPs de distintas formas



**Figura 2.4.9:** Espectro típico de NPs esféricas (izquierda), espectro típico de nanorods (derecha)



## 2.5. Nanobiosensores con nanopartículas de oro para la detección de antibióticos.

Se han publicado varios artículos que reportan el uso de nuevos NBS basados en nanopartículas de oro (AuNP) para la detección de antibióticos en la leche, [Emrani et al. \(2016\)](#); [Song et al. \(2012\)](#); [Ramezani et al. \(2015\)](#). También se reportó una exitosa detección múltiple de los antibióticos sulfadimetoxina, kanamicina y adenosina en leche utilizando un biosensor de aptámero de AuNP con detección colorimétrica visual para determinar los antibióticos en concentraciones de 100 – 500[ng/mL] [Niu et al. \(2014\)](#). En general, la investigación de vanguardia sobre biosensores para la detección de antibióticos calcula la concentración basándose en regresiones lineales simples de curvas de calibración. Sin embargo, el procesamiento y análisis de señales espectrales utilizando métodos matemáticos avanzados, como algoritmos de clasificación, son herramientas poderosas que pueden implementarse para mejorar la detección y los parámetros analíticos de NBS ópticos, [Donoso \(1996\)](#); [Schowengerdt \(2006\)](#).

# Capítulo 3

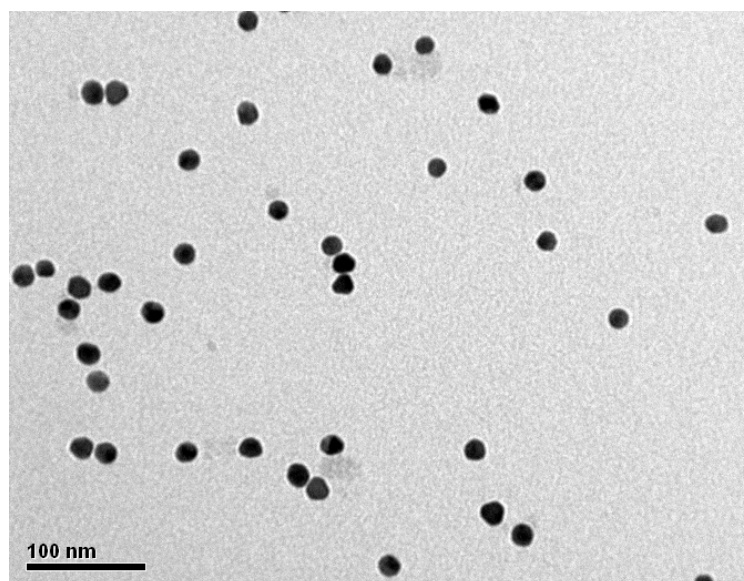
## Metodología

En este apartado se describen aspectos importantes de las metodologías que se implementan en este trabajo para realizar la detección de antibióticos en la leche cruda de vaca.



### 3.1. Nanobiosensores y antibióticos

Las NBS empleadas en este estudio son dispositivos que utilizan nanopartículas de oro (AuNP) y aptámeros que reconocen (detectan) específicamente los antibióticos seleccionados y permiten la agregación selectiva de las nanopartículas, que de otro modo sería un fenómeno espontáneo en solución acuosa. Las AuNP se sintetizaron utilizando el método de reducción de citrato, manteniendo el pH de síntesis entre 5,3 y 6,0, [Contreras-Trigo et al. \(2018\)](#). En este documento, los AuNP se funcionalizaron con 30 aptámeros de tiol-ADN, [Hill and Mirkin \(2006\)](#), de acuerdo con las condiciones experimentales previamente optimizadas en nuestro laboratorio. Se emplearon las siguientes relaciones molares (AuNP: aptámeros) para cada antibiótico seleccionado para la síntesis de NBS: (i) NBS para kanamicina, 1:60; (ii) NBS para ampicilina, 1:20; (iii) NBS para oxitetraciclina, 1:20 y (iv) NBS para sulfadimetoxina, 1:20. Es importante mencionar que estas relaciones molares fueron determinadas luego de sucesivas pruebas hechas en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería y Tecnología de Universidad San Sebastián. Dichas pruebas están descritas con mayor detalle en el anexo 3. Se muestran imágenes obtenidas con microscopía electrónica de transmisión de AuNP sintetizadas, incluidas las no agregadas (Figura 3.1.1) y



**Figura 3.1.1:** Imagen microscópica de nanopartículas de oro no agregadas. Estas imágenes fueron obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión para caracterización visual y morfológica (Microscopio JEOL JEM 1200EX II, Laboratorio de Microscopía Electrónica, Universidad de Concepción).

agregadas (Figura 3.1.2). Los espectros de absorción correspondientes se muestran en la Figura 3.1.3, destacando el cambio de máximo típico asociado a la agregación de AuNP (línea morada).

## 3.2. Leche, una matriz compleja

Es un fluido heterogéneo contenido en fases multidispersas de emulsión (grasa-agua), suspensión coloidal (proteína-agua) y solución (sales-agua). Las muestras se prepararon antes de aplicar cualquier análisis NBS, utilizando leche cruda que fue facilitada por la empresa Leches del Bio-Bio SA. Así, primero se agregaron a las muestras los antibióticos Kanamicina, Ampicilina, Oxitetraciclina y Sulfadimetoxina en concentraciones de 0,25, 0,5, 1, 1,5 y 2 veces el LMR, según la normativa chilena en 2019, MINSAL (2019). También se elaboraron muestras de control (0 veces MRL o 0[ppb]). Tras la adición de los antibióticos, la leche se homogeneizó durante 30[*min*] a temperatura ambiente (15 – 25°C), Song et al. (2011); Kim et al. (2014). En principio se intentó hacer la detección sin procesar la leche contaminada a pesar de la alta densidad óptica de las muestras. Como era de



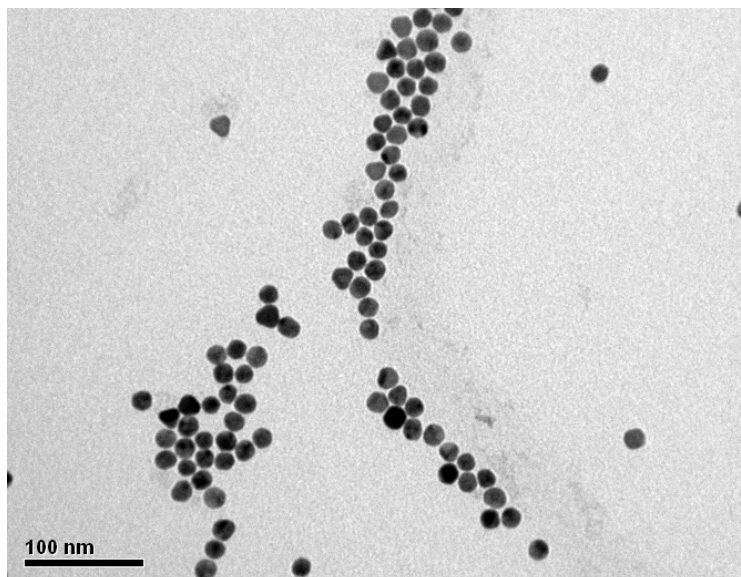


Figura 3.1.2: Imagen microscópica de nanopartículas de oro agregadas

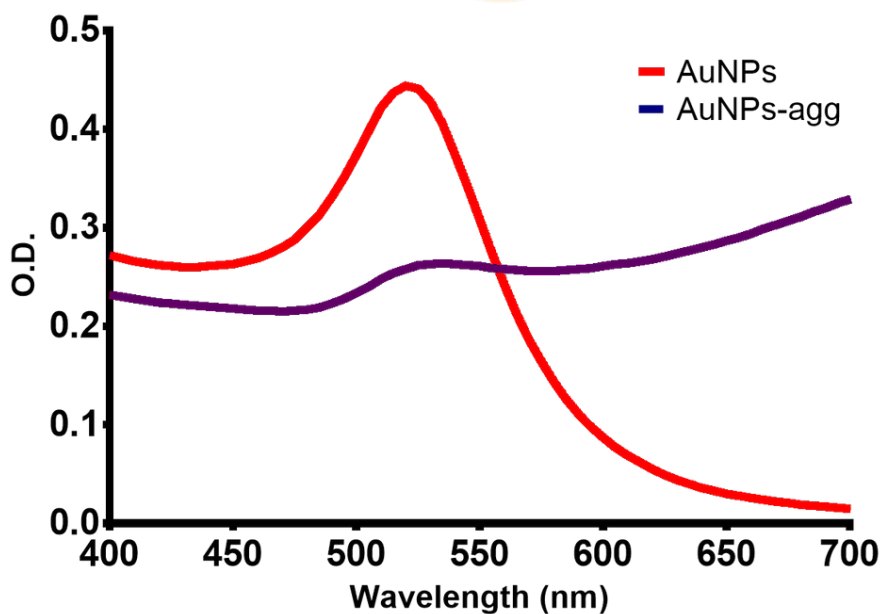


Figura 3.1.3: Espectro de absorción de AuNP agregados y no agregados. Cuando se produce la agregación, se produce un cambio en el peak de intensidad del espectro de absorción con el correspondiente cambio colorimétrico.

esperarse, la densidad óptica de las muestras crudas era demasiado alta como para permitir la detección. Fue así que se tomó la decisión de procesar la leche para disminuir su densidad óptica. Se obtuvo una leche clarificada eliminando los lípidos y las proteínas del fluido utilizando un kit comercial de reactivos de clarificación para la preparación de muestras en el análisis de alimentos (método Carrez), Carrez (1909), según las instrucciones del fabricante (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Este proceso por si solo, tampoco tuvo resultados satisfactorios. Frecuentemente, se obtenían importantes cambios en los espectros de las muestras que no tenían antibióticos, es decir, los NBS agregaban sin presencia de analito. La situación anterior llevó a diseñar experimentos para analizar la actividad de los NBS en presencia de los componentes remanentes de la leche luego del primer procesamiento carrez. El experimento consistió en generar diferentes soluciones de leche artificial siguiendo concentraciones de componentes de la literatura a partir de agua nanopura, iones como el calcio, fosfato, magnesio y fierro y el carbohidrato más abundante en la leche que es la lactosa. Estas pruebas están descritas en el anexo 5. Los resultados de estas pruebas mostraron que el calcio tenía el doble de actividad reveladora que el sodio, ya que para la misma concentración de ambos iones, el calcio posee el doble de equivalentes al tratarse de un catión divalente, a diferencia del sodio que solo posee una carga positiva. Frente a estos resultados, se tomó la decisión de agregar un segundo procesamiento a la leche, en la cual se eliminaran los cationes residuales, para así evitar la agregación espontánea de los NBS en ausencia de antibióticos.

Los cationes residuales se eliminaron adicionalmente tratando la leche clarificada (1,5[mL]) con 80 $\mu$ L de  $HCO_3$  0,6 M y se incubaron a 60°C durante 10[*min*]. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente, luego se centrifugaron a 20,000  $\times g$  durante 10[*min*] y el sobrenadante resultante se recuperó para los experimentos de NBS. Para generar bases de datos espectrales de absorción, se realizaron pruebas en placas de 96 pocillos de leche clarificada con las concentraciones antes mencionadas para los cuatro antibióticos seleccionados. Finalmente, las NBS se agregaron a la leche clarificada y se incorporó NaCl para desencadenar la agregación de las AuNP (agente revelador).

### 3.3. Adquisición y procesamiento espectral

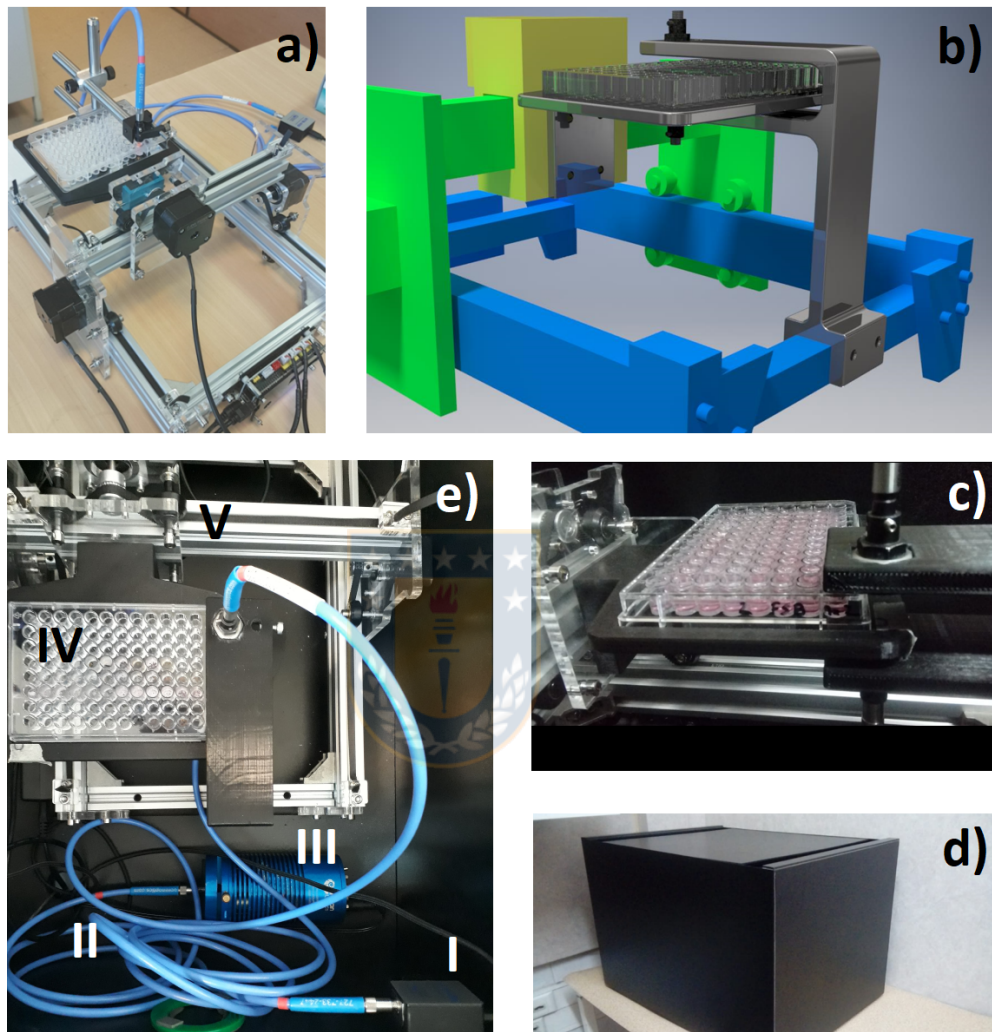
En esta sección se describe un prototipo electro-opto-mecánico integrado que adquiere los espectros de las muestras individuales en la microplaca, procesa los datos y correlaciona el espectro medido con la concentración del antibiótico medido.

#### 3.3.1. Hardware y software

El hardware del prototipo se muestra en la Figura 3.3.1. Los componentes del prototipo son un espectrómetro Ocean Optics STS VIS-NIR, dos fibras ópticas P600 -025-UV-VIS de Ocean Optics, una fuente de luz halógena de tungsteno de alta potencia (360 –2400 nm) Ocean Optics HL-2000-HP-FHSA, placa de 96 pocillos para colocar las muestras a medir con su soporte a medida, y platina electromecánica de alta precisión controlada por software. El prototipo de laboratorio se muestra en la Figura 3.3.1a, el cual incluye varios elementos móviles que tuvieron que ajustarse para alinear los componentes ópticos. La Figura 3.3.1b-e presenta el diseño y la fabricación industrial de las piezas para aumentar la robustez del dispositivo para aplicaciones en terreno.

El software de adquisición y control de datos se desarrolló en LabView. Este permite definir los pocillos a medir y la posición de la muestra de referencia. Para iniciar las mediciones, el sistema optomecánico mueve la microplaca de 96 pocillos para alinear correctamente el microreactor de referencia con los instrumentos y se cubren los pozos definidos por el usuario. Posteriormente se enciende la fuente de luz y se adquiere el espectro de transmisión resultante para cada muestra.

Se define la radiación incidente generada por la fuente de luz como  $P_0(\lambda)$ , la máxima radiación transmitida de un microreactor como  $P(\lambda)$  y la radiación transmitida (transmitancia) de un pocillo como  $T_{total}(\lambda) = \frac{P(\lambda)}{P_0(\lambda)}$ . La absorbancia total se calcula como el logaritmo natural de la transmitancia como sigue  $A_{total}(\lambda) = \ln \frac{P_0(\lambda)}{P(\lambda)}$ . La absorbancia total está compuesta por la absorbancia de la microplaca de plástico,  $A_{mp}(\lambda)$ , la absorbancia del agua que contiene el NBS,  $A_{wp}(\lambda)$  y la absorbancia del NBS,  $A_{nb}(\lambda)$ . De este modo, medir la señal de interés (la absorbancia del NBS), se requiere una medición de referencia de las NPs funcionalizadas puros disueltos en la misma agua purificada que se usa en la leche contaminada. Por tanto, la absorbancia de referencia medida en uno de los pocillos,  $A_{ref} = A_{mp} + A_{wp}$  se



**Figura 3.3.1:** Etapas de desarrollo del dispositivo propuesto. a) Primer prototipo de laboratorio; (b) diseño industrial para abordar los inconvenientes del prototipo de laboratorio; (c) microrreactores y colimadores ópticos; (d) contenedor prototipo y (e) componentes internos clave: (I) un espectrómetro Ocean Optics STS VIS-NIR, (II) fibras ópticas P600 que transmiten desde el espectro ultravioleta al visible, (III) un Ocean Optics HL-2000- Fuente de luz HP-FHSA, (IV) placas de 96 pocillos para colocar las muestras a medir y (V) una unidad de desplazamiento bidimensional de alta precisión para mover la microplaca y colocar la muestra a medir debajo del radiómetro.

puede obtener simplemente mediante la sustracción de la absorbancia total  $A_{total}$  para obtener la absorbancia generada por el efecto plasmónico de los NBS. La figura 3.3.2 explica como se realiza esta medición.

Para reducir el efecto de las variaciones espectrales de las muestras causadas por una pequeña desalineación óptica, burbujas de muestra y perturbaciones vibratorias, el sistema de adquisición realiza múltiples mediciones de absorbancia para cada pocillo y promedia los espectros para registrarlos de forma más estable.

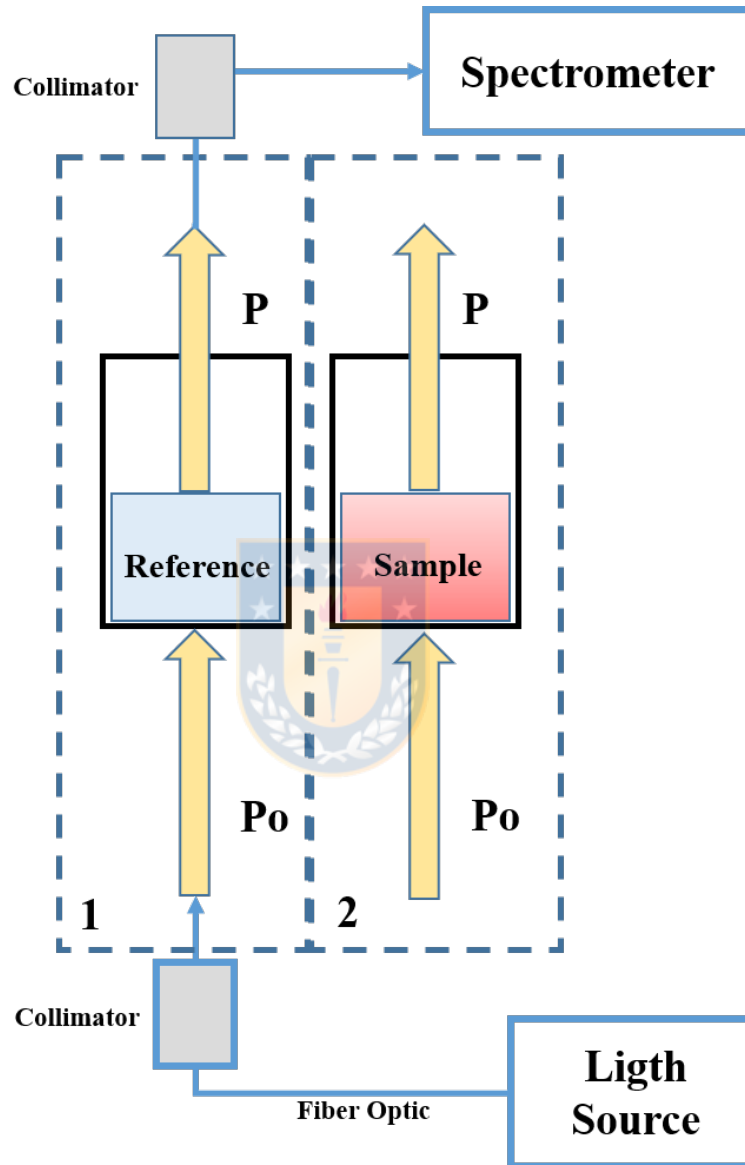
### 3.4. Algoritmo de detección de antibióticos

En esta sección, se explica cómo se procesaron los datos obtenidos de cada uno de los cuatro antibióticos. Se obtuvieron múltiples mediciones para cada fracción de las concentraciones de LMR, como se muestra más adelante. A continuación, se explica el procedimiento empleado para correlacionar estos espectros medidos con la concentración de antibióticos.

#### 3.4.1. Reducción de la dimensionalidad de la señal

Se diseñó el algoritmo para detectar la presencia de antibióticos en leche cruda asumiendo que los espectros medidos son señales deterministas en ruido. Dicho espectro de absorción puede describirse mediante la combinación lineal de funciones de espectro continuo conocidas, con coeficientes desconocidos. Los espectros de absorción medidos  $r_j(\lambda)$  pueden ser redefinidos como  $r_j(\lambda) \approx \hat{r}_j(\lambda) = \sum_{n=1}^N \alpha_{j,n} P_n(\lambda)$ , donde el subíndice  $j$  corresponde al  $j$ -ésimo antibiótico a ser detectado, es decir,  $j = 1, 2, 3, 4$ ,  $P_n(\lambda)$  son las funciones de expansión de espectro continuo conocidas y  $\alpha_{j,n}$  son los coeficientes de expansión desconocidos que deben determinarse. Para el propósito de este trabajo, se usaron las funciones de Legendre del primer tipo como funciones de expansión de espectro continuo para todos los espectros medidos. Proyectando cada espectro medido  $r_j$ , con  $j = 1, 2, \dots$  en un conjunto de las primeras  $N$  funciones de expansión por  $\alpha_{j,n} = \langle r_j(\lambda), P_n(\lambda) \rangle = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} r_j(\lambda) P_n(\lambda) d\lambda$ , donde  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son la mínima y máxima longitud de onda capturada por el espectrómetro VIS-NIR. Usando la aproximación  $\hat{r}_j(\lambda)$  como se indica con estos coeficientes de expansión, se asegura que  $\hat{r}_j$  es la aproximación óptima de  $r_j$  con respecto al error cuadrático medio.

En la Figura 3.4.1, se muestra cómo el número de funciones base, utilizadas



**Figura 3.3.2:** Diagrama de bloques del sistema óptico de adquisición de datos. En primer lugar, se mide un pozo de referencia para estimar el espectro agregado del contenedor, el agua y el NBS disuelto. Los datos de referencia son almacenados por el software desarrollado. En segundo lugar, cada muestra se mide de la misma manera y la absorbancia NBS se obtiene restando la referencia de la absorbancia de la muestra.

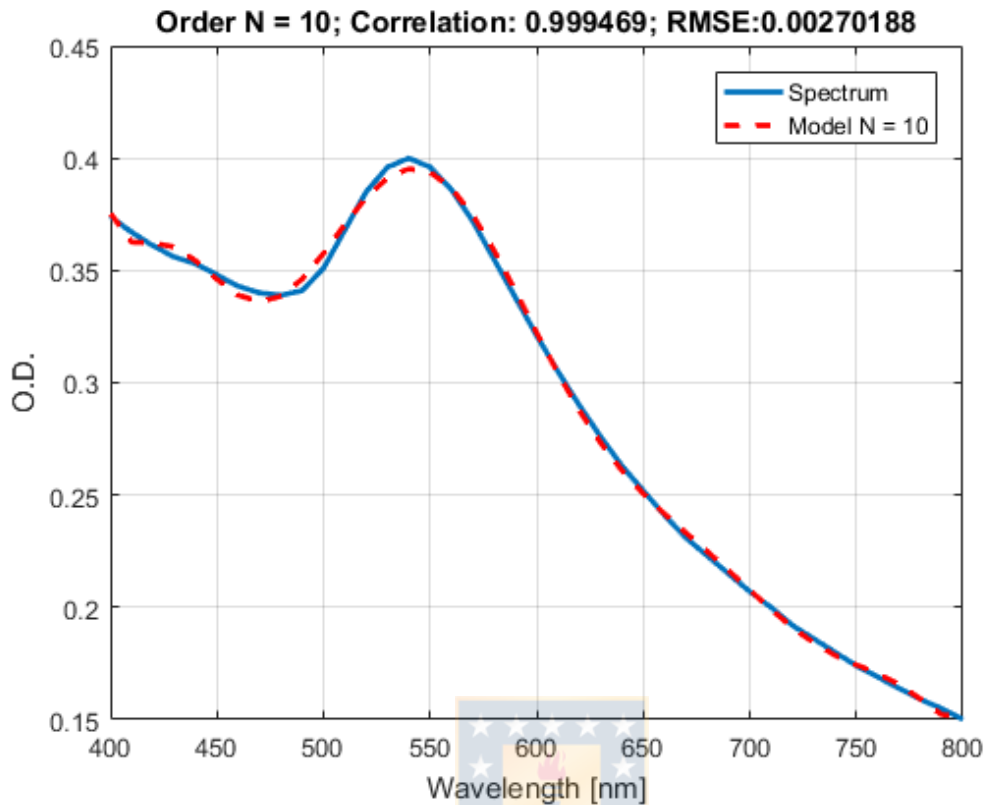
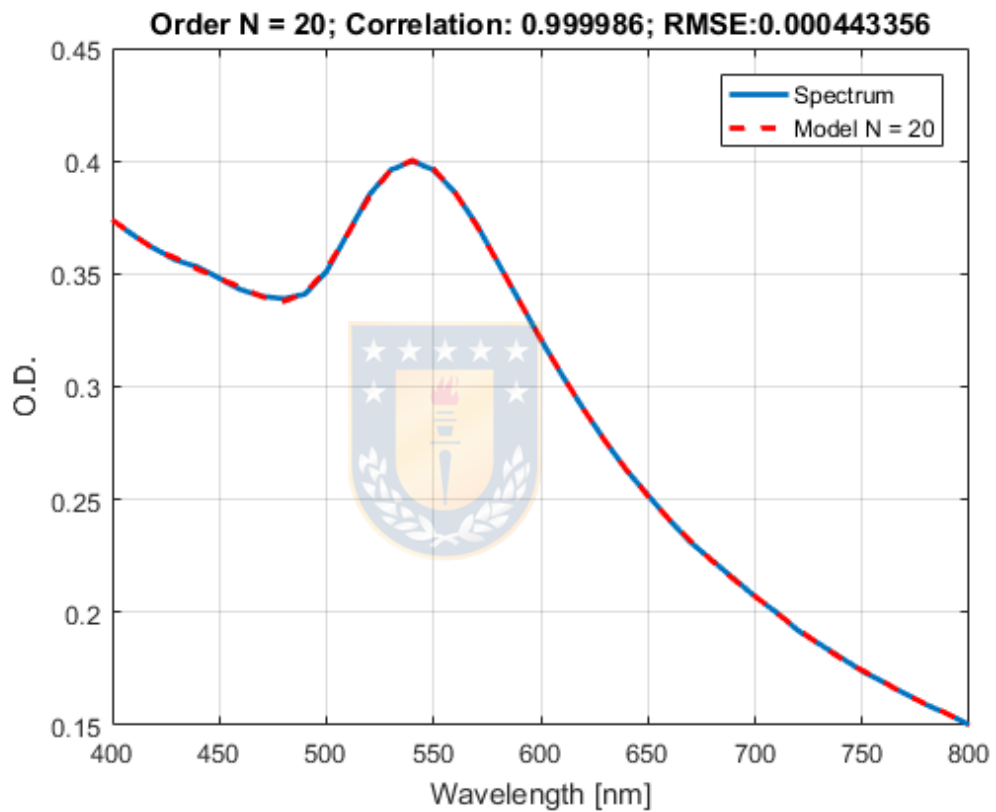


Figura 3.4.1: Polinomio orden 10.

para sintetizar  $r_j$ , mejora el ajuste de las curvas. La línea azul representa un espectro de absorción medido de Kanamicina  $r_j$  y la línea roja es la aproximación correspondiente  $\hat{r}_j$  ya que el número de funciones básicas cambia de  $N = 1$  (ver Figura 3.4.1a), hasta  $N = 20$  (ver Figura 3.4.2b).

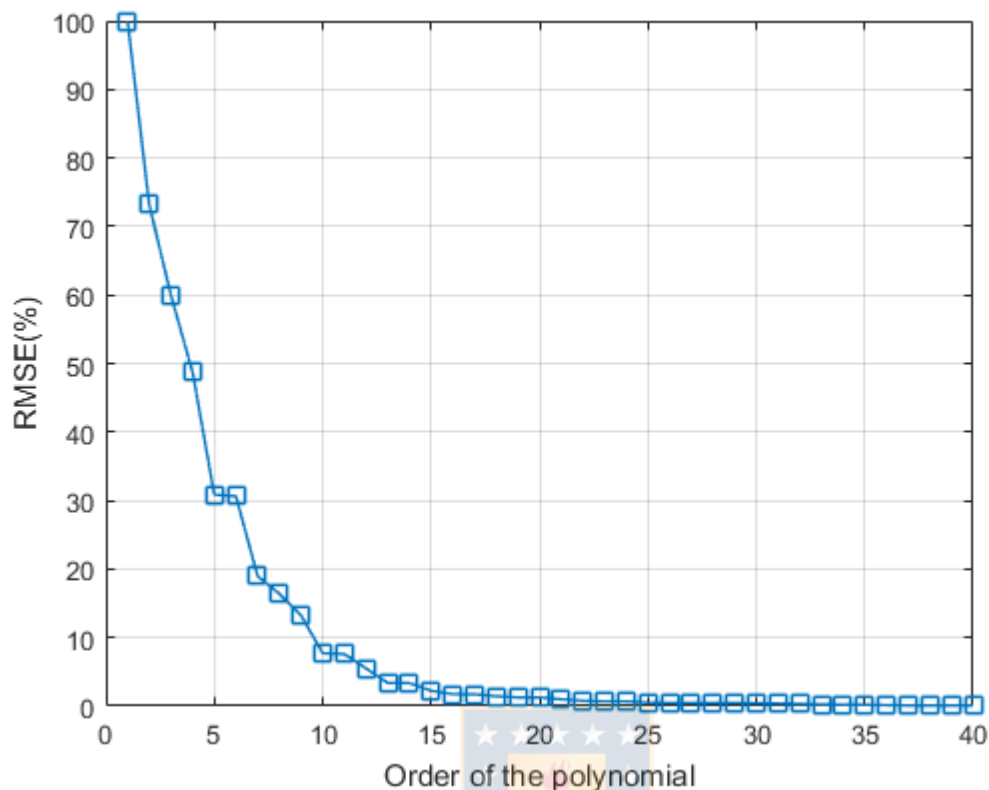
Utilizando el error cuadrático medio entre  $r_j$  y  $\hat{r}_j$  como métrica del ajuste, se determinó que se requieren  $N = 20$  funciones de Legendre para garantizar un RMSE por debajo del 1% en todas las concentraciones posibles de todos los antibióticos utilizados en este trabajo. Para ilustrar esto, en la Figura 3.4.3 se representa el efecto sobre el RMSE al agregar más funciones de base en la aproximación de una familia de espectros medidos para Kanamicina.

Ahora se puede considerar que se requieren  $N = 20$  funciones básicas para ajustar de manera óptima todos los espectros medidos para todos los antibióticos usados con un error de raíz cuadrada media máxima (RMSE) del 1%. Estas funciones son la base del espacio de espectros de absorción. Luego, para cada espectro de absorción medido, el mejor ajuste se realiza utilizando las primeras veinte funciones de Legendre y los coeficientes se consideran como la representación de la



**Figura 3.4.2:** Polinomio orden 20. Ajuste del espectro de absorción medido  $r_j(\lambda)$  mediante funciones de Legendre del primer tipo. A medida que aumenta el número de funciones básicas, mejor es el ajuste de la aproximación  $\hat{r}_j(\lambda)$ . La aproximación se muestra con (a) diez funciones de base y (b) veinte funciones de base.





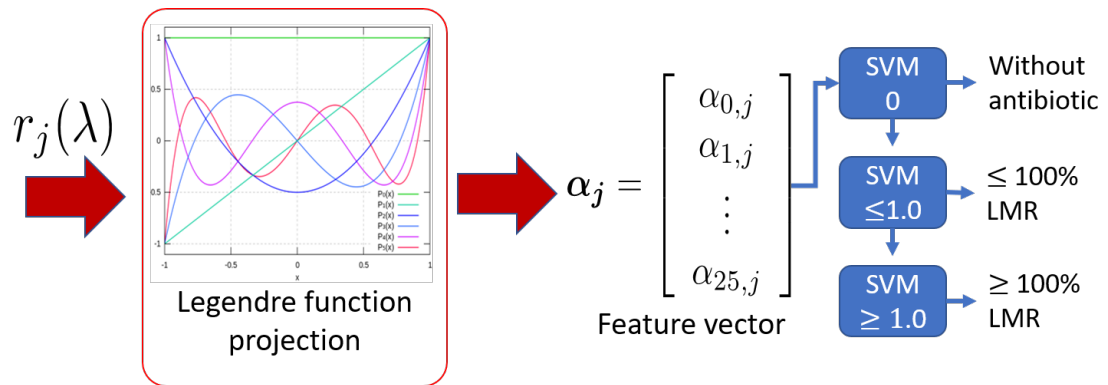
**Figura 3.4.3:** Error cuadrático medio (RMSE) del ajuste entre el espectro de absorción medido  $r_j(\lambda)$  y la aproximación realizada con las funciones de Legendre  $\hat{r}_j(\lambda)$  para la kanamicina. Se requieren  $N = 20$  funciones base para asegurar un RMSE por debajo del 1%.

señal del espectro en este nuevo espacio. Entonces, el  $j$ -ésimo espectro de absorción  $r_j(\lambda)$  dentro del conjunto de datos disponibles se representa simplemente por sus correspondientes coeficientes de expansión  $\alpha = [\alpha_{j,1} \alpha_{j,2} \dots \alpha_{j,20}]^T$

Esto implica una reducción dimensional significativa a costa de poseer cada uno de los espectros adquiridos. Asimismo, las curvas ya no estarán representadas por espectros de alta resolución sino por solo 20 coeficientes de expansión (sumando 20[ms] al tiempo de procesamiento). Lo que se postula en con estos resultados, es que la correlación entre el espectro medido y la concentración de cada antibiótico se puede realizar con éxito sobre los coeficientes de expansión.

### 3.4.2. Diseño del algoritmo de detección de antibióticos.

Para el propósito de este trabajo, se emplearon clasificadores de Support Vector Machine (SVM) para determinar la presencia y el nivel de concentración de antibióticos para un espectro dado. De acuerdo con la normativa chilena, se



**Figura 3.4.4:** El espectro medido a partir de una muestra  $r_j$  con presencia de antibiótico y nivel de concentración desconocidos ingresa al algoritmo. El esquema Support Vector Machine (SVM) determina si un antibiótico está presente o no. Si el antibiótico está presente en la muestra, el árbol se conecta en cascada hasta que uno de los SVM considera que la concentración de antibiótico es cero o no, luego si está por sobre o por debajo del LMR.

definieron tres clasificadores: uno para determinar si la muestra tiene antibiótico o no (SVM 0), uno para determinar si la muestra tiene antibiótico con una concentración por debajo del LMR (SVM  $\leq 1,0$ ) y otro para determinar si la muestra tiene una concentración de antibiótico superior al LMR (SVM  $\geq 1,0$ ). En la Figura 3.4.4, se puede ver el esquema de clasificación. El espectro medido con concentración de antibiótico desconocida  $r_j$  ingresa al algoritmo a partir del cual se calculan los coeficientes de expansión  $\alpha_j$ . Estos coeficientes se utilizan para inferir la concentración entre las clases antes mencionadas: la muestra no tiene antibiótico, la muestra tiene antibiótico con concentración por debajo o por encima del LMR.

La concentración asignada a cada espectro corresponde a la mayoría determinada a través de la salida de cada uno de los clasificadores. Esto se conoce en la literatura como un árbol de decisiones one-against-all con una regla de decisión mayoritaria, o, el ganador se lo lleva todo.

### 3.5. Descripción de base de datos.

Para entrenar los algoritmos que determinan la presencia y el nivel de concentración de los diferentes antibióticos, se utilizaron los espectros de absorción de la leche clarificada. Las NBS para cada antibiótico se incubaron en leche clarificada

contaminada con diferentes concentraciones de antibióticos, es decir, 0[ppb] de antibiótico (leche sin antibiótico), 25 % del LMR, 50 % del LMR, el LMR real del antibiótico, 150 % del LMR y 200 % del LMR. Se entiende que si la concentración de un antibiótico es superior al LMR, entonces la leche cruda no cumple con las regulaciones legales.

Para cada una de las concentraciones mencionadas, se realizaron varios experimentos y se midieron los correspondientes espectros de absorción. Se generaron 60 muestras por antibiótico que contenían 5 niveles de concentración. Cada uno de estos experimentos requirió el proceso completo de construcción de NBS, la contaminación de la leche cruda con cada antibiótico a la concentración dada, la clarificación de la leche cruda contaminada, la reducción de interferencias y la adquisición de los espectros de absorbancia por el instrumento incorporado.

En las Figuras 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3 y 3.5.4 se pueden ver los espectros de absorción medidos para los cuatro antibióticos utilizados en este trabajo. Cabe señalar que no es posible discriminar simplemente las diferencias de color mediante inspección visual, especialmente debido a las variaciones observadas en el espectro medido para cada repetición. Para ilustrar esto, el espectro medido para la kanamicina se muestra en la Figura 3.5.1. Las curvas de color púrpura representan el espectro medido cuando la concentración de kanamicina es el LMR real (150[ppb]). Se puede observar que el espectro para cada repetición difiere significativamente entre sí, a pesar de que la concentración de antibióticos es la misma. Además, en algunos casos los espectros se superponen a las repeticiones de otras concentraciones del antibiótico.

Las razones de que los espectros presenten este comportamiento pueden tener que ver con las bajas concentraciones que se están intentando determinar, sumado a la serie de interferentes que posee la matriz de la leche (cationes con equivalentes funcionales similares al agente revelador de la reacción, el sodio). Debido a lo anterior, es que se recurrió a herramientas matemáticas mencionadas en esta sección, con fin de mejorar los resultados de la clasificación que usualmente se hace mediante inspección visual, curvas de calibración de características como el ratio 620/520, que frecuentemente no son capaces de diferenciar las concentraciones de antibióticos por debajo de ciertos límites de detección que son descritos secciones posteriores.

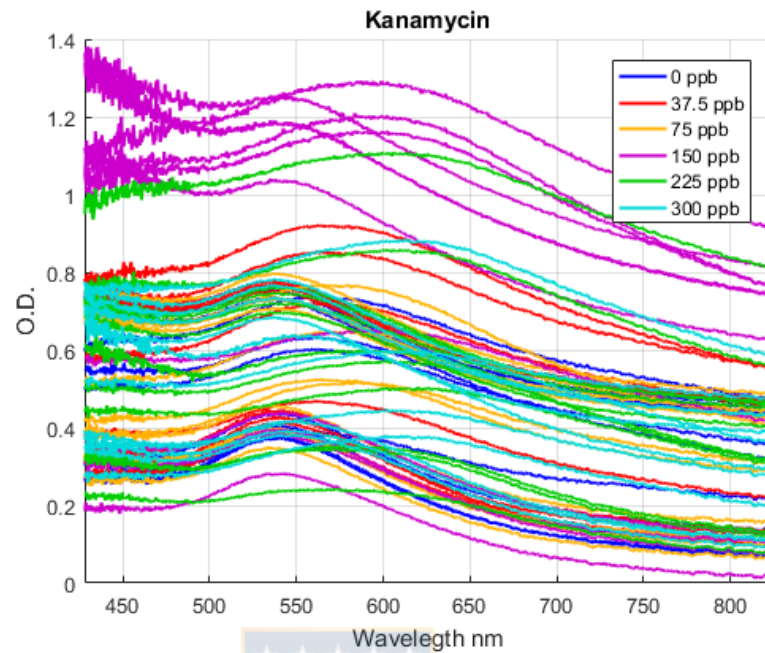


Figura 3.5.1: Kanamicina

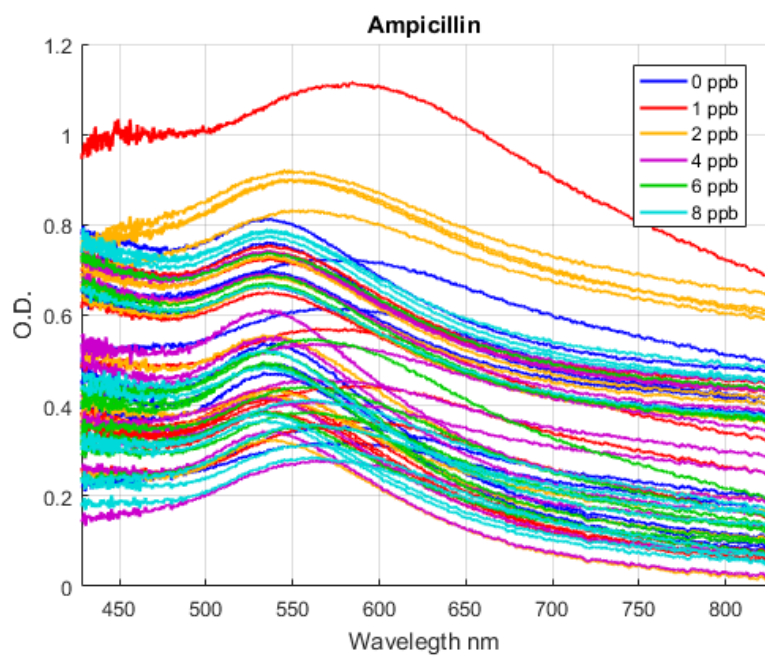


Figura 3.5.2: Ampicilina

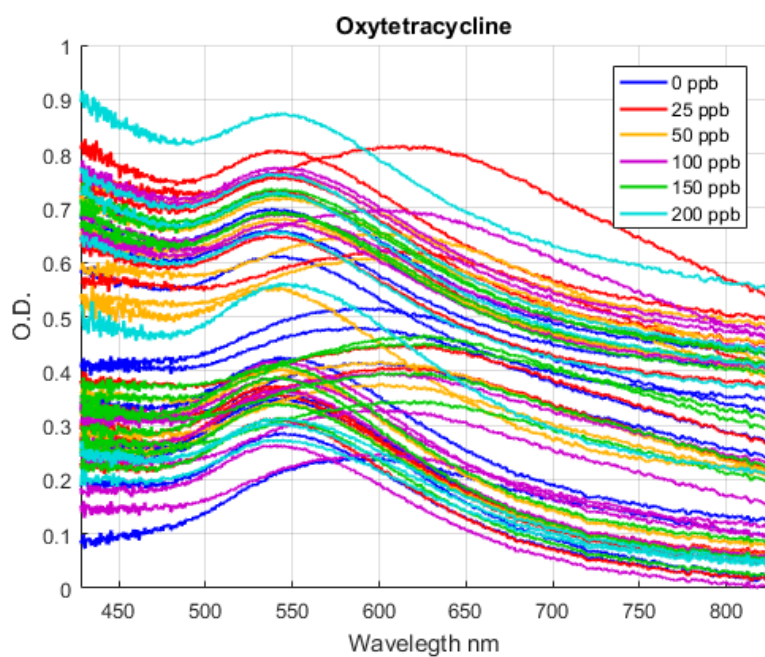
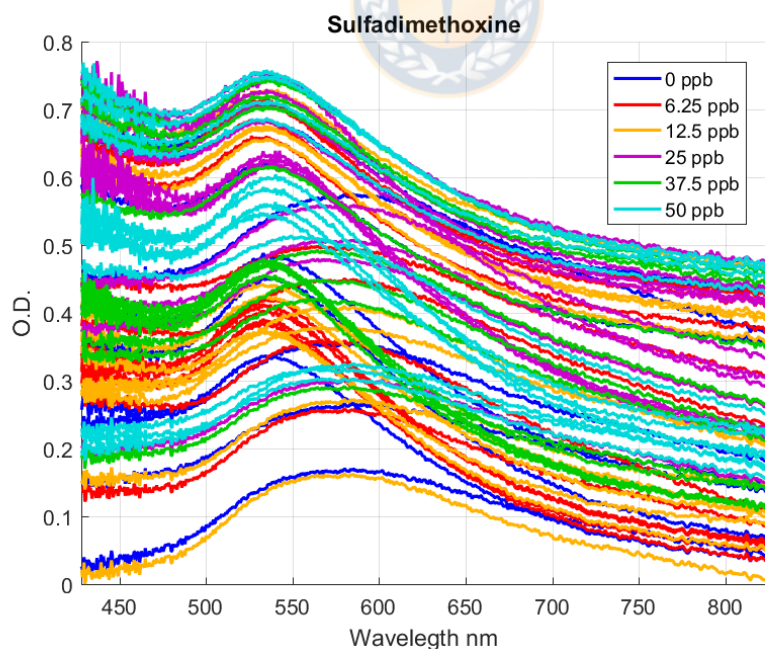


Figura 3.5.3: Oxitocina



**Figura 3.5.4:** Sulfadimetoxina. Espectros de absorción medidos para los cuatro antibióticos utilizados en este trabajo. Se muestran las repeticiones disponibles para cada antibiótico y cada una de las concentraciones. Aunque las curvas muestran separabilidad, no es posible estimar concentraciones mediante inspección visual.

## Capítulo 4

### Análisis

A partir de los resultados presentes, considerando una clasificación con una tasa de éxito del 100 % y que las NBS se desarrollaron específicamente para interactuar con cada antibiótico individual, se determina que la especificidad de las NBS es del 100 %, por diseño, para todos los antibióticos. La especificidad del algoritmo para estimar diferentes concentraciones fue del 100 % para Kanamicina, 99,12 % para Ampicilina, 91,67 % para Oxitetraciclina y 99,17 % para Sulfadimetoxina. Para la kanamicina, la sensibilidad alcanzada fue del 100 %. Para la ampicilina, la sensibilidad máxima alcanzada fue del 95,65 %, con una media del 88,83 %. Para la oxitetraciclina, la sensibilidad máxima alcanzada fue del 91,67 %, con una media del 88,33 %. Finalmente, para la Sulfadimetoxina, la máxima sensibilidad obtenida fue del 95,83 %, con una media del 91,48 %. El rango lineal de todos los clasificadores es 0 veces el LMR hasta 2 veces el LMR. Para todos los antibióticos, el límite de detección fue 0,25 veces el LMR, correspondiente a 37,5[ppb] para kanamicina, 1[ppb] para ampicilina, 25[ppb] para oxitetraciclina y 6,25[ppb] para sulfadimetoxina, ver Tabla 4.0.1. Se debe tener en cuenta que los mejores resultados obtenidos son para kanamicina ya que su respuesta óptica muestra mayor separación en partes importantes de la banda espectral que para la respuesta óptica de otros antibióticos, ver las Figuras 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3 y 3.5.4.

Los datos se analizaron mediante la metodología estándar para comparar los resultados (una descripción detallada se puede encontrar en Li et al. (2011)). Las métricas tradicionales elegidas fueron las relaciones de absorbancia  $A_{520}/A_{620}$ ,  $A_{520}/A_{720}$  y la absorbancia mínima sobre la máxima  $A_{min}/A_{max}$ . El límite de

detección se puede obtener de las curvas de calibración. Para esta base de datos se obtuvieron los siguientes resultados: (i) para Kanamicina se obtuvo el mejor resultado para la relación  $A_{520}/A_{620}$  y su límite de detección fue de 170, 93[ppb]; (ii) para Ampicilina el mejor resultado fue también para la relación  $A_{520}/A_{620}$  y su límite de detección fue 2, 977[ppb]; (iii) para la oxitetraciclina, el mejor resultado también fue para la relación  $A_{520}/A_{620}$  y su límite de detección fue de 232, 95[ppb], (iv) para la sulfadimetoxina, el mejor resultado fue para la relación  $A_{min}/A_{max}$  y su límite de detección fue 44, 66[ppb].

**Cuadro 4.0.1:** Tasa de precisión, resultados de validación cruzada SVM (uno contra todos) para 20 coeficientes de expansión. Se muestra la tasa promedio obtenida para la validación cruzada, repitiendo el entrenamiento con todas las combinaciones de los diferentes conjuntos.

Antibiótico	n	Tasa promedio	0 MLR	1 MLR	2 MLR
Kanamicina	1	100.00 %	87.75 %	100.00 %	75.00 %
	2	100.00 %	87.75 %	100.00 %	100.00 %
	3	100.00 %	87.75 %	100.00 %	100.00 %
Ampicilina	1	87.50 %	83.33 %	83.33 %	75.00 %
	2	83.33 %	83.33 %	83.33 %	87.50 %
	3	95.65 %	86.96 %	83.33 %	75.00 %
Oxitetraciclina	1	90.00 %	95.83 %	100.00 %	100.00 %
	2	83.33 %	80.00 %	67.67 %	100.00 %
	3	91.67 %	83.33 %	60.00 %	100.00 %
Sulfadimetoxina	1	91.67 %	91.67 %	71.67 %	62.50 %
	2	86.96 %	86.96 %	66.67 %	75.00 %
	3	95.83 %	87.50 %	100.00 %	100.00 %

## Capítulo 5

### Discusión

Finalmente, estos resultados ofrecen información sobre la capacidad de la tecnología para proporcionar análisis confirmatorios para pruebas de detección que se aplican de forma rutinaria en terreno (campo, sector productivo) para la detección rápida de residuos de antibióticos en la leche cruda (por ejemplo, kits Delvotest<sup>®</sup> y Charm<sup>®</sup>). Estos kits permiten realizar mediciones directas en muestras de leche cruda (a menudo evitando el preprocesamiento), pero son menos específicos (detectan grupos/familias de antibióticos) y proporcionan resultados semicuantitativos. Por ejemplo, la tecnología Charm<sup>®</sup> Rapid One Step Assay (ROSA) es ampliamente aplicada por la industria láctea, ya que cumple con el requisito de MRL de la UE de 100[ppb] para medicamentos de tetraciclina, un nivel que la mayoría de los países han adoptado en sus reglamentaciones lácteas. En este documento, se ha reportado para la oxitetraciclina un límite de detección de 0,25 veces el LMR (es decir, 25[ppb]), superando las pruebas de detección. A pesar de que el proceso requiere un tratamiento preanalítico de la leche cruda (similar a los métodos de HPLC), el análisis sigue siendo rápido (30 min) y la tecnología de sensores es prometedora para aplicaciones portátiles “en terreno”.

Sin lugar a dudas, una de las mayores dificultades a las que se vió enfrentado el equipo de investigadores que desarrolló este proyecto, fue la complejidad de la matriz de la leche. Si bien los aptámeros utilizados en el proceso tienen alta especificidad, ha quedado demostrado que los NBS sintetizados pueden verse alterados por la presencia de cationes presentes en la matriz con actividad similar a los agentes reveladores. Dentro de las soluciones implementadas para evitar



la interferencia de estas sustancias, se establecieron 2 preprocesamientos de las muestras de leche cruda. Una para eliminar principalmente lípidos con el fin de disminuir la densidad óptica de las muestras y otra para eliminar iones remanentes que pudieran interferir en el mecanismo de detección. Hasta el momento se ignora la cantidad de antibiótico que podría perderse en el proceso, y para hacer una medición aun más precisa, es necesario caracterizar dicha pérdida para corregir. Viendo la situación desde ese punto de vista, se puede inferir que quizá los límites de detección alcanzados con esta técnica puedan ser aun menores. Otra idea interesante que surgió durante el proyecto y que no se llevó a cabo, es la posibilidad de extraer el antibiótico mediante una técnica que utiliza una membrana selectiva y osmosis para extraer el antibiótico de las muestras de leche, de forma que se obtuvieran muestras de antibióticos disueltas en agua sin interferentes (la técnica de detección de estos antibióticos en agua en general da muchos mejores resultados).



## Capítulo 6

### Conclusión

Esta tesis abordó la necesidad de desarrollar tecnología portátil para la detección sensible e "in situ" de residuos de antibióticos en la leche de vaca, antes de llegar a la cadena alimentaria. En consecuencia, se desarrolló e investigó un prototipo de sistema electro-opto-mecánico automático con la capacidad de medir la respuesta de absorción óptica de NBS específicos de antibióticos en múltiples muestras de leche clarificada. El prototipo se probó con éxito para la detección de kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina y sulfadimetoxina. Se desarrollaron clasificadores Support Vector Machine (SVM) eficaces para determinar la presencia y los niveles de concentración de los antibióticos, superando en sensibilidad las métricas típicas basadas en la relación de absorbancia. El algoritmo de clasificación basado en SVM permitió alcanzar un límite de detección de 0,25 veces el LMR, con un rango lineal de 0 a 2 veces el LMR para cada antibiótico. En general, esta tecnología ofrece una combinación de portabilidad y sensibilidad que respalda un mayor desarrollo en el campo del análisis confirmatorio para pruebas de detección aplicadas en granjas y diarios para detectar residuos de antibióticos en la leche cruda.

## Bibliografía

- ACHIPIA (2016). *Análisis de la normativa nacional, internacional y de los principales mercados de origen de los productos lácteos importados por Chile*. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.
- Ahmed, S., Ning, J., Cheng, G., Ahmad, I., Li, J., Mingyue, L., Qu, W., Iqbal, M., Shabbir, M., and Yuan, Z. (2017). Receptor-based screening assays for the detection of antibiotics residues—a review. *Talanta*, 166:176–186.
- Althaus, R., Torres, A., Montero, A., Balasch, S., and Molina, M. (2003). Detection limits of antimicrobials in ewe milk by delvotest photometric measurements. *Int. J. Dairy Sci.*, 86(2):457–463.
- Bennani, H., Mateus, A., Mays, N., Eastmure, E., Stärk, K. D., and Häsler, B. (2020). Overview of evidence of antimicrobial use and antimicrobial resistance in the food chain. *Antibiotics*, 9(2):49.
- Brito, R. B. d. and Junqueira, R. G. (2006). Determination of beta-lactam residues in milk by high performance liquid chromatography. *Brazilian archives of biology and technology*, 49:41–46.
- Carrez, C. (1909). Défécation du lait pour le dosage du lactose par les liqueurs cupriques. *Ann. Chim. anal. Rev. Chim. anal.*, 14:187.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., and Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends Anal. Chem.*, 29(9):1038–1049.
- Chen, Q., Wu, T. T., and Fang, M. (2013). Detecting local community structure in complex networks based on local degree central nodes. *Physica A.*, 392:529–537.
- Contreras-Trigo, B., Díaz-García, V., Guzmán-Gutierrez, E., Sanhueza, I., Coelho, P., Godoy, S., Torres, S., and Oyarzún, P. (2018). Slight ph fluctuations in the gold nanoparticle synthesis process influence the performance of the citrate reduction method. *Sensors*, 18(7):2246.
- Dapra, J., Lauridsen, L. H., Nielsen, A. T., and Rozlosnik, N. (2013). Comparative study on aptamers as recognition elements for antibiotics in a label-free all-polymer biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 43:315–320.

- Donoso, H. E. (1996). *Comparación de algoritmos de clasificación espectral en imágenes satelitales*. PhD thesis, Universidad de Concepción.
- Emrani, A. S., Danesh, N. M., Lavaee, P., Ramezani, M., Abnous, K., and Taghdisi, S. M. (2016). Colorimetric and fluorescence quenching aptasensors for detection of streptomycin in blood serum and milk based on double-stranded dna and gold nanoparticles. *Food Chem.*, 190:115–121.
- Eustis, S. and El-Sayed, M. A. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical society reviews*, 35(3):209–217.
- Friederici, M., Angurell, I., Rossell, O., Seco, M., and Muller, G. (2013). Exploring palladium nanoparticles protected with alkanethiolates functionalized with organometallic units as potential catalysts for sequential reactions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 376:7–12.
- García, M. A. (2011). Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(28):283001.
- Guo, X. (2012). Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. *J. Biophotonics*, 5(7):483–501.
- Gutiérrez, P., Godoy, S. E., Torres, S., Oyarzún, P., Sanhueza, I., Díaz-García, V., Contreras-Trigo, B., and Coelho, P. (2020). Improved antibiotic detection in raw milk using machine learning tools over the absorption spectra of a problem-specific nanobiosensor. *Sensors*, 20(16):4552.
- Hill, H. D. and Mirkin, C. A. (2006). The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using dtt-induced ligand exchange. *Nat. Protoc.*, 1(1):324.
- Hohenester, U. and Trügler, A. (2012). Mnpbem—a matlab toolbox for the simulation of plasmonic nanoparticles. *Computer Physics Communications*, 183(2):370–381.
- Jeong, S. and Rhee Paeng, I. (2012). Sensitivity and selectivity on aptamer-based assay: the determination of tetracycline residue in bovine milk. *Sci. World J.*, 2012.
- Kim, C.-H., Lee, L.-P., Min, J.-R., Lim, M.-W., and Jeong, S.-H. (2014). An indirect competitive assay-based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk. *Biosens. Bioelectron.*, 51:426–430.
- Kim, Y. S., Kim, J. H., Kim, I. A., Lee, S. J., Jurng, J., and Gu, M. B. (2010). A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4):1644–1649.
- Li, Y., Wu, P., Xu, H., Zhang, H., and Zhong, X. (2011). Anti-aggregation of gold

- nanoparticle-based colorimetric sensor for glutathione with excellent selectivity and sensitivity. *Analyst*, 136(1):196–200.
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., and Tordecilla, G. (2009). Detección de antibióticos en leches: un problema de salud pública. *Rev. salud pública*, 11:579–590.
- Mie, G. (1908). Sättigungsstrom und stromkurve einer schlecht leitenden flüssigkeit. *Annalen der Physik*, 331(8):597–614.
- MINSAL, C. (2019). Resolución exenta 1560, 11-sep-2019: Fija Límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos para consumo humano.
- Moudgil, P., Bedi, J. S., Aulakh, R. S., Gill, J. P. S., and Kumar, A. (2019). Validation of hplc multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk. *Food Anal. Methods*, 12(2):338–346.
- Nehl, C. L. and Hafner, J. H. (2008). Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 18(21):2415–2419.
- Nie, L., Liu, F., Ma, P., and Xiao, X. (2014). Applications of gold nanoparticles in optical biosensors. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 10(10):2700–2721.
- Niu, S., Lv, Z., Liu, J., Bai, W., Yang, S., and Chen, A. (2014). Colorimetric aptasensor using unmodified gold nanoparticles for homogeneous multiplex detection. *PLoS One*, 9(10):e109263.
- Ramezani, M., Danesh, N. M., Lavaee, P., Abnous, K., and Taghdisi, S. M. (2015). A novel colorimetric triple-helix molecular switch aptasensor for ultrasensitive detection of tetracycline. *Biosens. Bioelectron.*, 70:181–187.
- Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M. H., and Hussani, S. A. K. (2019). Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *J Adv Vet Anim Res*, 6(3):315.
- Schowengerdt, R. A. (2006). *Remote sensing: models and methods for image processing*. Elsevier, 3 edition.
- Shangguan, D., Tang, Z., Mallikaratchy, P., Xiao, Z., and Tan, W. (2007). Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines. *ChemBioChem*, 8(6):603–606.
- Song, K.-M., Cho, M., Jo, H., Min, K., Jeon, S. H., Kim, T., Han, M. S., Ku, J. K., and Ban, C. (2011). Gold nanoparticle-based colorimetric detection of kanamycin using a dna aptamer. *Anal. Biochem.*, 415(2):175–181.
- Song, K.-M., Jeong, E., Jeon, W., Cho, M., and Ban, C. (2012). Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence–colorimetric methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, 402(6):2153–2161.
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., Polachek, A. J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J. D., et al. (2017).

- Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet. Health*, 1(8):e316–e327.
- Unser, S., Bruzas, I., He, J., and Sagle, L. (2015). Localized surface plasmon resonance biosensing: current challenges and approaches. *Sensors*, 15(7):15684–15716.
- Verraes, C., Claeys, W., Cardoen, S., Daube, G., De Zutter, L., Imberechts, H., Dierick, K., and Herman, L. (2014). A review of the microbiological hazards of raw milk from animal species other than cows. *Int. Dairy J.*, 39(1):121–130.
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C., Senthilkumaran, B., and Prakash, H. (2016). Recent advances in biosensor technology for potential applications—an overview. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 4:11.



# Apéndice A

## Test

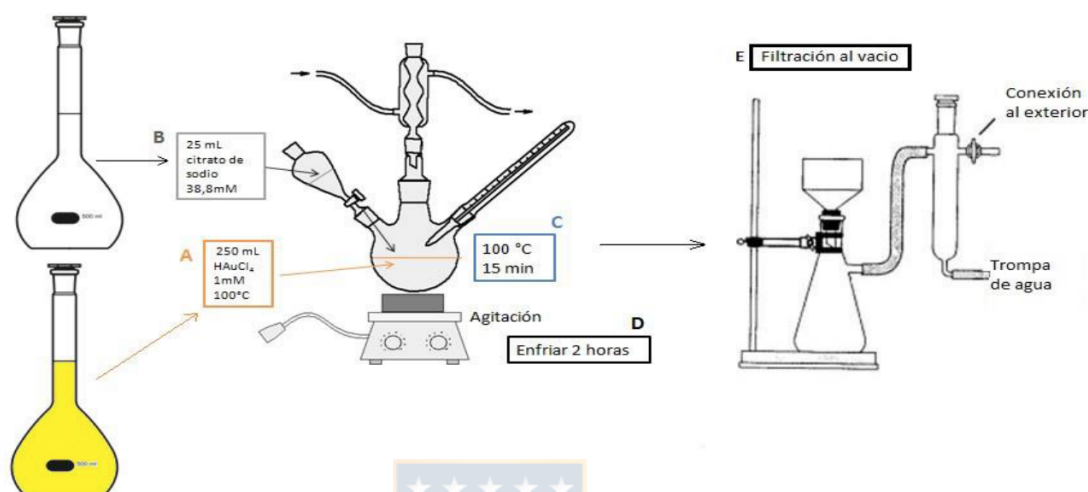
### A1. Anexo 1: Síntesis de Biosensor basado Nanopartículas de Oro y aptámeros.

#### A1.1. Síntesis de AuNPs

1. Preparación de material para síntesis de nanopartículas: El material utilizado debe estar limpio y libre de interferentes, para ello se deja en Extrán al 2% en agua destilada durante una noche, posteriormente se enjuaga con agua y se deja en agua regia (3 : 1HCl/HNO<sub>3</sub>) durante 30 minutos, para finalmente realizar enjuagues sucesivos en agua Milli-Q (18,2[MΩcm]). A su vez, todas las soluciones necesarias se prepararan en agua Milli-Q.
2. Síntesis de AuNPs: Se preparan 250[mL] de una solución acuosa 1[mM] de HAuCl<sub>4</sub> (Aldrich, pureza 99,9%, P.M. 339,79). Esta solución se coloca en un balón de dos cuellos de 500[mL]. Sobre su cuello central se conecta un sistema de reflujo simple y un septum en el cuello lateral. El balón se deja sobre un manto de calefacción con un agitador magnético incorporado para lograr una mezcla continua y se lleva a reflujo constante a ebullición durante 8[*min*]. Posteriormente se agrega rápidamente, por el cuello lateral del balón, 25[mL] de una solución acuosa 38,8[mM] de citrato de Sodio dihidratado (Merck, pureza 99,5%, P.M. 294,1) a 60°C. Luego de 3[*min*] solución se torna a un color rojo borgoña intenso, indicativo de la formación de las AuNPs. Posteriormente se deja el sistema a reflujo por 30 minutos

más y una vez terminado se deja enfriar el balón a temperatura ambiente. Finalmente, soluciones de AuNPs son filtrada mediante un filtro de Nylon de  $0,45\mu m$  y almacenadas a  $4^{\circ}C$ . Ver figura A1.1

**Figura A1.1:** Diagrama representativo del proceso de síntesis de AuNPs.



Modificaciones de pH en el proceso de síntesis son realizadas utilizando soluciones de NaOH  $0,5[Molar]$  (Merck).

3. Caracterización de AuNPs: Para la caracterización espectroscópica de las AuNPs sintetizadas se utiliza un lector de absorbancia de microplacas EPOCH (Biotek) (Figura A1.2). La caracterización de tamaño y carga de las AuNPs sintetizadas se realiza utilizando el sistema Zetasizer nano S90 light (Malvern Instruments Limited, UK), que permite determinar el diámetro de la nanopartícula por dispersión dinámica de la luz (DLS) y el potencial Zeta por electroforesis Doppler con láser. La caracterización del tamaño y morfología de las AuNPs se realiza por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el pH de la solución de síntesis es determinado mediante tiras reactivas indicadores de pH 4.0-7.0 (Merck). Finalmente la concentración molar de las soluciones de AuNPs fue determinada utilizando coeficiente de extinción molar de  $2,08 \times 10^8$ .



**Figura A1.2:** Equipos y software para caracterización espectroscópica. A) Equipo Epoch (Biotek) y notebook HP con software Gen5 3.00. B) Interfaz gráfica del software Gen5 3.00 utilizado para la caracterización espectroscopias de soluciones utilizadas.



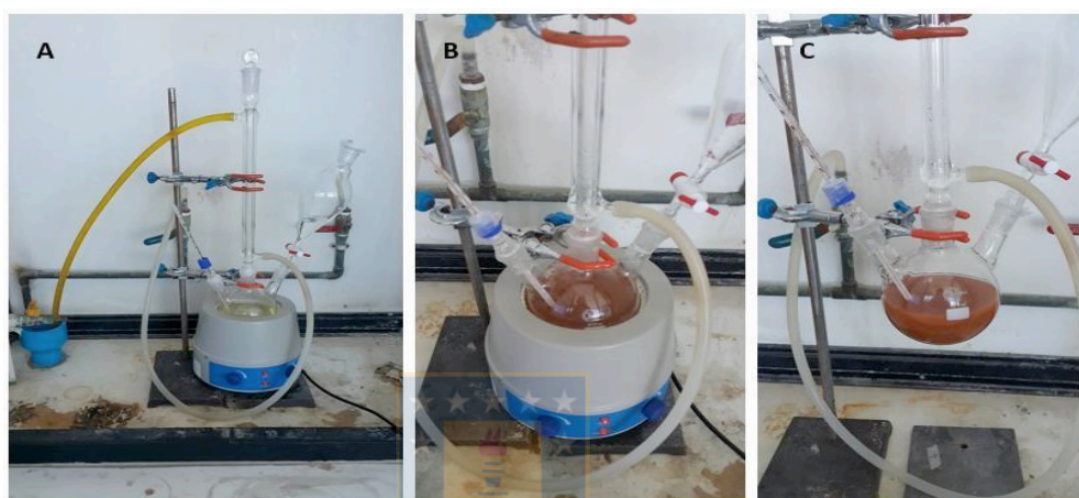
## A1.2. Resultados

### A1.2.1. Síntesis de AuNPs.

La solución de síntesis de AuNPs obtenida mediante el método de reducción por citrato (Figura A1.3), presenta AuNPs esféricas con diámetro aproximado de 15[nm], índice de polidispersidad (PDI) de 0,3, carga aproximada de 40[mV], concentración aproximada de 4,4[nM] y pH entre 4,7 y 5,0 en solución de síntesis (Figura A1.4 A-C). Datos obtenidos mostraron que AuNPs obtenidas por este método disminuían su potencial Z con respecto al tiempo (al tercer mes disminuían pZ a 20[mV] aprox.) y cambian su comportamiento óptico, relacionándose a agregación de AuNPs (solución cambia de rojo intenso a morado de manera paulatina), afectando la estabilidad de estas. Tomando en cuenta que el citrato es una molécula que contiene en su estructura 3 grupos carboxílicos ( $pK_a : 1^\circ = 3,15; 2^\circ = 4,77$  y  $3^\circ = 5,19$ ), los cuales interactúan con el oro para estabilizar a las AuNPs. Además, la solución de síntesis se encuentra a pH entre 4,7 y 5,0 lo que podría afectar la disponibilidad estos grupos carboxílicos, afectando la correcta interacción y por consiguiente protección y estabilización de las AuNPs. Basado en esto, se realizaron ensayos de síntesis de AuNPs con aumento de pH de la solución de reacción. Los resultados mostraron que a pH mayor a 6, la síntesis de AuNPs no se lleva a cabo. Síntesis realizadas a pH 5,3-5,6 permitieron obtener soluciones de AuNPs de tamaño forma y carga similar a los obtenidos con solución de síntesis pH 5,0, pero con concentraciones de entre 16 y 19[nM] (Figura A1.4D). Basado en estos resultados, se propone la realización de síntesis de AuNPs en

soluciones de síntesis de pH entre 5,3 y 5,6.

**Figura A1.3:** Proceso de síntesis de AuNPs utilizadas. A) Sistema de reflujo montado bajo campana con solución de  $HAuCl_4$  1[mM] bajo agitación a  $100^\circ C$  y solución de citrato de sodio 38,8[mM] presente en cuello lateral. B) Cambio de color de la solución borgoña, característico de la síntesis de AuNPs, al agregar citrato de sodio 38,8[mM]. C) La solución de AuNPs presente en balón a temperatura ambiente.

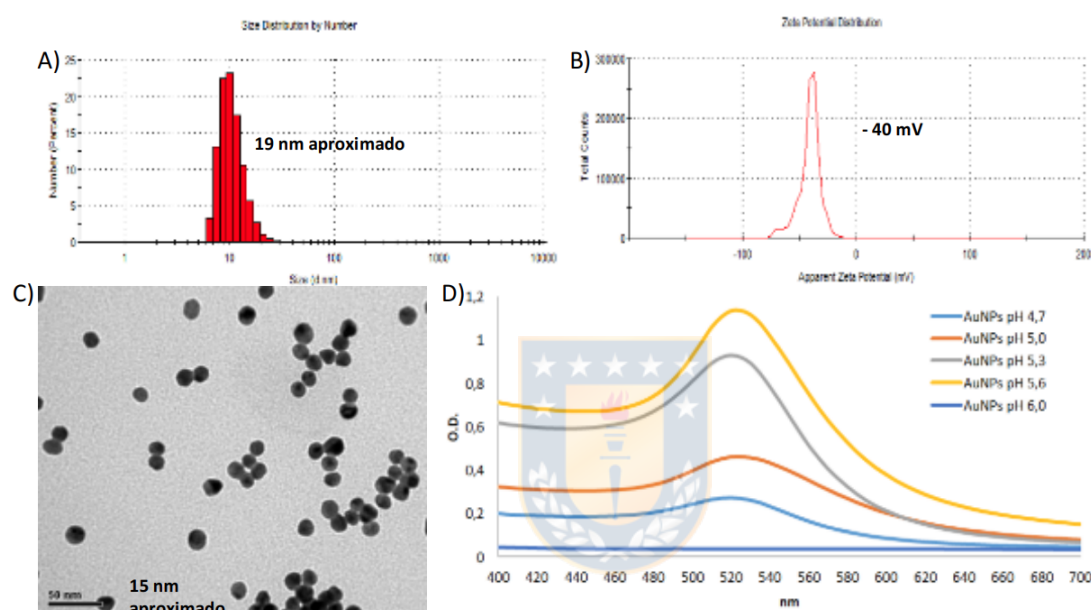


### A1.3. Construcción de Biosensores.

#### A1.3.1. Materiales y métodos

Para la generación de los distintos biosensores, se probaron las siguientes variables: i) Tiempo de incubación AuNPs con aptámero (biosensor), biosensor con la muestra y biosensor-muestra con revelador (NaCl). ii) Volúmenes de muestra y volúmenes de reacción total. iii) Relación molar aptámero/AuNPs. iv) Concentraciones de NaCl. v) Temperaturas de incubación AuNPs-aptámero y biosensor con la muestra. Todas las pruebas fueron realizadas con a lo menos 3 ensayos independientes ( $n=3$ ) utilizando los siguientes aptámeros: 1) Oxi-2: aptámero que reconoce a antibiótico Oxitetraciclina. 2) KAN: aptámero que reconoce a antibiótico Kanamicina. 3) Sul: aptámero que reconoce a antibiótico sulfadimetoxina. 4) AMP: aptámero que reconoce a antibiótico Ampicilina. Aptámeros utilizados fueron seleccionados a partir de literatura y solicitados a la empresa Integrated DNA Technologies (IDT) inc., a través de su representante en Chile Fermelo Biotec S.A. Para cada biosensor fueron determinados los mejores parámetros y metodología que permitiera generar

**Figura A1.4:** Caracterización de AuNPs utilizadas en este proyecto. A) Histograma de AuNPs obtenidas mediante DLS, observándose un tamaño promedio de 19[nm] aproximado. B) Potencial Z de AuNPs utilizadas en este estudio, las cuales presentan carga negativa con una magnitud de 40[mV] aproximado. C) Imagen TEM de AuNPs utilizadas en este estudio, se observa que los núcleos poseen un tamaño aproximado de 15[nm] y forma esférica características de AuNPs. D) Caracterización espectroscópicas de AuNPs sintetizadas y efecto de pH de solución de síntesis. Se observa que la mayor absorción se obtiene con síntesis realizadas a pH 5,3 y 5,6.



una respuesta lineal, más sensible y con límite de detección menor a los límites de residuos máximos legales indicados por el SAG (LMR). Obtención de espectros de absorbancia de las distintas soluciones analizadas fueron obtenidas utilizando lector de placas multimodal Epoch y software Gen5 3.0 (Biotek). A continuación se describen las mejores metodologías para cada uno de los biosensores y sus resultados.

## A1.4. Biosensor para Oxitetracilina y ensayos de detección.

### A1.4.1. Curva de calibración para la determinación de Oxitetracilina en agua (Protocolo basado en Kim et al. (2010)).

Ensayo de detección de Oxitetracilina: 1400[ $\mu$ L] de solución de AuNPs (2,5[nM]) fueron incubadas con 40[ $\mu$ L] de solución de aptámero OXI-2 (42[ $\mu$ M]). Luego la

solución se incubó a  $60^{\circ}C$  por 30 minutos y finalmente la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos previos a su uso.  $288[\mu L]$  de solución de biosensor para Oxitetraciclina fueron incubados con  $32[muL]$  de solución de distintas concentraciones de oxitetraciclina (0 a  $500[ppb]$ ) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Solución de antibióticos fue preparada utilizando buffer de unión Oxi-2 ( $100[mM]$   $NaCl$ ,  $200[mM]$  Tris-HCl,  $2[mM]$  de  $MgCl_2$ ,  $5[mM]$  de  $KCl$  y  $1[mM]$  de  $CaCl_2$  a pH 7). Posteriormente se agregó  $40[\mu L]$  de solución reveladora ( $1[M]$  de  $NaCl$ ) y se deja incubar por 5 minutos, 30 minutos y 1 hora a temperatura ambiente, obteniendo espectros de absorbancia de la manera previamente descrita.

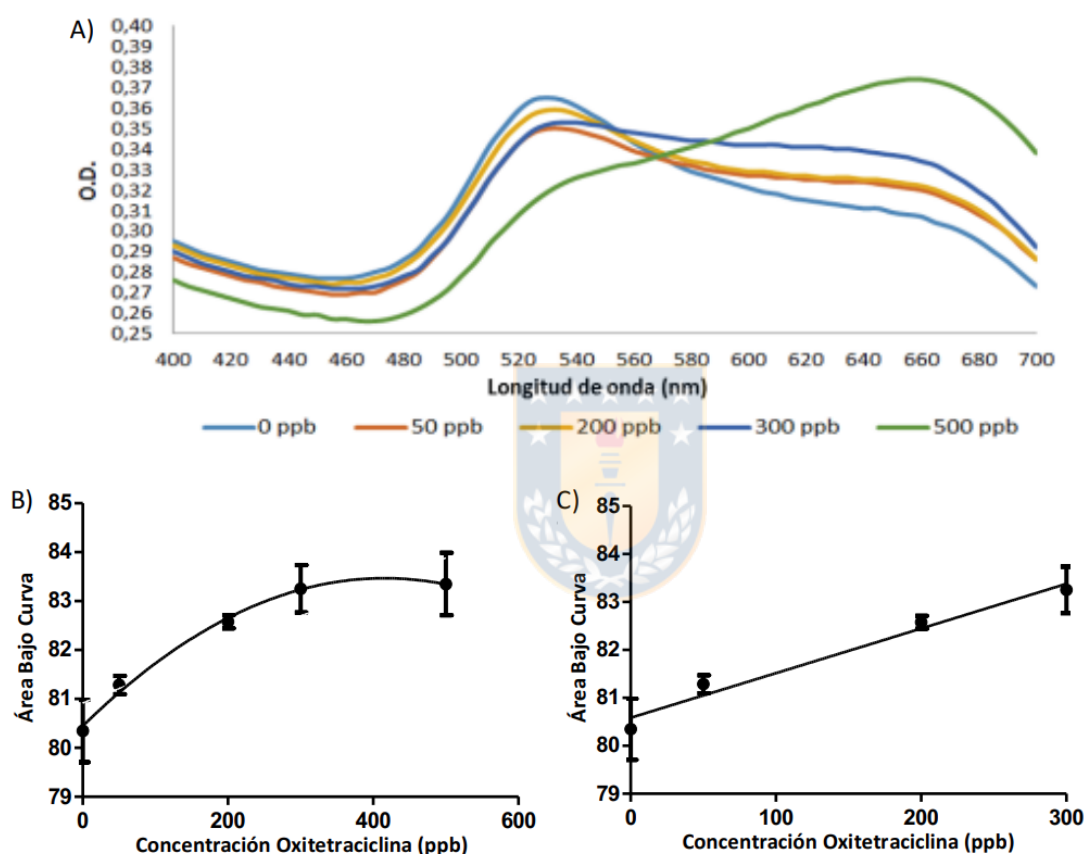
#### A1.4.2. Clasificadores

Ratio (Razón) absorbancia a  $520/620[nm]$  (utilizado ampliamente en literatura), ratio  $520/700[nm]$  y área bajo la curva espectral.

#### A1.4.3. Resultados

Los resultados obtenidos indicaron que la metodología descrita previamente permite detectar la presencia de antibiótico en agua a partir de concentraciones de  $50[ppb]$  aproximadamente, con rango lineal entre los 0 y  $300[ppb]$  de oxitetraciclina. De los clasificadores analizados, el que presenta mejor límite de detección, mejor sensibilidad (pendiente de la recta) y rango lineal corresponde a la utilización del área bajo la curva del espectro de absorción entre 400 a  $700[nm]$  (Figura A1.5). Además, análisis estadístico indican que el límite de detección utilizando esta metodología es de  $84[ppb]$ , con una pendiente de la curva de calibración de 0,0093 (Figura A1.5).

**Figura A1.5:** Curva de calibración para biosensor para Oxitetraciclina. A) Espectro de absorbancia de biosensor para oxitetraciclina en presencia de distintas concentraciones de Oxitetraciclina posterior a 30[*min*] de incubación con 1[M] de NaCl. Paso óptico de 1[*cm*]. B) Curva calibración construida utilizando como clasificador el área bajo curva de los espectros de absorción obtenidos. C) Zona de comportamiento lineal de la curva de calibración. Error estándar: 0,26982; pendiente: 0,0093; límite de detección: 84[*ppb*];  $R^2$  de medias: 0,9713. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3).



## A1.5. Biosensor para Sulfadimetoxina y ensayos de detección.

### A1.5.1. Curva de calibración para la determinación de Sulfadimetoxina en agua (protocolo basado en [Chen et al. \(2013\)](#)):

Ensayo de detección de Sulfadimetoxina: 50[ $\mu$ L] de solución de aptámero para Sulfadimetoxina 2[ $\mu$ M] fueron mezclados con 50[ $\mu$ L] de solución de concentración conocida del antibiótico (0 a 25[*ppb*]). La mezcla se incubó a 22°C durante 5[*min*].

Luego se agregó  $50[\mu L]$  de solución de AuNPs ( $14[nM]$ ) y se incubó a  $22^{\circ}C$  por  $5[min]$ , por último se agregó  $10[\mu L]$  de solución reveladora ( $NaCl$   $1[M]$ ) y se dejó incubar a  $22^{\circ}C$  por  $30[min]$ . Se registró el espectrograma entre  $400$  y  $900[nm]$  y se generó la curva de calibración que consideró la relación de absorbancia entre  $520$  y  $755[nm]$  en función de la concentración de Sulfadimetoxina.

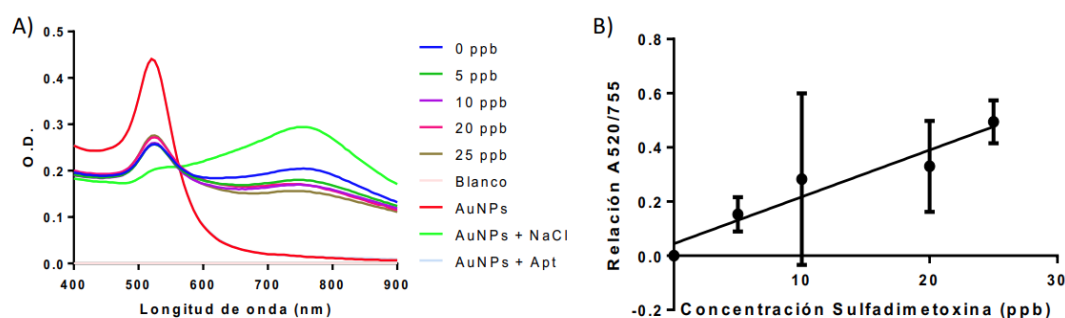
### A1.5.2. Clasificadores.

Ratio de absorbancia a  $520[nm]/620[nm]$  (utilizado ampliamente en literatura), ratio  $520[nm]/755[nm]$  y área bajo la curva espectral.

### A1.5.3. Resultados.

La metodología empleada permite detectar la presencia de Sulfadimetoxina en agua a partir de concentraciones de  $9[ppb]$  aproximadamente, con rango lineal entre los  $0$  y  $25[ppb]$ , utilizando como clasificador la relación de absorbancia a  $520$  y  $755[nm]$  (Figura A1.6).

**Figura A1.6:** Curva de calibración para biosensor para Sulfadimetoxina. A) Espectrograma del biosensor para la determinación de Sulfadimetoxina, en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico en agua. Se incluye los controles respectivos.  $0,5[cm]$  de paso óptico. B) Curva de calibración para la determinación de Sulfadimetoxina en agua mediante biosensor basado en AuNPs. Error estándar:  $0,1543$ ; pendiente:  $0,1729$ ; ímite de detección:  $8,9[ppb]$ ;  $R^2$  de medias:  $0,9235$ . Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes ( $n=3$ ).



## **A1.6. Biosensor para Kanamicina y ensayos de detección.**

### **A1.6.1. Curva de calibración para la determinación de Kanamicina en agua (protocolo basado en Song et al. (2011):**

Ensayo de detección de Kanamicina: 56[ $\mu L$ ] de solución de AuNPs 4[nM] fueron mezclados con 224[ $\mu L$ ] de solución de aptámero para Kanamicina 50[nM] y se incubó a 40°C durante 5[*min*]. Posteriormente se agregó 42[ $\mu L$ ] de solución de concentración conocida del antibiótico (0 a 10[*ppb*]). La mezcla se incubó a 40°C por 5[*min*], por último se agregó 28[ $\mu L$ ] de solución reveladora (*NaCl* 0,5[M]) y se dejó incubar a 40°C por 30[*min*]. Se registró el espectrograma entre 400 y 900[nm] y se generó la curva de calibración que consideró la relación de absorbancia entre 775 y 520[nm] en función de la concentración de Kanamicina.

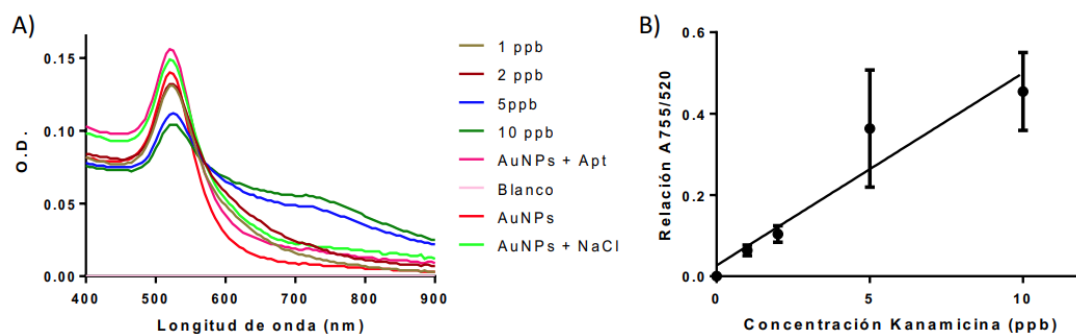
### **A1.6.2. Clasificadores.**

Ratio de absorbancia a 520[nm]/620[nm] (utilizado ampliamente en literatura), ratio 520[nm]/775[nm] y área bajo la curva espectral.

### **A1.6.3. Resultados.**

La metodología empleada permite detectar la presencia de Kanamicina en agua a partir de concentraciones de 3[*ppb*] aproximadamente, con rango lineal entre los 0 y 10[*ppb*], utilizando como clasificador la relación de absorbancia a 775 y 520[nm] (Figura A1.7).

**Figura A1.7:** Curva de calibración para biosensor para Kanamicina. A) Espectrograma del biosensor para la determinación de Kanamicina, en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico en agua. Se incluye los controles respectivos. 1[cm] de paso óptico. B) Curva de calibración para la determinación de Kanamicina en agua mediante biosensor basado en AuNPs. Error estándar: 0,08797; pendiente: 0,04731; límite de detección: 2,7[ppb];  $R^2$  de medias: 0,8393. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos. independientes (n=3).



## A1.7. Biosensor para ampicilina y ensayos de detección.

### A1.7.1. Curva de calibración para la determinación de Ampicilina en agua (protocolo basado en Song et al. (2012)):

Se calentó 10[ $\mu$ L] de aptámero para Ampicilina 28,6[nM] a 95°C durante 5[*min*] y luego se dejó reposar a 22°C por 15[*min*], posteriormente se adicionó 100[ $\mu$ L] de solución de AuNPs 0,7[nM] y se incubó la mezcla a 27°C durante 1 hora. Más tarde se agregó 10[ $\mu$ L] de solución de diferentes concentraciones de ampicilina (0-360[ppb]) y se incubó a 27°C durante 1 hora. Luego se adicionó 23[ $\mu$ L] de solución reveladora (NaCl 0,6[M]), se incubó a 27°C por 3 horas. Posteriormente se registró el espectrograma y se generó la curva de calibración entre la relación de absorbancias 620[nm]/520[nm] y la concentración del antibiótico.

### A1.7.2. Clasificadores:

Ratio de absorbancia a 520[nm]/620[nm] (utilizado ampliamente en literatura), ratio 520[nm]/755[nm] y área bajo la curva espectral.

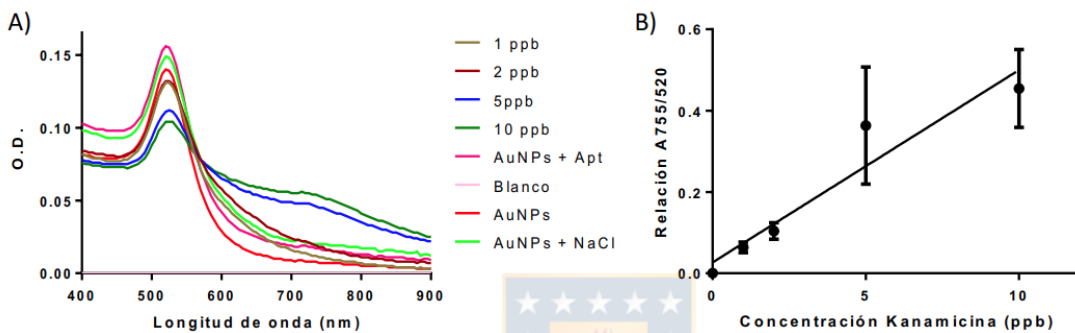
### A1.7.3. Resultados.

La metodología empleada permite detectar la presencia de Antibiótico en agua a partir de concentraciones de 80[ppb] aproximadamente, con rango lineal entre



los 0 y 1800[ppb], utilizando como clasificador la relación de absorbancia a 620 y 520[nm] (Figura A1.8).

**Figura A1.8:** Curva de calibración para biosensor para Ampicilina. A) Espectrograma del biosensor para la determinación de Ampicilina, en presencia de diferentes concentraciones del antibiótico en agua. Se incluye los controles respectivos. 1[cm] de paso óptico. B) Curva de calibración para la determinación de Ampicilina en agua mediante biosensor basado en AuNPs. Error estándar: 0,01604; pendiente: 0,0003; límite de detección: 80,2[ppb];  $R^2$  de medias: 0,8393. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3).



## A2. Prototipo de Hardware integrado de optomecánica y optoelectrónica

El prototipo de hardware está diseñado y construido en tres secciones fundamentales que se complementan para obtener múltiples mediciones de los micro fluidos y medir sus respectivos espectros en un medio acuoso. El primero se conforma por el hardware optomecánico, este considera toda la mecánica necesaria para dirigir, optimizar, y reducir ruido de la señal absorbida, reflejada y transmitida por el plasmón, el segundo se conforma por la optoelectrónica que contempla toda la instrumentación de emisión de luz como también la detección de espectros, y por último la electrónica de control que interactúa con todo el hardware mencionado anteriormente.

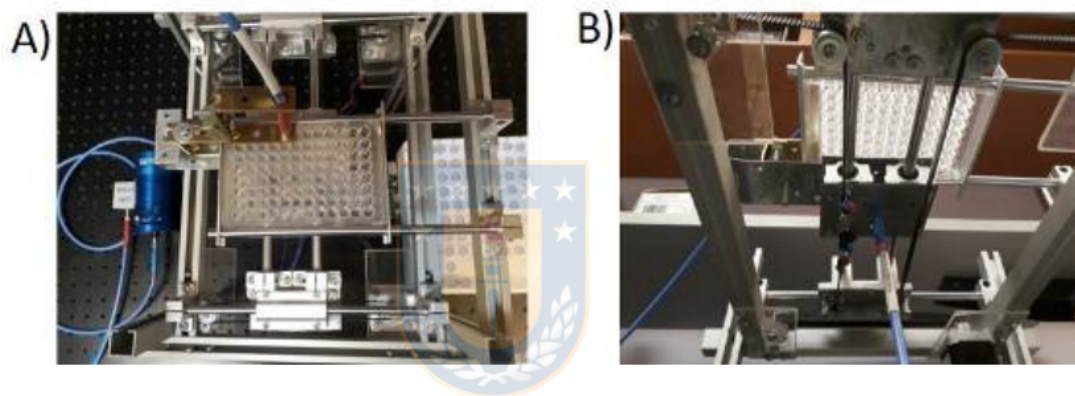
### A2.1. El hardware optomecánico.

El hardware optomecánico está compuesto por la siguiente instrumentación.

- a. Prototipo de Hardware optomecánico/optoelectrónico: Esta herramienta de

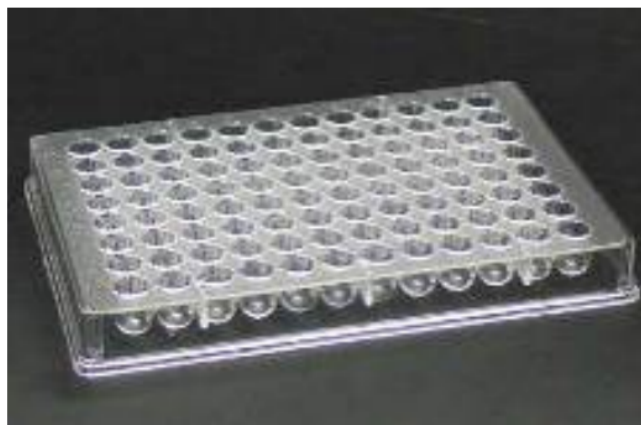
hardware/software es un sistema robusto de adquisición de datos, el cual posee la capacidad de mover las fibras ópticas de lectura óptica en un plano XY, sobre las micro-cubetas, ver figura A2.1a. Esta capacidad, permite tener un control sobre el micro fluido que se quiere acceder a medir su respuesta óptica de forma automática, por medio del software de control. Ver Figura A2.1.

**Figura A2.1:** Prototipo de Hardware optomecánico/optoelectrónico. a) Vista superior de mesa desplazadora, podemos observar la fibra óptica de medición posicionándose en la microplaca de 96 pocillos, también se visualiza el radiómetro junto a la fuente de iluminación. b) Vista posterior de la mesa desplazadora, fibra óptica de iluminación sobre la microplaca de 96 pocillos.



b. Micro Placas de 96 Pocillos: Permite almacenar las muestras de forma ordenada para una medición óptima. Ver Figura A2.2.

**Figura A2.2:** Micro placa: de 96 pocillos. Esta es la utilizada para la medición.



c. Soportes Regulables: Permiten regular la altura de la muestra en función de

la sonda, para establecer una razón ideal.

- d. Fibras ópticas: Permiten transportar la luz desde la fuente de iluminación a la micro placa y desde la micro placa al radiómetro. Ver Figura A2.3.

**Figura A2.3:** Fibra óptica que trabaja en el espectro ultra violeta y visible.



- e. Bloqueador de Luz: Caja de metal que permite bloquear la luz ambiente para una medición sin interferencias.

## A2.2. El hardware optoelectrónico.

El hardware optoelectrónico está compuesto por la siguiente instrumentación:

- a. Radiómetros: Dispositivos que permiten dispersar el haz de luz entrante para luego digitalizarlo en cuentas digitales. Ver Figura A2.4.

**Figura A2.4:** Radiómetros VIS Y UV.



- b. Fuente de iluminación: Dispositivo que emite un haz de luz que contempla parte del espectro UV y Visible. Ver Figura A2.5.

**Figura A2.5:** Fuente de Iluminación.



### A2.3. El hardware de electrónica de control.

La electrónica de control está compuesta por la siguiente instrumentación:

- a. Raspberry Pi: Mini Computador con salidas configurables que permiten controlar lógicamente hardware optomecánico y optoelectrónico. Ver Figura A2.6.

**Figura A2.6:** Raspberry Pi como unidad de control.



- b. Firmware: Algoritmo de control que reside en la electrónica y que permite dar la lógica a la electrónica.

### A2.4. La integración del Hardware, Software y Firmware.

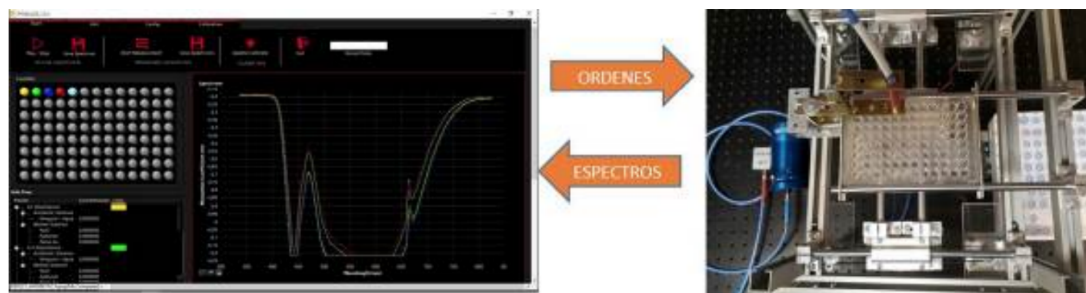
La integración del sistema optomecánico y el hardware de control embebido interactúan de la siguiente forma: El computador que corre el software de control se comunica a través de TCP/IP con el firmware de control del sistema de posicionamiento mecánico para la lectura de las micro cubetas, y realiza todas las acciones en forma coordinada con las fuentes de iluminación y el radiómetro para hacer lectura de la información óptica. Ver Figura A2.7.

**Figura A2.7:** Diagrama de control Hardware Software y Firmware. Flujo de Datos del prototipo.



El usuario, a través de la interfaz gráfica del software (ver Figura A2.8), puede programar adquisiciones de espectros desde los 96 pocillos de la micro placa. De esta forma, todos los espectros adquiridos por el software son almacenados en una base de datos con su respectiva etiqueta que los identifica para ser utilizados como datos de entrenamiento del algoritmo de clasificación.

**Figura A2.8:** Esquema de trabajo del sistema. El usuario a través del software comanda el prototipo para obtener espectros de los pocillos.



### A2.5. Determinación del espectro de reflexión o transmisión del biosensor en antibióticos individuales y mezclas en agua.

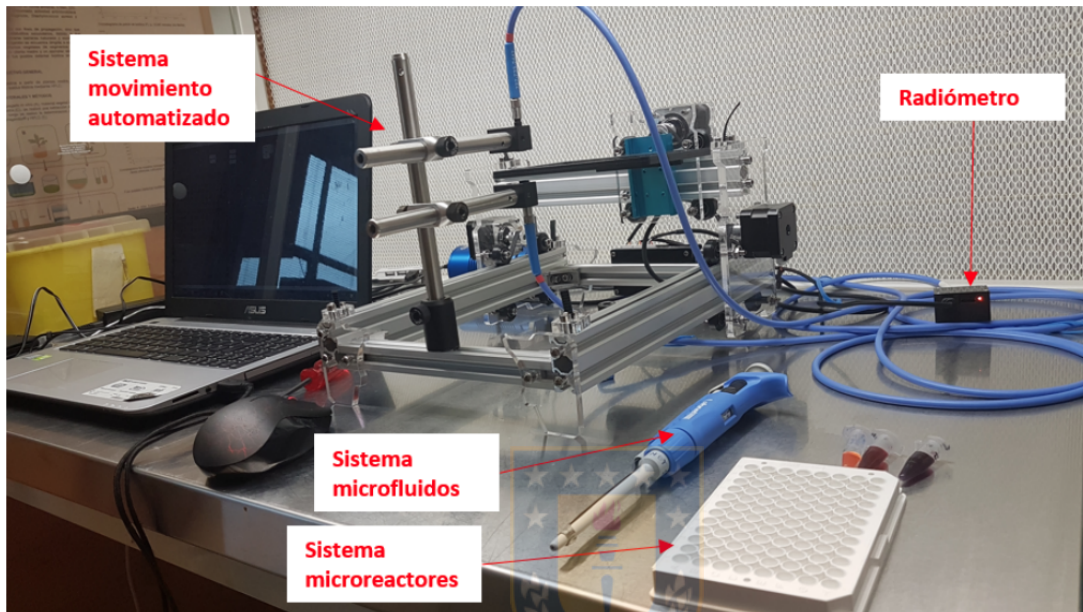
A continuación, se muestran los espectros de Transmisión representados como Absorbancia para efectos de comparación con el instrumento EPOCH. La transformación matemática para obtener la absorbancia ( $A$ ), a partir del espectro de transmitancia ( $T$ ) está dada por la siguiente ecuación:

$$A = -\log(10) \quad (\text{A2.1})$$

#### A2.5.1. Instrumentación.

En cuanto a la instrumentación, se utilizó el prototipo optoelectrónico en desarrollo que contempla la integración del radiómetro, fibra óptica, sistema de iluminación con sistema optomecánico y hardware de control de movimiento automatizado.

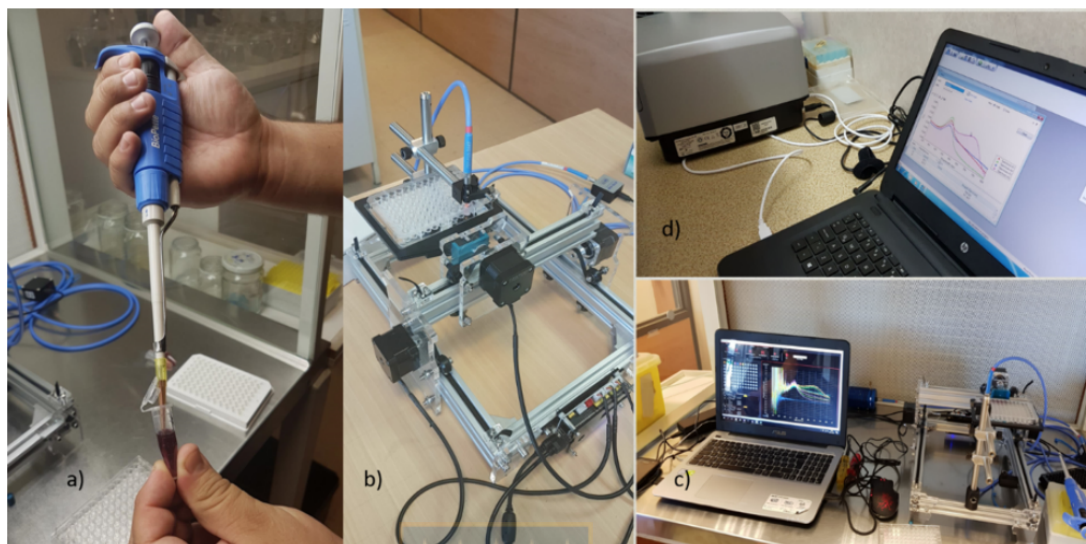
**Figura A2.9:** Sistema de prototipo optoelectrónico integrado. En la imagen se puede apreciar el sistema motorizado automático que permite desplazar la placa de micro-reactores sobre las fibras de iluminación y transmisión, en donde el radiómetro será el encargado de digitalizar la señal de transmisión de los microfluidos proporcionados por el sistema mecánico de control de micro-volúmenes.



### A2.5.2. Procedimiento de medición.

En primera instancia se extrae el volumen necesario para un biosensor utilizando el sistema de control de microfluido y este se deposita al interior del micro-reactor con la mezcla de todos los antibióticos. Este procedimiento se repite para todos los biosensores. Luego, la placa de microreactores se ubica en el prototipo optoelectrónico y este, de forma automatizada mide los espectros de transmitancia en cada uno de los microreactores seleccionados en el software desarrollado. Por último, los resultados son representados en pantalla y exportados en formato .xls.

**Figura A2.10:** Procedimiento para obtener los espectros de transmitancia en forma automática con el prototipo desarrollado: a) Sistema Microfluidos. b) Sistema optoelectrónico automatizado. c) Sistema Integrado (Software + Sistema Optoelectrónico) d) Sistema EPOCH.

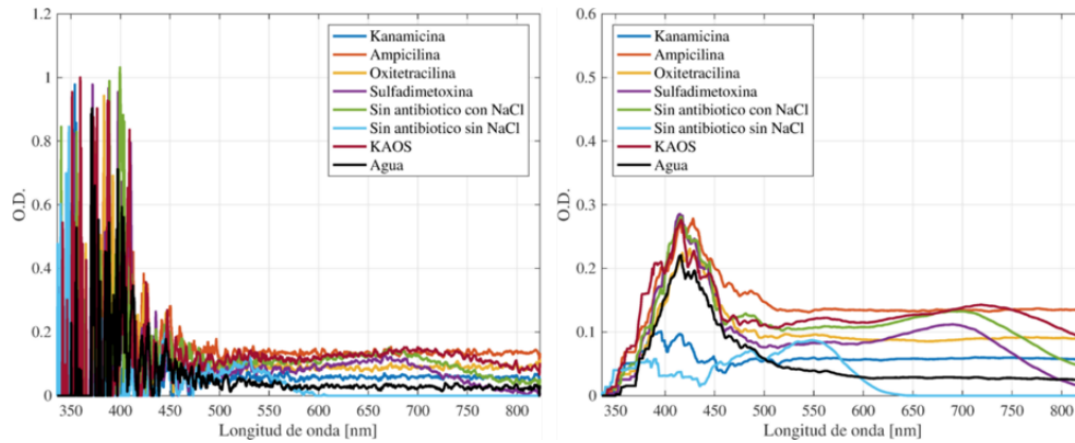


### A2.5.3. Resultados.

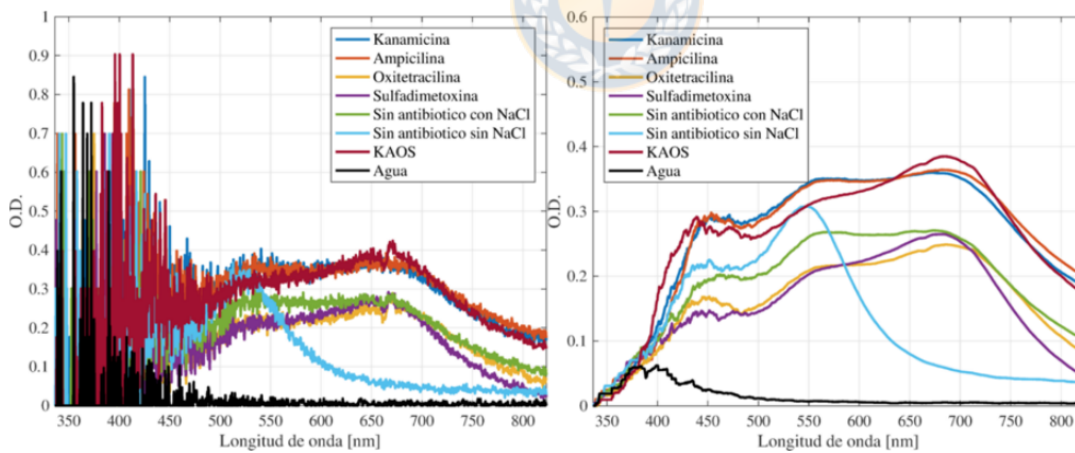
Utilizando protocolos establecidos en el Anexo 1 para cada biosensor, se realiza la determinación de la presencia de los distintos antibióticos utilizando los biosensores para kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y la combinatoria de los 4 antibióticos utilizados (KAOS), considerando la concentración de límite residual de cada antibiótico (LMR) y utilizando la siguiente matriz de experimentos:



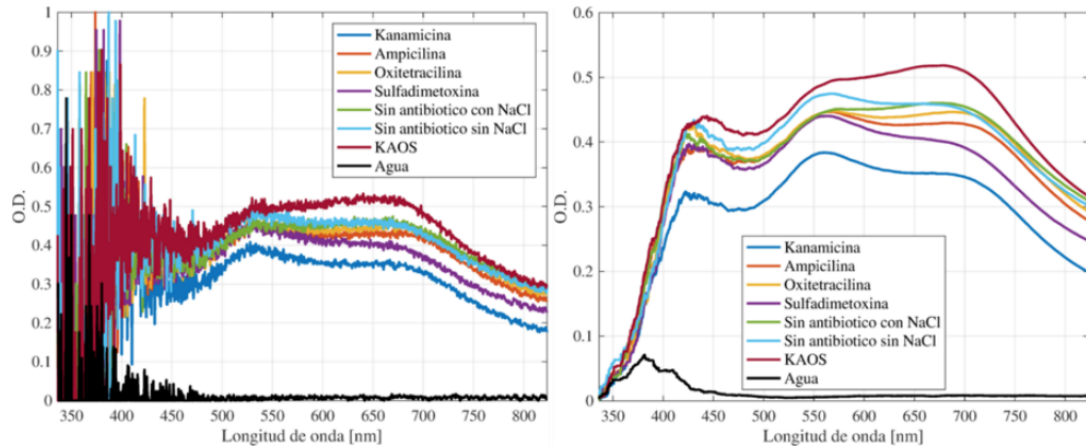
**Figura A2.11:** Biosensor para Kanamicina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados.



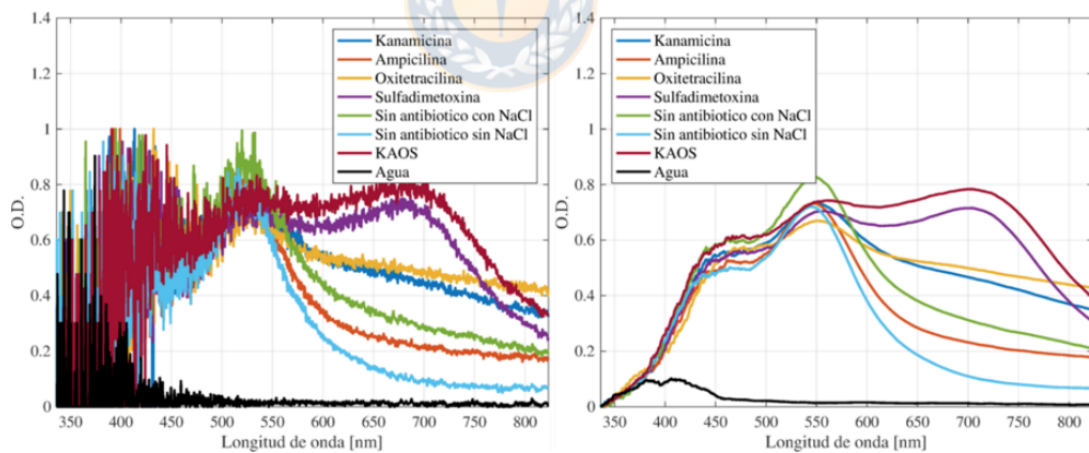
**Figura A2.12:** Biosensor para Ampicilina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados.



**Figura A2.13:** Biosensor para Oxitetraciclina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados.



**Figura A2.14:** Biosensor para Sulfadimetoxina versus kanamicina, ampicilina, oxitetraciclina, sulfadimetoxina y (KAOS): Izquierda, RawData. Derecha, Datos Filtrados.

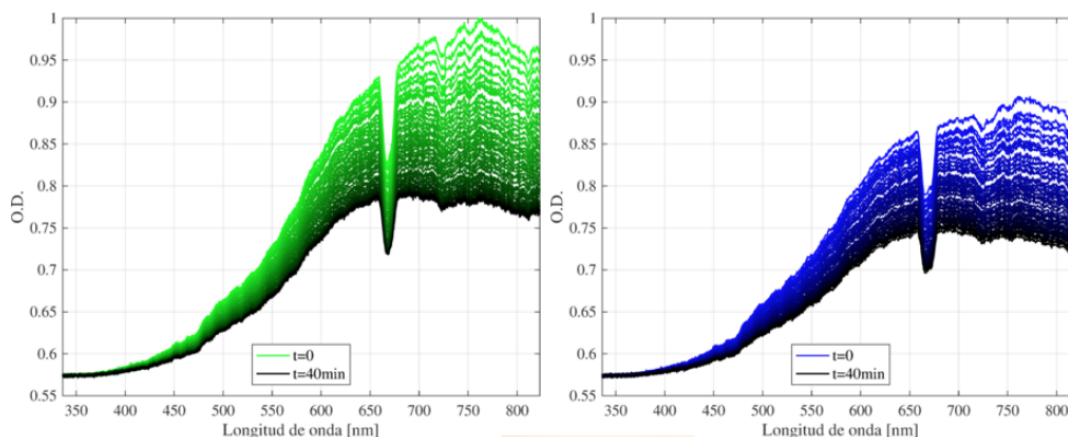


#### A2.5.4. Evolución Temporal.

El sistema desarrollado tiene la capacidad de capturar la evolución temporal de las curvas radiométricas transmitidas por los biosensores en presencia de antibióticos, a diferencia de los equipos comerciales que solo capturan transmisión y longitud de onda. Esta nueva dimensión nos permite extraer información que podría habilitar una clasificación más rápida mediante la observación del comportamiento temporal

de los biosensores. A continuación, se presenta la evolución temporal de Ampicilina detectada por el biosensor.

**Figura A2.15:** Evolución temporal de 40 minutos (a una resolución de 1 minuto) de la transmitancia (sin calibrar) del biosensor para detectar Ampicilina en las proporciones (izquierda) 0[ppb] y (derecha) 4[ppb] (Límite máximo residual MLR).



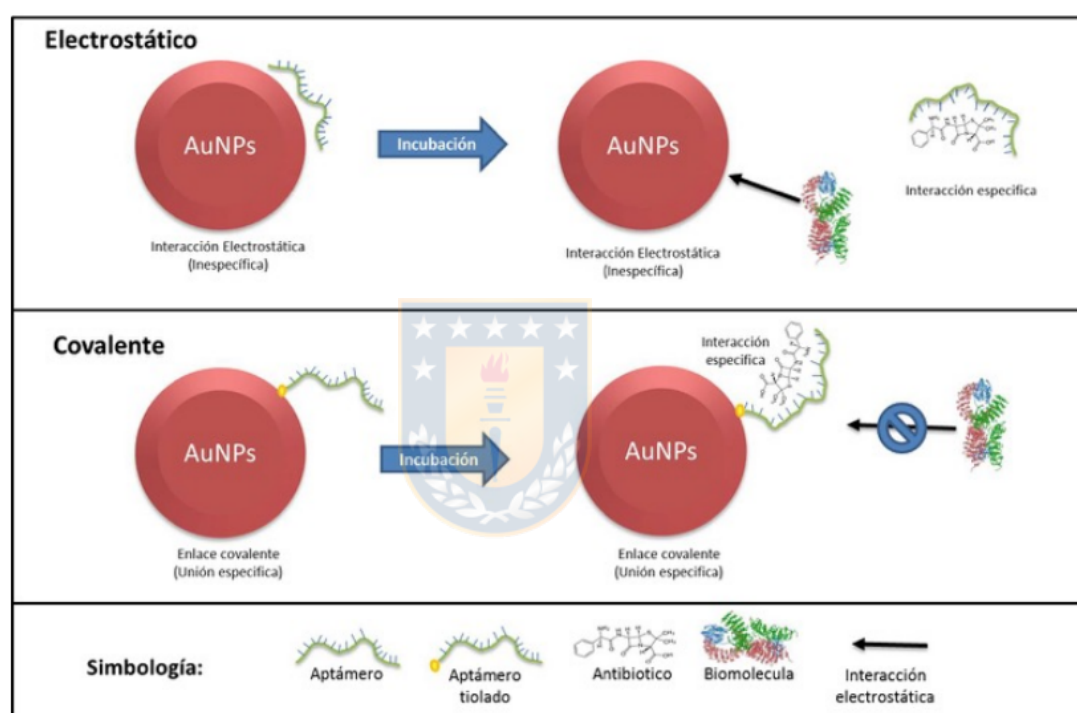
### A3. Parámetros bioanalíticos de los biosensores en leche cruda.

#### A3.1. Evaluación de procedimientos de tratamiento de las muestras de leche.

##### A3.1.1. Biosensor Covalente.

Los resultados presentados en los anexos 1 y 2, muestran la capacidad de los biosensores construidos de cuantificar la presencia de antibióticos en agua, sin embargo, se observaron reacciones cruzadas de los biosensores con otros antibióticos. Por este motivo, se determinó funcionalizar las AuNPs, mediante el método de unión covalente, buscando aumentar la especificidad del biosensor. Ver figura A3.1 para la explicación de la operación de funcionalización de AuNPs.

**Figura A3.1:** Diagrama representativo de los tipos de enlaces e interacciones en proceso de reconocimiento Biosensor-antibiótico. En el panel superior de la imagen (electrostático) se muestran las interacciones electrostáticas entre cargas de las AuNPs con los grupos fosfato del ADN (línea verde), junto con las otras posibles interacciones que pueden ocurrir en el proceso de reconocimiento aptámero/antibiótico. En el panel inferior de la imagen (covalente), se muestra el aptámero unido covalentemente con la AuNPs (círculo amarillo), impidiendo que estas se desacoplen. Esto permitiría que el aptámero secuestre al antibiótico en la superficie de los AuNPs, afectando su agregación de manera específica, evitando así efectos en la agregación de las AuNPs de manera inespecífica.



### A3.2. Evaluación agregación nanopartículas de oro en leche.

Para determinar la factibilidad de uso del biosensor en leche, en una primera etapa se determinó la capacidad de las nanopartículas de oro sin funcionalizar de agregar en leche. Posteriormente se analizó la capacidad de respuesta del biosensor en leche.

#### A3.2.1. Materiales y métodos.

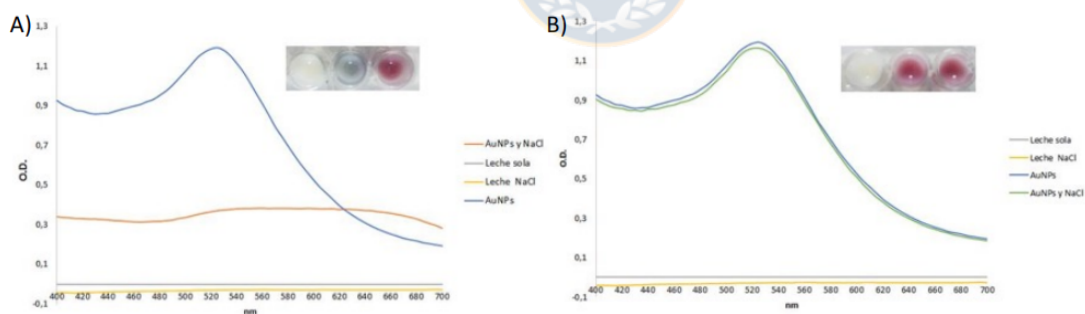
150[ $\mu$ L] de Nanopartículas de oro (4[nM]) se mezclaron con 150[ $\mu$ L] de leche entera, en presencia y ausencia de 60[ $\mu$ L] solución reveladora (NaCl 2[M]) y

se deja incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se registró el espectrograma entre 400 y 700[*nm*] utilizando como blanco analítico.

### A3.2.2. Resultados.

Los resultados obtenidos muestran la factibilidad de seguir los cambios espectrográficos asociados a la agregación de AuNPs (Figura A3.2). Pero al incubar las nanopartículas con leche y posteriormente agregar el revelador (*NaCl* 1[*M*]) no se observó cambio aparente. Esto indicaría que la matriz analizada (leche cruda) estaría evitando el proceso de agregación de las nanopartículas, necesario para la determinación de antibiótico, y por lo tanto, afectaría el correcto desempeño del biosensor.

**Figura A3.2:** Agregación de AuNPs en leche. A) Espectrograma de mezcla de AuNPs agregadas y sin agregar con leche. La imagen interior muestra microreactores que contienen leche, leche más AuNPs agregadas y leche más AuNPs. B) Espectrograma de mezcla de AuNPs con leche con posterior incubación de solución *NaCl* que propicia la agregación de NPs (Solución reveladora). Imagen interior muestra microreactores que contienen leche, leche más AuNPs mas solución reveladora y leche más AuNPs sin solución reveladora.



### A3.3. Evaluación actividad Biosensor en leche.

Resultados obtenidos mostraron que las AuNPs no son capaces de agregar en presencia de *NaCl* cuando se encuentran en leche, lo que afectaría la actividad de biosensor. Por este motivo se propuso determinar la actividad del biosensor covalente para ampicilina, ya que este antibiótico presenta el LMR menor a detectar. Cuando el aptámero interacciona específicamente con el antibiótico, por sus bases nitrogenadas (líneas azules), se desacopla de la AuNPs lo que permite que cualquier otra biomoléculas cargada pueda interactuar con AuNPs, afectando

su agregación de manera inespecífica.

### A3.3.1. Materiales y métodos.

Construcción del Biosensor: AuNPs son incubadas con aptámero AMP 3' tiolado, el cual reconoce específicamente a la ampicilina y se une covalentemente a las AuNPs por su grupo tiol. Incubación se realizó a pH 8 durante 2 días a 25°C.

Biosensor covalente 15: AuNPs incubadas con Aptamero AMP 3' tiolado en relación molar 1:15.

Biosensor covalente 30: AuNPs incubadas con Aptamero AMP 3' tiolado en relación molar 1:30.

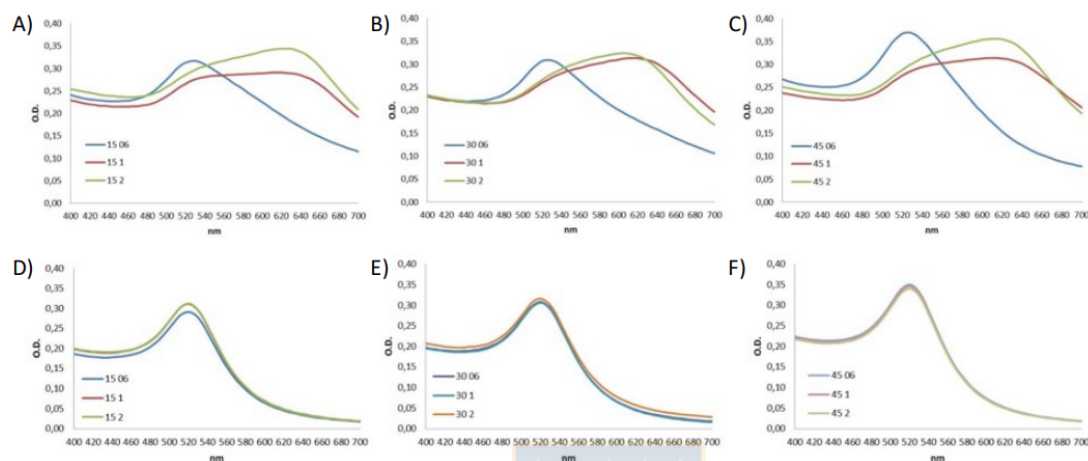
Biosensor covalente 45: AuNPs incubadas con Aptamero AMP 3' tiolado en relación molar 1:45.

Determinación actividad Biosensor de ampicilina en leche: 150[ $\mu$ L] de Biosensores covalentes 15, 30 y 45 fueron mezclados con 150[ $\mu$ L] de leche o agua. Posteriormente se agregaron 60[ $\mu$ L] de soluciones reveladoras (2, 1 y 0,6[M] de *NaCl*) y se dejó incubar por una hora.

### A3.3.2. Resultados.

Resultados obtenidos muestran cambios espectrográficos de soluciones de biosensores en agua en presencia de distintas concentraciones de *NaCl* (solución reveladora) (Figura A3.3). Pero al incubar los biosensores covalentes en leche y agregar el revelador no se observó cambio aparente, similar a lo observado en los resultados anteriores (Figura A3.3). Estos resultados estarían en concordancia con lo anterior, lo que indicaría que la leche cruda estaría evitando el proceso de agregación de las nanopartículas, afectando el correcto desempeño del biosensor. Estos resultados dejan patente la necesidad de realizar un clarificado de la leche para eliminar los interferentes presentes en esta como matriz (lípidos, proteínas, minerales, etc).

**Figura A3.3:** Actividad biosensor covalente para ampicilina en agua y leche. Espectrograma de biosensores para la determinación de ampicilina. Panel superior: Biosensor covalente 15(A), 30(B) y 45(C) para ampicilina en presencia de 2, 1 y 0,6[M] de *NaCl* en agua. Panel inferior: Biosensor covalente 15(D), 30(E) y 45(F) para ampicilina en presencia de 2, 1 y 0,6[M] de *NaCl* en Leche. Ensayo realizado con 1[cm] de paso óptico.



### A3.4. Evaluación actividad Biosensor en leche clarificada.

Para evaluar la factibilidad de obtener señal relacionada a la presencia de antibiótico en leche clarificada, se realizó la detección de ampicilina (LMR 4[ppb]) en clarificado de leche obtenido con reactivo carrez y acetato de etilo, utilizando Biosensor covalente para ampicilina.

#### A3.4.1. Materiales y métodos.

- Clarificación de leche, reactivo Carrez: A 10[mL] de Leche se agregó 500[μL] de reactivo Carrez I y se agitó en Vórtex por 1[min]. Luego se agregaron 500[μL] de reactivo Carrez II y se agitó hasta homogeneidad. Finalmente se centrifuga a 10000 × *G* durante 5[min] y se recupera el sobrenadante.
- Clarificación de leche, reactivo acetato de etilo: Se centrifugaron 4[mL] de leche 1800 × *G* por 20[min] a 10°C para separar la grasa. Luego se obtuvieron 2[mL] de leche desgrasada (sobrenadante), se les agrego 2[mL] de agua destilada y se agito durante 10[min] en vórtex. Posteriormente se agregaron 7[mL] de acetato de etilo, se agitó en vórtex por 15[min] y se centrifugó durante 15[min] a 1500 × *G* a 4°C. Finalmente se recuperó el

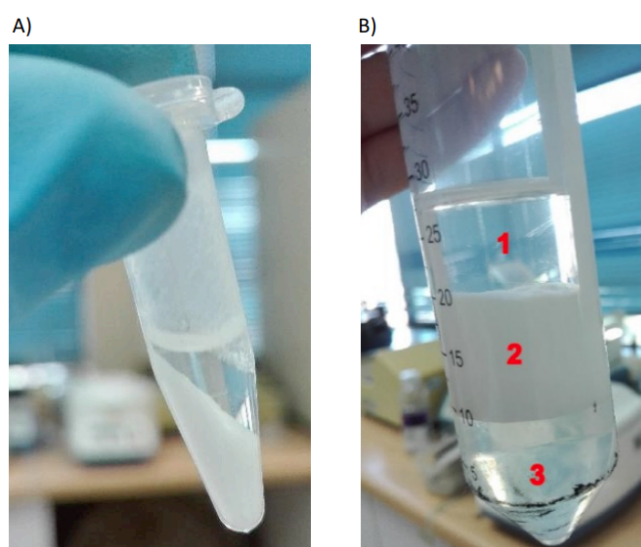
sobrenadante y se repitió el proceso una vez más.

- Determinación actividad Biosensor de ampicilina en clarificado de leche: 150[ $\mu L$ ] de Biosensor covalente 15 para ampicilina fueron mezclados con 150[ $\mu L$ ] de clarificado de leche por Carrez o acetato de etilo que contienen distintas concentraciones de ampicilina. Se dejó incubar durante 30[*min*] a 60°C. Posteriormente se agregaron 60[ $\mu L$ ] de soluciones reveladoras (1,8[M] de *NaCl*) y se dejó incubar por 30[*min*]. Finalmente se obtienen los espectrogramas de las soluciones.

#### A3.4.2. Resultados.

Resultados indican que ambas metodologías utilizadas permiten la obtención de clarificado de leche, donde la metodología por Carrez permitió obtener un mayor porcentaje de eliminación de proteínas (Tabla A3.1). Además, los resultados indican que es posible seguir cambios espectrograficos del biosensor asociado a las diferentes concentraciones de analito (ampicilina), tanto para clarificado de leche obtenido por Carrez o por acetato de etilo (Figura A3.4).

**Figura A3.4:** Obtención de clarificado de leche a partir de método Carrez y acetato de etilo. A) Obtención de clarificado de leche a partir de método Carrez. B) Obtención de clarificado de leche a partir de método acetato de etilo. 1) Fase correspondiente a acetato de etilo. 2) Fase correspondiente a componentes insolubles en leche post tratamiento (lipidos, proteínas). 3) Suero de leche (Clarificado).

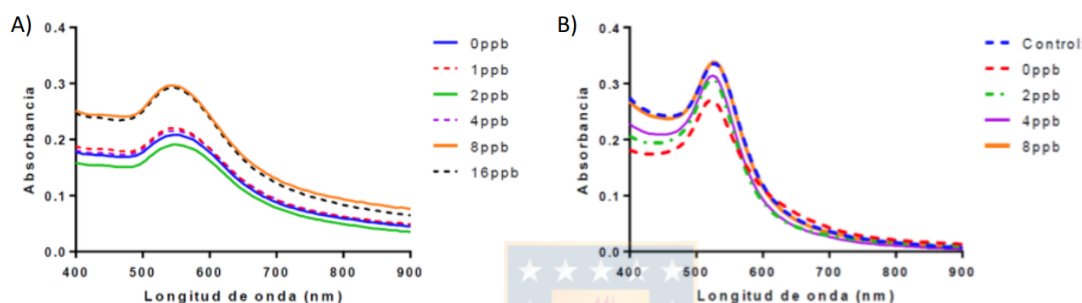




Método	g/L	% de eliminación
Carrez I y II	1,874	98,126
Acetato de etilo	3,022	96,977

**Cuadro A3.1:** Concentración de proteínas remanentes y porcentaje de eliminación de proteínas mediante los métodos utilizados.

**Figura A3.5:** Actividad biosensor covalente para ampicilina en clarificado de leche. Espectrograma de biosensores para la determinación de ampicilina en clarificado por Carrez (A) y por acetato de etilo (B). Ensayo realizado con 1[cm] de paso óptico.



#### A3.4.3. Determinación de Ampicilina por HPLC.

Para la medición de ampicilina por HPLC es necesario realizar modificaciones en la estructura de la ampicilina (derivatización) para que esta pueda ser detectada (Brito and Junqueira (2006)), utilizando anhídrido acético en acetonitrilo y 1-metilimidazol, según protocolo publicado por Brito and Junqueira (2006).

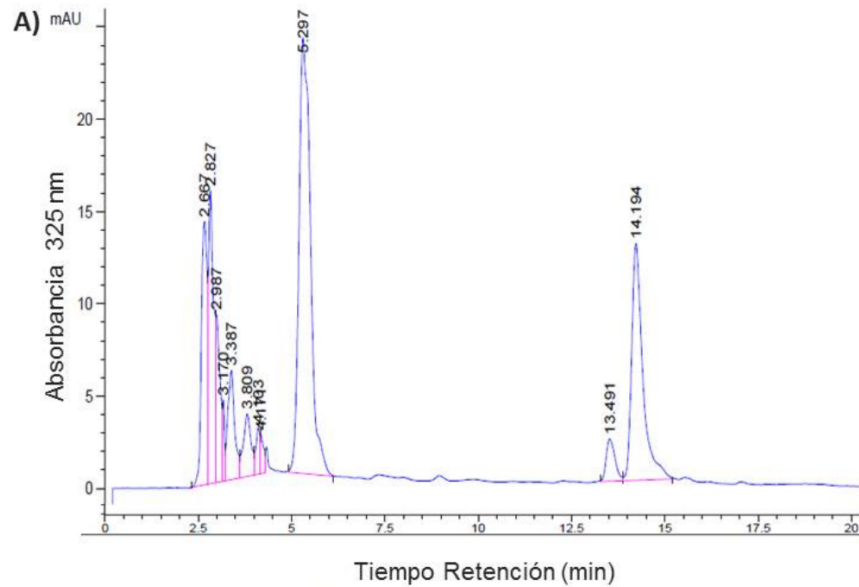
#### A3.4.4. Materiales y métodos.

Para 100[ $\mu$ L] de la solución de ampicilina se añadió 225[ $\mu$ L] de tampón fosfato a pH 9 y 75[ $\mu$ L] del reactivo de derivatización y se mezcló en vórtex y dejar reaccionar por 5[*min*]. Posteriormente se adicionaron 500[ $\mu$ L] del reactivo de derivatización II y se mezcló en vórtex por 1[*min*] y se incubó a 70°C por 1 hora. Finalmente las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y fueron inyectadas en el equipo de HPLC.

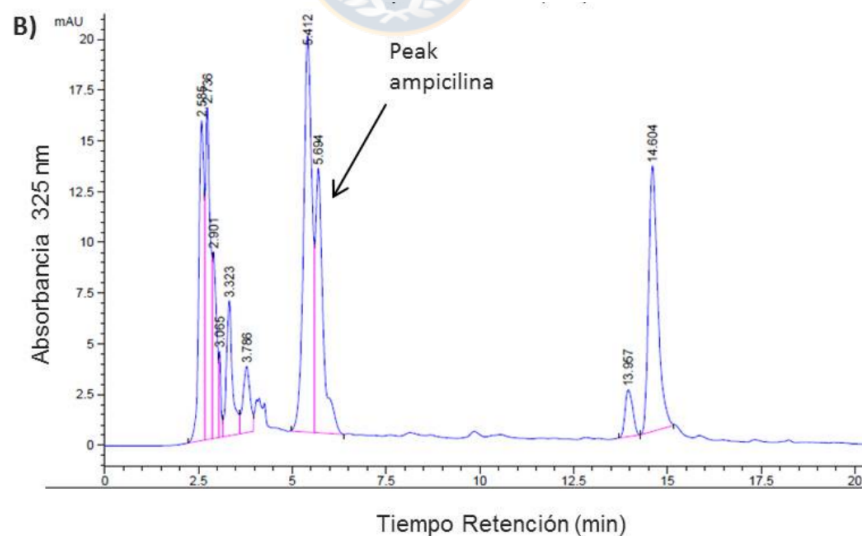
#### A3.4.5. Resultados.

Los resultados obtenidos muestran que es posible obtener señal clara relacionada a la presencia de ampicilina en muestras de agua.

**Figura A3.6:** Cromatograma HPLC-UV. Detección de ampicilina. A) Cromatograma de muestra de reactivos derivatizantes en agua (Blanco).



**Figura A3.7:** Cromatograma HPLC-UV. Detección de ampicilina. B) Cromatograma de muestra de ampicilina derivatizada en agua. Flecha negra muestra peak asociado a la presencia de ampicilina.



## A4. Memoria algoritmos clasificación en agua.

La memoria de título “Diseño y prueba de algoritmos de clasificación para la detección de antibióticos sobre soluciones acuosas”, en desarrollo por el alumno Cristofher Godoy de la carrera de Ingeniería Civil en Telecomunicaciones

(UDEC) tiene por objetivo el desarrollar el algoritmo de clasificación de las respuestas espectrales generadas por las nanopartículas sobre soluciones acuosas. A continuación se detallan sus resultados preeliminares más relevantes.

#### **A4.1. Hipótesis de Trabajo.**

Al usar teorías de información (análisis espectral, metodologías de clasificación y detección, entre otros) en los datos ópticos obtenidos de experimentos con AuNPs, es posible determinar las concentraciones y condiciones optimas para detectar distintos tipos de antibióticos. Para esto, se asume que los datos ópticos provienen de instrumentos y equipamiento correctamente calibrado y que las sustancias involucradas fueron elaboradas con alta precisión.

#### **A4.2. Objetivo Principal.**

Determinar la presencia de antibiótico en solución acuosa y estimar la concentración, para ayudar al cumplimiento de la normativa vigente en productos lácteos.

#### **A4.3. Métodos utilizados en clasificación.**

Hasta el momento de realizarse estas pruebas se evaluaron los siguientes métodos para clasificar e identificar las concentraciones de los antibióticos que interactúan con el biosensor.

1. Clasificación por área bajo la curva: Se considera como referencia el área bajo la curva de una muestra inicial con 0[ppb] de antibiótico en el biosensor y se establece la diferencia con respecto al área bajo la curva de una muestra con una cantidad indeterminada de antibiótico.
2. Clasificación por la pendiente entre dos puntos: Se calcula la pendiente de la recta que une 2 valores de absorción para 2 longitudes de onda diferentes. Como valor de referencia se utiliza la pendiente obtenida en la muestra con 0[ppb] de antibiótico en los mismos puntos de longitud de onda y se establece la diferencia entre dicha pendiente y la obtenida para las mismas longitudes de onda en una muestra con concentración de antibiótico indeterminada.
3. Clasificación por la razón entre dos puntos: Se considera como referencia la

razón entre los valores de absorción (para dos longitudes de onda diferentes) de una muestra con 0 ppb de antibiótico. Luego, se calcula la diferencia entre dicha razón y la obtenida para las mismas longitudes de onda pero en una muestra con cantidad indeterminada de antibiótico.

4. Clasificación por distancias Euclidiana y Mahalanobis entre curvas de respuesta: Se calcula la distancia, tanto Euclidiana como Mahalanobis entre curvas de respuesta óptica. Una de esas curvas corresponde a la muestra con 0[ppb] de antibiótico, mientras que la otra curva es de una muestra con concentración de antibiótico no determinada.

#### A4.4. Datos disponibles.

Las muestras estudiadas hasta la fecha corresponden al biosensor específico para Oxitetraciclina con una concentración de 2[M] de NaCl, muestras que fueron agitadas y con un tiempo de revelado mayor o igual a 30[*min*]. Se estudiaron concentraciones de antibiótico de 0, 25, 50, 100, 150 y 500[ppb], considerando que la norma vigente requiere detectar concentraciones menores a 100[ppb]. Se cuenta con las curvas de absorción óptica entre los 400 y 700[nm] para cada una de estas concentraciones, con una resolución espectral de 5[nm].

#### A4.5. Resultados.

Para los efectos de este trabajo, se define la sensibilidad como la probabilidad de que una muestra que cumpla con la normativa, sea reconocida como tal por el clasificador y la especificidad como la probabilidad de que una muestra que no cumpla con la normativa, sea reconocida como tal por el clasificador.

Sensibilidad (%)	100 %
Especificidad (%)	50 %
Entre	515 y 540[nm]
N° Total de muestras	18

**Cuadro A4.1:** Método: Área bajo la curva.

Sensibilidad (%)	100 %
Especificidad (%)	100 %
Entre	475 y 510[nm]
N° Total de muestras	18

**Cuadro A4.2:** Método: Pendiente entre 2 puntos.

Sensibilidad (%)	100 %
Especificidad (%)	83,3 %
Entre	495 y 585[nm]
N° Total de muestras	18

**Cuadro A4.3:** Método: Razón entre 2 puntos.

Sensibilidad (%)	91,7 %
Especificidad (%)	50 %
Entre	460 y 655[nm]
N° Total de muestras	18

**Cuadro A4.4:** Método: Distancia euclidiana.

Sensibilidad (%)	91,7 %
Especificidad (%)	33,3 %
Entre	405 y 690[nm]
N° Total de muestras	18

**Cuadro A4.5:** Método: Distancia Mahalanobis.

## A4.6. Resultados para antibióticos.

La Sensibilidad y Especificidad se calculan de la misma forma que en el apartado anterior. A continuación, se presentan los mejores resultados para cada método. Se considera el rango de longitudes de onda en que se obtienen los mejores resultados globales, es decir, mayor número de aciertos en relación al número total de muestras estudiadas.

Concentración Oxi	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
0[ppb]	100	93,3
25[ppb]	66,7	66,7
50[ppb]	100	93,3
100[ppb]	33,3	100
150[ppb]	33,3	100
500[ppb]	33,3	100

**Cuadro A4.6:** Método: Área bajo la curva Entre: 655 y 700[nm]  $N^\circ$  de muestras: 18.

Concentración Oxi	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
0[ppb]	100	93,3
25[ppb]	66,7	93,3
50[ppb]	33,3	100
100[ppb]	66,7	86,7
150[ppb]	100	100
500[ppb]	100	100

**Cuadro A4.7:** Método: Pendiente entre 2 puntos Entre: 475 y 510[nm]  $N^\circ$  de muestras: 18.

Concentración Oxi	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
0[ppb]	100	100
25[ppb]	100	93,3
50[ppb]	100	100
100[ppb]	100	93,3
150[ppb]	66,7	100
500[ppb]	66,7	100

**Cuadro A4.8:** Método: Razón entre 2 puntos Entre: 490 y 585[nm]  $N^\circ$  de muestras: 18.

Concentración Oxi	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
0[ppb]	100	93,3
25[ppb]	66,7	100
50[ppb]	100	93,3
100[ppb]	0	100
150[ppb]	33,3	80
500[ppb]	66,7	86,7

**Cuadro A4.9:** Método: Distancia Euclidiana Entre: 690 y 700[nm]  $N^\circ$  de muestras: 18.

Concentración Oxi	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
0[ppb]	100	100
25[ppb]	33,3	80
50[ppb]	33,3	100
100[ppb]	33,3	100
150[ppb]	33,3	86,7
500[ppb]	100	80

**Cuadro A4.10:** Método: Distancia de Mahalanobis Entre: 420 y 525[nm]  $N^\circ$  de muestras: 18.

#### A4.7. Método propuesto de clasificación para Oxitetraciclina.

En vista de los resultados expuestos, se propone el siguiente método de análisis para las curvas de respuesta óptica de Oxitetraciclina.

**Figura A4.1:** Metodología propuesta para la clasificación de curvas de respuesta óptica para biosensor de Oxitetraciclina con una concentración de 2[M] de  $NaCl$ , agitadas y con un tiempo de revelado mayor o igual a 30 minutos.



Siguiendo este procedimiento, se obtiene 100 % de sensibilidad y especificidad tanto para determinar si cumple o no la normativa como para estimar la concentración de antibiótico en la muestra.

## A5. Pruebas en suero de leche artificial.

Al hacer las primeras pruebas del biosensor en muestras de leche se observó que la señal obtenida era muy baja, en otras palabras, las nanopartículas no agregaban y se asumió como hipótesis que proteínas y lípidos podían ser los causantes de dar mayor estabilidad a las NPs y evitar que reaccionaran ante el NaCl y la presencia de antibiótico.

Como solución a este problema se iniciaron pruebas con distintos métodos de clarificación (eliminación de proteínas y lípidos) para la obtención de suero de leche. Las pruebas realizadas tampoco fueron del todo satisfactorias dado que las NPs agregaban inmediatamente al ser agregadas a las muestras, antes de agregar el NaCl.

Se propuso el análisis de componentes presentes en el suero de leche mediante la preparación de distintos sueros de leche artificiales para evaluar la interferencia de la presencia de ciertos iones y un carbohidrato presentes en el suero, siguiendo las proporciones de la composición de la leche reportadas por (cita requerida) y colun.

Las muestras de suero artificial estuvieron compuestas por:

- Suero artificial 1 (Lactosa, calcio, fosfato, magnesio y fierro)
- Suero artificial 2 (Lactosa, calcio y fosfato)
- Suero artificial 3 (Calcio y fosfato)
- Suero artificial 4 (Calcio)
- Suero artificial 5 (Fosfato)
- Suero artificial 6 (Magnesio)
- Suero artificial 7 (Hierro)

Siguiendo la literatura, los componentes estuvieron presentes en los sueros artificiales en las siguientes concentraciones:

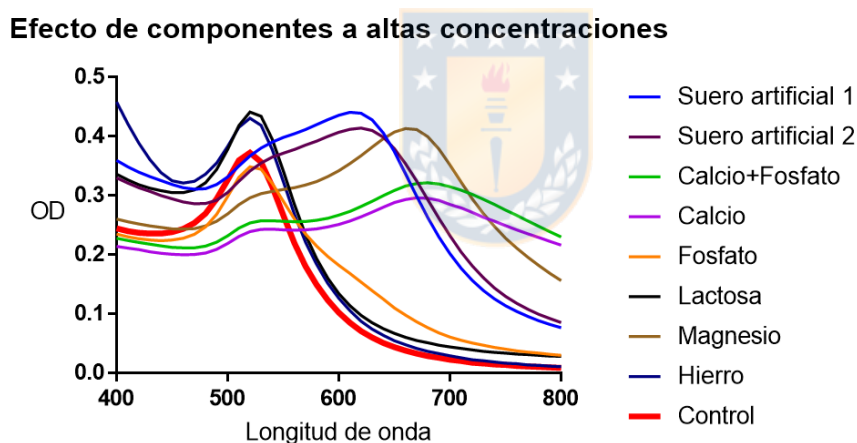


Componente	Concentración [g/mol]
Lactosa	46,6
Calcio	1,18
Fósforo	0,96
Magnesio	0,127
Hierro	0,2

**Cuadro A5.1:** Concentración de principales componentes de la matriz de la leche.

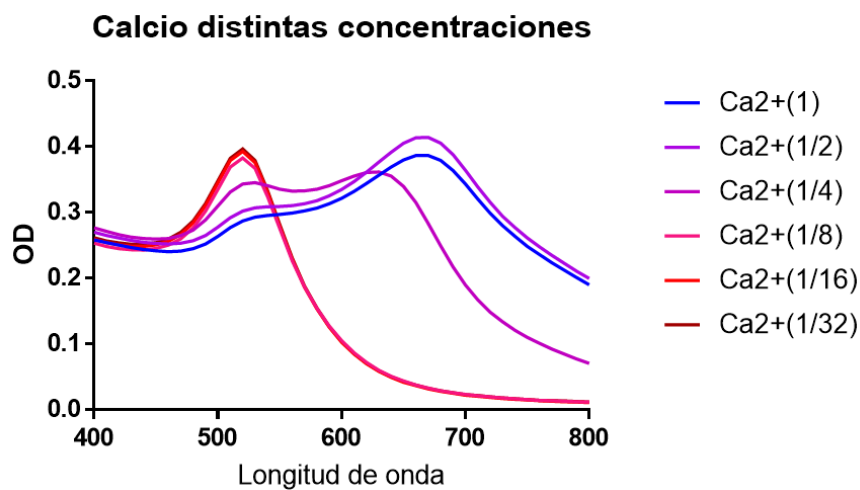
Los resultados mostraron que las muestras de suero artificial que contenían calcio, tenían tendencia a agregar como se ve en la figura A5.1, lo cual es consistente con la teoría ya que al ser el calcio un ión divalente, posee el doble de actividad que el ión sodio.

**Figura A5.1:** Espectros de las muestras de suero artificial con presencia de NPs.

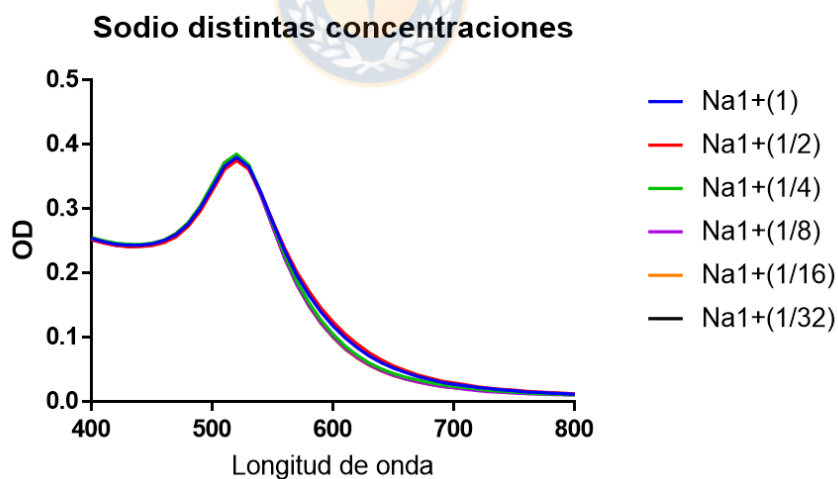


Quedando de manifiesto la interferencia de la presencia de calcio en el suero de leche, se diseñó un experimento para evaluar la actividad del calcio en comparación del sodio. Para esto, se prepararon sueros con calcio y sodio con la misma cantidad de equivalentes, tomando como referencia la concentración típica de calcio en el suero de leche,  $33[nM]$  para el calcio y  $66[mM]$  para el sodio. Los resultados muestran que a mismo número de equivalentes, la interferencia del calcio es crítica en comparación con el sodio que no alcanza a ser suficiente para inducir la agregación en las muestras como se ve en las figuras 2 y 3.

**Figura A5.2:** Cambios en el espectro de las muestras de suero con NPs a distintas concentraciones de calcio (las fracciones de la leyenda indican la fracción de la concentración de calcio normal de la leche).



**Figura A5.3:** Cambios en el espectro de las muestras de suero con NPs a distintas concentraciones de sodio (las fracciones de la leyenda indican la fracción de la concentración de sodio normal de la leche).



**Figura A5.4:** Métrica del ratio 620/520 para las distintas cocentraciones.