

---

# Desarrollo de un biosensor de grafeno inducido por láser para la detección de interacciones entre anticuerpos y antígenos

---

Alejandra Mercedes Sic Canil





UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



**Desarrollo de un biosensor de grafeno inducido por láser para  
la detección de interacciones entre anticuerpos y antígenos**

Trabajo de graduación presentado por Alejandra Mercedes Sic Canil  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2025



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



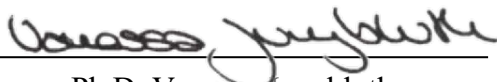
**Desarrollo de un biosensor de grafeno inducido por láser para  
la detección de interacciones entre anticuerpos y antígenos**


Trabajo de graduación presentado por Alejandra Mercedes Sic Canil  
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2025

Vo. Bo.:

(f)   
Ph.D. Vanessa Jungbluth

(f)   
M. Sc. Carlos Esquit

Fecha de aprobación: Guatemala, 20 de noviembre de 2025.

Desde que inicié mi formación universitaria, he tenido el firme propósito de aportar por medio de mi carrera, al bienestar de quienes más lo necesitan. Como estudiante y futura Ingeniera Biomédica, creo firmemente en el potencial que posee nuestro país para desarrollar tecnologías con la capacidad de mejorar la salud y la calidad de vida de las personas. En conjunto con mi asesora, la Ph.D. Vanessa Jungbluth; identificamos la necesidad de promover el desarrollo de tecnologías portátiles y de bajo costo que permitan realizar diagnósticos de manera accesible y eficiente en sectores con recursos limitados. Este proyecto representó para mí un desafío multidisciplinario, sin embargo; finalizo este trabajo con la satisfacción de haber dado lo mejor de mí, consciente de que un proyecto con tanto potencial requiere futuras contribuciones. Por ello, extendo una invitación a los estudiantes de Ingeniería Biomédica que vienen detrás de mí, para continuar impulsando el desarrollo tecnológico de biosensores en Guatemala.

Deseo expresar mi gratitud y agradecimiento a mi padre, por recordarme siempre que era capaz de lograr todo lo que me propusiera. A mi madre, por enseñarme con su ejemplo, el significado de la fortaleza y la perseverancia para alcanzar los sueños, sin duda no me alcanzarían las palabras para expresar toda la gratitud que poseo por todo el amor y apoyo incondicional que ambos me brindaron. A mis hermanos, por ser fuente de inspiración; a mis amigas, por regalarme momentos de mucha alegría, que me ayudaron a recargar energías y a mantener el equilibrio; y sobre todo a mi novio, por su amor, paciencia y apoyo incondicional, su amor fue durante estos años de estudio un hogar que me permitió encontrar calma en momentos difíciles.

Asimismo, expreso mi más sincero agradecimiento a la Ph.D. Vannesa Jungbluth, por su guía y acompañamiento constante durante este proceso. A la Ing. Irma, del Departamento de Química, por su valiosa asistencia en la metodología experimental; al Ph.D. José Leal, por su orientación en el área de biosensores electroquímicos; al personal del área D-HIVE, por la confianza depositada en mí para hacer uso del equipo necesario; y a todos mis profesores, quienes contribuyeron con sus enseñanzas y consejos a lo largo de estos años. Finalmente, me agradezco a mí misma; por mantener la constancia aún en los momentos más difíciles, hoy concluyo este ciclo con la certeza de haber crecido tanto personal como profesionalmente. Finalmente, fue un honor y un privilegio ser estudiante de la Universidad del Valle de Guatemala, mi hogar académico durante estos cinco años.

<b>Prefacio</b>	<b>I</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>V</b>
<b>Resumen</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract</b>	<b>VII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>2</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>4</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>6</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	6
4.2. Objetivos específicos . . . . .	6
<b>5. Alcance</b>	<b>7</b>
<b>6. Marco teórico</b>	<b>8</b>
6.1. Biosensores electroquímicos . . . . .	8
6.2. Grafeno inducido por láser (LIG) . . . . .	15
6.3. Interacción antígeno-anticuerpo . . . . .	17
<b>7. Metodología</b>	<b>22</b>
7.1. Diseño de electrodos . . . . .	22
7.2. Fabricación de electrodos . . . . .	23
7.3. Caracterización electroquímica de electrodos . . . . .	24
7.4. Inmovilización de anticuerpos en el electrodo de trabajo . . . . .	25
7.5. Aplicación como biosensor . . . . .	28

<b>8. Resultados</b>	<b>29</b>
8.1. Diseño y fabricación de los electrodos . . . . .	29
8.2. Caracterización electroquímica . . . . .	30
8.3. Inmovilización de anticuerpos . . . . .	33
8.4. Evaluación como biosensor . . . . .	39
<b>9. Discusión</b>	<b>44</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>11. Recomendaciones</b>	<b>51</b>
<b>12. Referencias</b>	<b>52</b>

---

## Índice de figuras

---

1.	Elementos y componentes que conforman a un biosensor . . . . .	8
2.	Sistema de electrodos en mediciones electroquímicas . . . . .	11
3.	Voltamograma proveniente de voltametría cíclica . . . . .	13
4.	Diagrama de Nyquist y circuito equivalente utilizado en el análisis EIS . . . . .	14
5.	Biosensor electroquímico ampliamente utilizado hoy en día . . . . .	15
6.	Proceso de fabricación de LIG a partir de una película de PI . . . . .	16
7.	Comparación entre estructura y composición entre grafeno y óxido de grafeno	17
8.	Estructura de un anticuerpo . . . . .	18
9.	Procesos de inmovilización de un anticuerpo . . . . .	20
10.	Capacitancias en serie producto de la manipulación de la superficie de electrodos	21
11.	Diseños elaborados de electrodos LIG . . . . .	23
12.	Proceso de fabricación de electrodos LIG . . . . .	24
13.	Configuraciones electroquímicas de electrodos LIG según el diseño correspon- diente . . . . .	25
14.	Proceso de oxidación de electrodos LIG . . . . .	26
15.	Proceso de inmovilización covalente de anticuerpos IgG . . . . .	27
16.	Etapas de activación y acoplamiento covalente . . . . .	27
17.	Aplicación de electrodos como biosensor . . . . .	28
18.	Diseños fabricados de electrodos LIG . . . . .	30
19.	Voltamograma correspondiente a la caracterización electroquímica . . . . .	31
20.	Correlación lineal entre los valores de corriente obtenidos en la oxidación (Picos anódicos / $I_pA$ ) y reducción (Picos catódicos / $I_pC$ ) . . . . .	32
21.	Caracterización electroquímica con PBS realizada mediante EIS de LIG . . . . .	33
22.	EIS proveniente de la evaluación de la inmovilización no covalente de Anti-IgG (26h de incubación) . . . . .	34
23.	EIS proveniente de la evaluación de la inmovilización no covalente de Anti-IgG (28h de incubación) . . . . .	35
24.	Comparación de resultados obtenidos mediante EIS tras incubaciones de 26 h y 28 h . . . . .	36
25.	Comparación de resultados obtenidos mediante EIS de LIG y GO . . . . .	37
26.	EIS con PBS tras inmovilización covalente de IgG (Caso 1) . . . . .	38

27.	EIS con PBS tras inmovilización covalente de IgG (Caso 2) . . . . .	39
28.	Evaluación de bioreconocimiento entre Anti-IgG e IgG (incubación de 26 h) .	40
29.	Evaluación de bioreconocimiento entre Anti-IgG e IgG (incubación de 28 h) .	41
30.	Evaluación de bioreconocimiento tras una inmovilización covalente (Caso 1) .	42
31.	Evaluación de bioreconocimiento tras una inmovilización covalente (Caso 2) .	43

El diagnóstico y control de enfermedades infecciosas y no infecciosas en países en vías de desarrollo sigue siendo un desafío. En Guatemala, el panorama es crítico debido a limitaciones en cuanto a recursos financieros, humanos y de infraestructura. Los procesos de diagnóstico comunes incluyen la recolección y el transporte de muestras biológicas desde el punto de atención hacia un laboratorio centralizado. Posteriormente, estas son procesadas por parte de personal experimentado; en general, los resultados se encuentran disponibles días después, ocasionando diagnósticos y tratamientos tardíos. Inmunoensayos como ELISA son herramientas ampliamente utilizadas en el diagnóstico de enfermedades al basarse en la detección de interacciones antígeno-anticuerpo; sin embargo, poseen requerimientos no aptos para su aplicación en puntos de atención con recursos limitados.

En el presente trabajo de graduación se desarrollaron y fabricaron electrodos de grafeno inducido por láser (LIG) capaces de proporcionar una prueba de concepto para evaluar interacciones entre antígenos y anticuerpos, los cuales fueron caracterizados mediante voltametría cíclica (CV) y espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Se obtuvo una reproducibilidad adecuada entre los electrodos, validando la estabilidad del proceso de fabricación. Adicionalmente, se evaluaron dos métodos de inmovilización de anticuerpos, observándose variaciones en la capacitancia interfacial del sistema tanto tras la inmovilización como durante las pruebas de bioreconocimiento mediante EIS. Los resultados demostraron la capacidad y versatilidad de los electrodos como prueba de concepto para establecer una metodología inicial; sin embargo, se resalta la importancia de la optimización de esta, así como de establecer comparaciones con técnicas estandarizadas en futuras investigaciones.

**Palabras clave:** grafeno inducido por láser, biosensores, electroquímica, voltametría cíclica, espectroscopía de impedancia, inmovilización de anticuerpos, IgG, Anti-IgG..

The diagnosis and control of infectious and non-infectious diseases in developing countries remain a major challenge. In Guatemala, the situation is critical due to financial, human, and infrastructure limitations. Common diagnostic processes include the collection and transportation of biological samples from the point of care to a centralized laboratory. These samples are later processed by trained personnel; however, results are typically available several days afterward, leading to delayed diagnoses and treatments. Immunoassays such as ELISA are widely used tools for disease diagnosis based on antigen–antibody interactions; nevertheless, they require conditions that are not suitable for implementation in low-resource settings.

In this graduation project, laser-induced graphene (LIG) electrodes were developed and fabricated to provide a proof of concept for evaluating antigen–antibody interactions. These electrodes were characterized using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Adequate reproducibility was achieved among the electrodes, validating the stability of the fabrication process. Additionally, two antibody immobilization methods were evaluated, showing variations in the interfacial capacitance of the system after immobilization and during biorecognition tests through EIS. The results demonstrated the capability and versatility of the electrodes as a proof of concept to establish an initial methodology; however, further optimization and comparison with standardized techniques are highlighted as essential steps for future research.

**Keywords:** laser-induced graphene, biosensors, electrochemistry, cyclic voltammetry, impedance spectroscopy, antibody immobilization, IgG, Anti-IgG..

El diagnóstico oportuno de enfermedades en países en vía de desarrollo presenta un desafío en la región, dado a recursos limitados en cuanto a infraestructura, acceso a tecnología y recursos humanos. Por su parte, Guatemala carece de infraestructura adecuada, así como de servicios integrados de laboratorio disponibles en puntos de atención. En general el proceso estándar para el diagnóstico de enfermedades requiere de un proceso en el cual los resultados se encuentran disponibles tiempo después, ocasionando tratamientos tardíos.

Con ello se planteó el desarrollo de un biosensor LIG capaz de detectar interacciones entre antígenos y anticuerpos como prueba de concepto para el desarrollo de tecnologías accesibles como alternativa al diagnóstico convencional de enfermedades. Con ello se diseñaron y fabricaron electrodos LIG, seguido de una caracterización de estos mediante voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica. Posteriormente se realizaron dos estrategias de inmovilización de anticuerpos (covalente y no covalente) y con ello la realización de pruebas de bioreconocimiento.

De tal forma que en los capítulos siguientes se presentan los antecedentes (capítulo 2) más relevantes que describen los procesos empleados en la actualidad para el diagnóstico de enfermedades, así como la relevancia que poseen los biosensores hoy en día; seguido por un análisis de la situación a nivel regional y nacional, sobre los retos que se afrontan en el diagnóstico accesible de enfermedades en entornos con recursos limitados, planteando la necesidad del desarrollo de alternativas (capítulo 3). Posteriormente se explican los objetivos generales y específicos de este proyecto (capítulo 4) seguido de la delimitación de los mismos (capítulo 5) a su vez se presentan los fundamentos teóricos (capítulo 6) y metodológicos con mayor profundidad (capítulo 7). Adicionalmente, en el capítulo 8 se describen las pruebas realizadas y los datos obtenidos a partir de las interacciones de bioreconocimiento analizadas, así como la discusión de los resultados obtenidos en el capítulo 9, estos a su vez se concluyen en el capítulo 10, destacando los logros alcanzados y las áreas de mejora en el capítulo 11 para optimizar en la metodología, para que con ello se pueda realizar su posible aplicación en investigaciones futuras orientadas al desarrollo de biosensores aplicables al diagnóstico de enfermedades en la región.

El diagnóstico de enfermedades ha evolucionado desde enfoques basados únicamente en síntomas y observaciones clínicas, hasta métodos que integran biología molecular. Entre estos métodos, el uso de anticuerpos es hoy en día una estrategia bien establecida para el diagnóstico de muchas enfermedades autoinmunes e infecciosas [1]. En el caso de enfermedades infecciosas, los anticuerpos permiten la detección de patógenos de forma indirecta y directa; además, se ha demostrado que la interacción antígeno-anticuerpo ocurre en diversas enfermedades humanas [2]. Esto permite que los inmunoensayos sean técnicas relativamente flexibles para la detección de numerosas enfermedades [3].

Uno de los inmunoensayos más comunes es el método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), esta es una técnica ampliamente utilizada que hace uso de anticuerpos, su aplicación implica la detección y cuantificación de proteínas (por ejemplo, proteínas patógenas, antígenos y anticuerpos) [4]. Si bien, ELISA es una técnica estándar en muchas aplicaciones, esta técnica depende en su mayoría de un entorno de laboratorio, además de proporcionar resultados en períodos de tiempo relativamente largos [5]. Como consecuencia de las limitaciones de la técnica, surgió la necesidad de examinar técnicas bionanalíticas alternativas; de esta forma en los últimos años los biosensores han surgido para complementar técnicas como ELISA en la detección de enfermedades [3].

Los biosensores son dispositivos analíticos que convierten una reacción bioquímica/biológica en una señal fisicoquímica medible; estos contienen un elemento de bioreconocimiento en contacto espacial directo con un elemento de transducción [3]. Entre ellos, los biosensores basados en anticuerpos son denominados inmunosensores, el rendimiento de estos depende de factores críticos como la capacidad de la superficie del biosensor para inmovilizar elementos de reconocimiento (moléculas biológicas) manteniendo su actividad natural, la accesibilidad del elemento de reconocimiento al analito y una baja adsorción inespecífica realizada por la superficie sólida que conforma al sensor, de tal forma que las propiedades fisicoquímicas de la interfaz/superficie del sensor juegan un papel importante [6]. Asimismo, entre las diversas técnicas de traducción empleadas en biosensores, los métodos electroquímicos son los más comúnmente utilizados para la detección analítica de biomarcadores [7]. Dentro de estos,

las técnicas de impedancia han destacado en el monitoreo de cambios en las propiedades eléctricas que surgen de eventos de bioreconocimiento en las superficies de los biosensores [8].

El control y diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas y autoinmunes en países en vías de desarrollo continúa siendo un desafío, tanto las enfermedades transmisibles como las no transmisibles representan una importante carga para los sistemas de salud pública [9]. Pese a que, en promedio, la asignación de recursos ha aumentado en Latinoamérica y el Caribe, aún se enfrentan problemáticas en la región, en cuanto a infraestructura, acceso a tecnología y recursos humanos [10].

En Guatemala el panorama en cuanto al diagnóstico de enfermedades es crítico, el país afronta brechas en la eliminación y control de estas, dado a que se cuenta con recursos financieros insuficientes dirigidos al área de salud, una deficiencia de personal para asegurar el acceso geográfico, una alta rotación de este, falta de técnicos especializados y una cobertura limitada en idiomas locales. Asimismo, el país carece de infraestructura adecuada, servicios integrados de laboratorio disponibles para realizar un abordaje de enfermedades a nivel local y poca coordinación entre departamentos. De igual forma, la cadena de suministros de productos sanitarios para abordar esta problemática presenta fallas en el sistema de distribución, en la capacidad de almacenamiento y los sistemas de adquisición no son eficientes. Como consecuencia, existe una limitación en la capacidad a nivel local para recopilar, analizar e interpretar datos [11].

En general, el proceso estándar para el diagnóstico de enfermedades infecciosas comunes incluyen la recolección y el transporte de muestras biológicas (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, muestras de tejido) desde el punto de atención a un laboratorio centralizado para el posterior procesamiento de las muestras por parte de personal experimentado. Luego los resultados se encuentran disponibles (generalmente días después), de esta forma el laboratorio notifica a los clínicos para proceder a un tratamiento,[12]. Debido a las desventajas en cuanto equipo, personal especializado y tiempo en el proceso estándar, el uso de biomarcadores o interacción de biomoléculas como las presentes entre anticuerpos-antígenos, poseen un desempeño importante en la detección de enfermedades y el seguimiento de tratamientos, ya que puede ser implementado como mecanismo de especificidad,[7]. Por lo que los inmuno-sensores podrían representar una solución viable, ya que estos dispositivos ofrecen ventajas

como simplicidad y rentabilidad, exhiben una buena sensibilidad, selectividad en condiciones optimizadas y ofrecen resultados concretos en tiempos relativamente cortos en comparación con los métodos tradicionales de diagnóstico, por lo que los pacientes podrían proceder más rápido a un tratamiento. En algunos casos se necesitan concentraciones bajas de muestras, esto hace que los inmunosensores sean aptos para lograr un diagnóstico eficiente en puntos de atención ya que pueden lograr una detección eficiente en una plataforma portátil, [5].

Entre los materiales más prometedores para el desarrollo de biosensores portátiles, el grafeno inducido por láser (LIG) ha despertado un gran interés en su aplicación como biosensor debido a propiedades como una estructura macroporosa tridimensional, buena conductividad y sencillo proceso de fabricación, al ser un modelado directo y sin químicos, [13].

#### 4.1. Objetivo general

Desarrollo de un biosensor de grafeno inducido por láser de bajo costo, capaz de detectar interacciones entre anticuerpos y antígenos para su posible aplicación como diagnóstico accesible de enfermedades en Guatemala.

#### 4.2. Objetivos específicos

- Fabricar electrodos de grafeno inducidos por láser empleando polímero Kapton.
- Caracterizar electroquímicamente los electrodos realizando voltametría cíclica, utilizando ferricianuro de potasio y espectroscopia de impedancia.
- Inmovilizar anticuerpos sobre la superficie del electrodo de trabajo.
- Evaluar la interacción entre el anticuerpo inmovilizado y antígenos mediante espectroscopía de impedancia electroquímica.

El presente proyecto tiene como alcance el desarrollo y evaluación inicial de un biosensor de grafeno inducido por láser (LIG) diseñado para detectar interacciones entre anticuerpos y antígenos. El enfoque principal se centra en la reproducibilidad de la fabricación de los electrodos, su caracterización electroquímica y validación preliminar como biosensor a nivel de laboratorio. Cabe destacar que el proyecto no contempla la validación del biosensor en muestras biológicas reales ni su comparación con métodos clínicos convencionales. Las pruebas se limitan a condiciones controladas de laboratorio, empleando biomoléculas estándar y concentraciones definidas del analito objetivo, por lo tanto los resultados no proporcionan un resultado cuantificable, más bien una interpretación teórica de los cambios de la superficie del electrodo de interés tras su manipulación en la metodología.

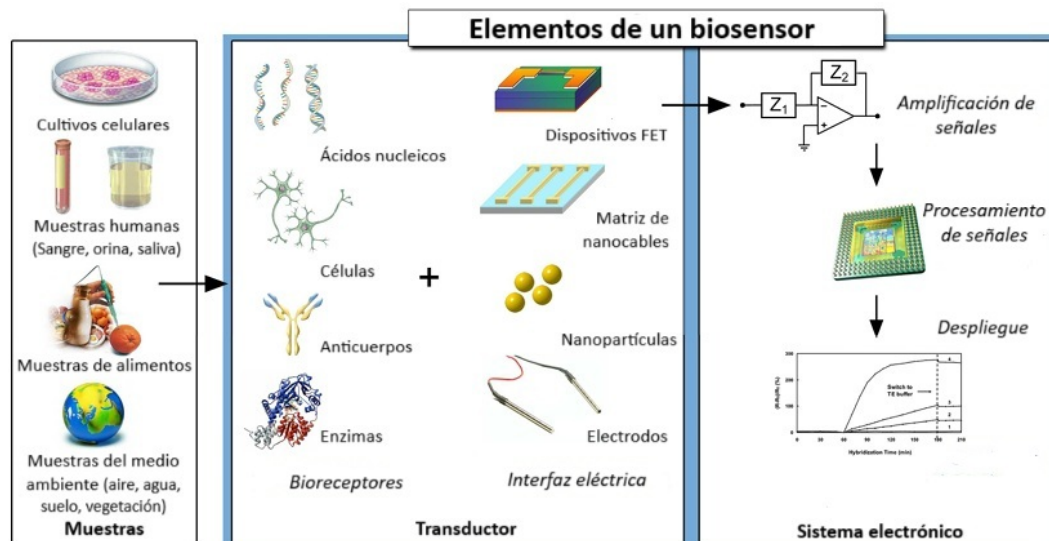
Así mismo, el desarrollo propuesto corresponde a una etapa de prueba de concepto, de esta forma se buscaba realizar una evaluación inicial diseñada para mostrar si la metodología y el producto final serían factibles y si poseen un potencial práctico, así como la obtención de evidencia preliminar sobre la eficacia y viabilidad de un primer estudio, de tal forma que el resultado obtenido no necesariamente se encuentra desarrollado para una implementación final. Los resultados esperados permitieron establecer una base tecnológica y metodológica para investigaciones futuras, orientadas a optimizar la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad de la funcionalidad de los electrodos fabricados como biosensor.

## 6.1. Biosensores electroquímicos

Un biosensor se define como un dispositivo analítico que convierte una respuesta biológica en una señal cuantificable y procesable [14]. Típicamente, un biosensor se compone de bioreceptores que se unen de manera específica a un analito; una interfaz donde ocurre un evento biológico específico que da lugar a una señal que es captada por un elemento transductor y un sistema electrónico, en el cual la señal del transductor se convierte en una señal que puede ser procesada y presentada a través de una plataforma (Figura 1) [8].

**Figura 1.** Elementos y componentes que conforman a un biosensor

En la imagen se presentan las muestras que pueden ser analizadas mediante un biosensor, así como los elementos de reconocimiento y materiales que conforman a un transductor, a su vez se visualiza un posible análisis y procesamiento de señales producto de los eventos de reconocimiento, modificado de [8].



De manera breve, los biosensores electroquímicos se caracterizan por incluir transductores electroquímicos [7], lo cual confiere a estos dispositivos la capacidad de detectar elementos biológicos empleando señales analíticas obtenidas de interacciones de bioreconocimiento, para una posterior conversión a señales eléctricas (voltaje, corriente, impedancia, etc.) [14]. De esta forma, esta clasificación de biosensores incluyen dispositivos que combinan la sensibilidad de métodos electroanalíticos con la selectividad de componentes biológicos [15].

### 6.1.1. Elementos de reconocimiento biológico

Los biosensores son generalmente altamente selectivos dado a la posibilidad de personalizar interacciones de reconocimiento biológico [8]. El propósito principal de un elemento de bioreconocimiento es proporcionar especificidad hacia un analito, la especificidad requiere una afinidad fuerte y selectiva entre el elemento receptor y el analito objetivo [16]. De tal forma que existe una gran variedad que van desde los ocurridos de manera natural hasta los constructos sintéticos [16]. Los elementos de bioreconocimiento ocurridos de manera natural como los anticuerpos y las enzimas son constructos derivados biológicamente que aprovechan interacciones fisiológicas para lograr una especificidad, por otro lado; las estructuras artificiales son estructuras diseñadas para imitar interacciones fisiológicas definidas [16].

Como se mencionó con anterioridad, entre los elementos de reconocimiento biológico naturales se incluyen a las enzimas, las cuales son proteínas que actúan como biocatalizadoras eficientes para aumentar la velocidad de una reacción biológica [8]. Cabe mencionar que las enzimas logran una especificidad hacia bioanalitos mediante cavidades de unión ocultas dentro de su estructura 3D. Debido a esto, los biosensores enzimáticos son de naturaleza biocatalítica lo que significa que la enzima captura y convierte catalíticamente el analito objetivo en un producto medible [16]. Entre otros elementos de reconocimiento, los anticuerpos son estructuras proteicas tridimensionales, dicha estructura crea un patrón de reconocimiento único con alta especificidad hacia un antígeno [8].

Por su parte, los aptámeros son ácidos nucleicos sintéticos de una sola cadena (Secuencias de ADN o ARN) que se unen selectivamente a moléculas diana y pueden plegarse en estructuras bidimensionales y tridimensionales, las dianas presentan un alto rendimiento de unión debido a una mayor densidad superficial y menor bloqueo espacial [17]. Debido al carácter de ácido nucleico de los aptámeros, estos son estructural y funcionalmente estables en un amplio rango de temperaturas y condiciones de almacenamiento [17]. Así mismo, existen biosensores basados en células completas, los cuales emplean microbios, hongos y algas, ya que poseen elementos potenciales de bioreconocimiento en la construcción de biosensores basados en células completos, las células pueden interactuar con una amplia variedad de analitos, gracias a su buena sensibilidad, alta selectividad y capacidad de detección estos biosensores se emplean con éxito para monitorización ambiental, análisis de alimentos, farmacología, metales pesados, pesticidas, etc, [17].

Finalmente recientemente se han incrementado el uso de nanopartículas (NPs) y micropartículas (MPs) como una nueva categoría de biorreceptores, estas permiten una mayor sensibilidad, especificidad y versatilidad en la detección de analitos[17] Los NPs incluyen metales nobles (Au, Ag, Pt), óxidos metálicos, puntos cuánticos y nanotubos de carbono, estos pueden actuar como etiquetas, plataformas de inmovilización o bien como catalizadores

[17]. Por su parte, en los MPs destacan las partículas magnéticas, que permiten la separación y concentración de analitos bajo campo magnético, también se emplean en combinación con NPs para amplificación de señales [18]

### 6.1.2. Elemento transductor

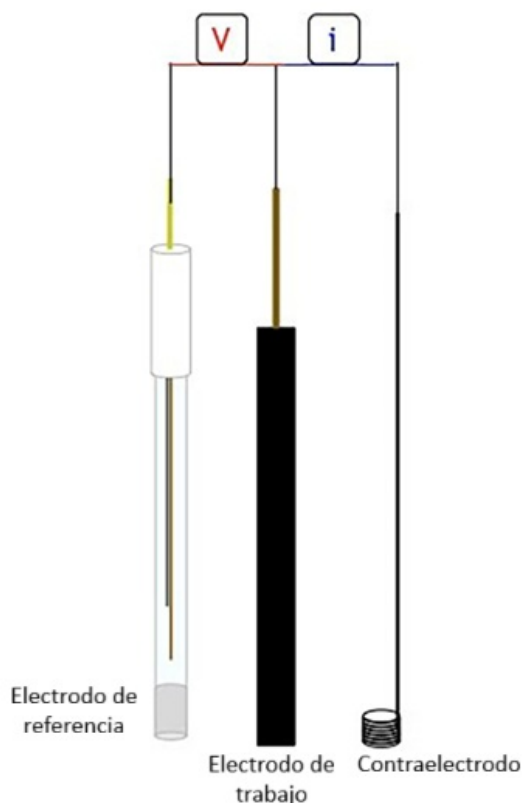
Un transductor compone la parte del biosensor que convierte la información producida por un evento biológico en una señal medible [19]. Estos pueden ser ópticos, térmicos, gravimétricos y electroquímicos, su clasificación depende del tipo de material utilizado y el mecanismo de conversión de la señal [20].

Los transductores ópticos permiten el cambio de características ópticas de la superficie cuando el analito y el elemento de reconocimiento forman un complejo, estos están diseñados con diversas etiquetas como fluoróforos o cromóforos para detectar los eventos de unión y amplificar la señal [20]. Por su parte, los biosensores gravimétricos responden a un pequeño cambio en la masa del material de unión como proteínas o anticuerpos en la superficie, produciendo una señal medible, estos emplean cristales de cuarzo piezoeléctricos delgados que vibran a una frecuencia específica según la corriente aplicada y la masa del material detectado [17].

Un transductor térmico aprovecha las características básicas de reacciones exotérmicas y/o endotérmicas, de tal forma que permite la medición de la energía térmica absorbida o liberada durante la reacción, la energía térmica total absorbida/liberada o el cambio de temperatura medido por el biosensor térmico es proporcional a la entalpía ( $H$ ) y al número total de moléculas de producto creada en la reacción bioquímica e inversamente proporcional a la capacidad calorífica de la reacción [17]. Finalmente, una transducción electroquímica se centra en una celda electroquímica, donde comúnmente se emplea un formato de tres electrodos (trabajo, contraelectrodo y referencia), (Figura 2). Específicamente, el electrodo de trabajo es el que proporciona la superficie en la cual se lleva a cabo la reacción para detectar a un analito [3].

**Figura 2.** Sistema de electrodos en mediciones electroquímicas

En la imagen se muestra la configuración de electrodos en un sistema electroquímico, en el cual se emplea un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo. Modificado de [21].



El electrodo de referencia, comúnmente se encuentra constituido de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ; este se emplea para mantener un potencial conocido estable. Por otro lado, el contraelectrodo permite el flujo de corriente entre él y el electrodo de trabajo, procurando que la reacción en este pueda ocurrir [8]. Dado a sus funciones específicas, dichos electrodos deben ser tanto buenos conductores como químicamente estables, así mismo; estos pueden fabricarse a partir de múltiples materiales y utilizando diferentes procesos de fabricación [3].

Los métodos electroanalíticos se consideran una de las ramas más importantes de la química analítica, estos determinan la cantidad/concentración de una sustancia (analito) específica mediante la medición de sus propiedades electroquímicas, dichas técnicas son simples, fáciles de miniaturizar y en general, más accesibles, [22]. Normalmente, en bioelectroquímica, la reacción/interacción bajo investigación generaría ya sea una corriente medible (amperométrica), un potencial medible o acumulación de carga (potenciométrica) o alteraría de manera medible las propiedades conductivas de un medio (conductométrica) en los electrodos [8].

### 6.1.3. Principios de transducción electroquímica

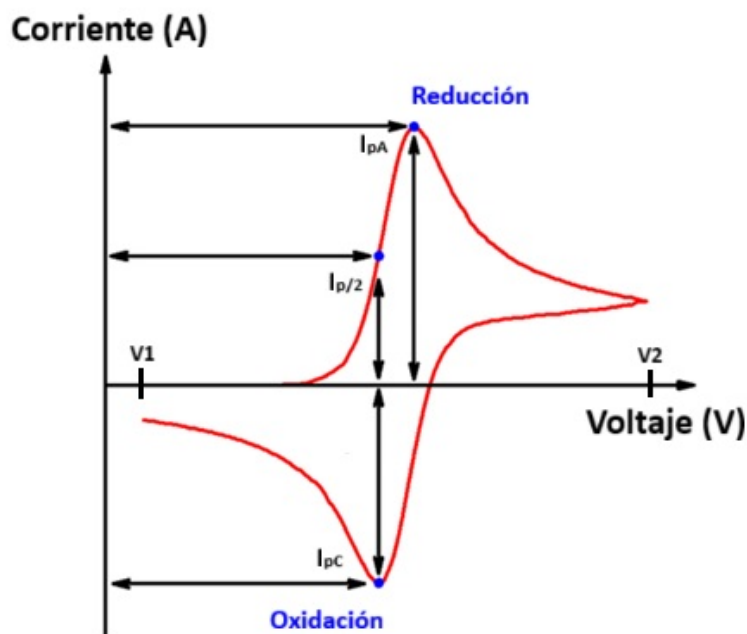
Entre los principios de transducción electroquímica se menciona a la voltametría, en esta se obtiene información sobre un analito al variar un potencial y luego medir la corriente resultante. Dicha variación se puede realizar de distintas formas, dando lugar a distintas categorías de voltametría como la voltametría cíclica, de barrido lineal, de pulso y de onda cuadrada [8].

La voltametría cíclica (CV) es la técnica más común, simple y rápida para adquirir información cualitativa y cuantitativa sobre reacciones biológicas redox,[22]. En esta, se realiza un barrido entre dos valores de voltaje ( $V_1$  y  $V_2$ ) a una tasa fija. Usualmente las mediciones inician en  $V_1$  sin embargo; cuando el voltaje alcanza el valor de  $V_2$ , el escaneo se invierte y se realiza un barrido de vuelta a  $V_1$  (Figura 3). Cabe mencionar que la tasa de escaneo es un factor crítico, ya que la duración del escaneo debe proporcionar tiempo suficiente para permitir que ocurra una reacción química significativa [8].

A medida que se aumenta el voltaje hacia el potencial de reducción electroquímica del analito, la corriente también aumentará. Al aumentar el voltaje hacia  $V_2$  más allá de este potencial de reducción, la corriente disminuye, habiendo formado un pico a medida que la concentración del analito cerca de la superficie del electrodo disminuye, ya que se ha superado el potencial de oxidación. A medida que se invierte el voltaje para completar el escaneo hacia  $V_1$ , la reacción comenzará a reoxidar el producto de la reacción inicial [8]. La tensión se mide entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, así mismo Las mediciones obtenidas se representan como corriente vs tensión, también conocido como voltamograma (Figura 3) [8].

**Figura 3.** Voltamograma proveniente de voltametría cíclica

En la imagen se muestra un voltamograma estándar obtenido mediante VC, en el cual se visualiza el pico de corriente anódico (reducción) y el pico de corriente catódico (oxidación), así como el rango de voltajes en los cuales se lleva cabo el escaneo (de  $V_1$  a  $V_2$ ). Modificado de [23].

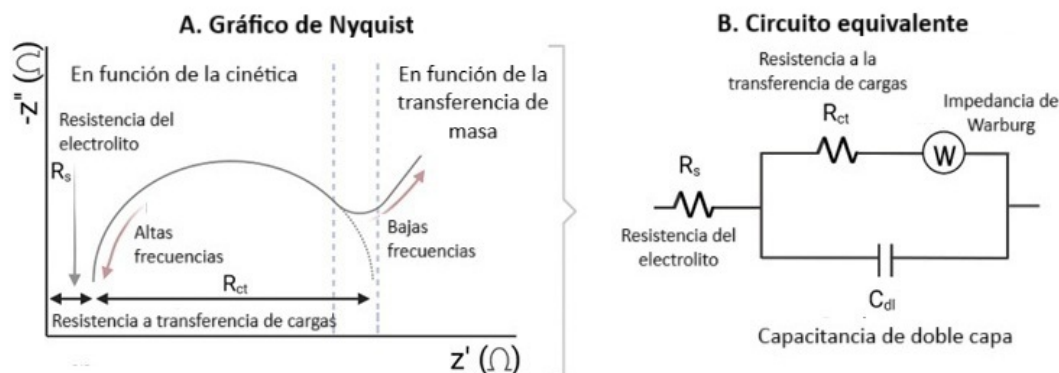


La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) es un método amperométrico ampliamente utilizado para estudiar y comprender las propiedades de una interfaz [8] que combina el análisis de impedancia tomando en cuenta sus componentes reales e imaginarios, para proporcionar información sobre la resistencia eléctrica y la reactancia de la superficie analizada, debido a esto EIS posee la capacidad de estudiar cualquier propiedad del material o procesos específicos que puedan influir en dichos parámetros. Por lo tanto, EIS se ha empleado como herramienta útil en el desarrollo y análisis de materiales para la transducción de biosensores. [8].

De manera más amplia, dicha técnica realiza un análisis en un amplio rango de frecuencias, que pueden ir desde 1 mHz hasta 1 MHz, generadas por dispositivos que funcionan como estaciones de trabajo electroquímico disponibles comercialmente [22]. Así mismo el potencial aplicado de una señal AC sinusoidal de pequeña amplitud que varía en función del rango de frecuencias seleccionado. Los datos provenientes de esta técnica se obtienen al cambio de impedancia de acuerdo a la frecuencia aplicada. La representación gráfica más comúnmente utilizada es el gráfico de Nyquist (figura 4 (A)), que muestra la relación entre los componentes real e imaginario de la impedancia. El eje imaginario ( $-Z''$ ) hace referencia a los valores de conductancia y es ubicado en el eje Y, mientras que un valor imaginario positivo en el eje real ( $Z'$ ) hace referencia a la inductancia y este se coloca en el eje X [24]. Adicionalmente, junto con este método usualmente se construye un circuito equivalente para tomar en cuenta las interacciones en la interfaz electrodo/electrolito, como la formación de la doble capa o la transferencia de carga (Figura 4 (B)), [24].

**Figura 4.** Diagrama de Nyquist y circuito equivalente utilizado en el análisis EIS

En la imagen se visualiza un gráfico de Nyquist típico para un EIS, así como las fases que se presentan en cada etapa de la medición (A), a su vez se muestra un circuito equivalente capaz de realizar una representación del sistema (B). Modificado de [24].



#### 6.1.4. Biosensores electroquímicos en aplicaciones médicas

Los biosensores electroquímicos son uno de los métodos más utilizados para la detección de todo tipo de enfermedades, debido a ventajas como tiempos de detección cortos, simplicidad instrumental, bajo costo y portabilidad, ofreciendo un gran potencial para aplicaciones en puntos de atención [5]. Dicho potencial se debe en gran parte a la existencia de biomarcadores, estos son un indicador característico de algún proceso biológico, patógeno o respuesta farmacológica en una intervención terapéutica, con alguna propiedad que puede medirse y evaluarse objetivamente. El uso de un biomarcador apropiado que haga que el procedimiento de detección sea altamente sensible y selectivo es de vital importancia. En la detección de enfermedades, se han desarrollado diversas estrategias basadas en biomarcadores específicos. Hoy en día se sabe que los antígenos/anticuerpos, así como las series de ADN/RNA, enzimas y otras biomoléculas (por ejemplo, proteínas) son las más comúnmente usadas [7]. De esta forma, los biosensores representan tecnologías diagnósticas prometedoras ya que pueden detectar biomarcadores en fluidos corporales como sudor, sangre, heces u orina [14].

Un ejemplo de esto, es el desarrollo un biosensor específico y sensible que empleó plataformas electroquímicas para la detección de inmunoglobulinas producidas contra SARS-CoV-2 en un estudio realizado por Yakoh et al. (2020), en dicho estudio se reportó que la presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2 interrumpió la conversión redox del indicador, resultando en una disminución de la respuesta de corriente, demostrando que dicho biosensor electroquímico fue efectivo en sueros clínicos reales de pacientes y con ello promoviendo el desarrollo de nuevas alternativas diagnósticas para COVID-19 [25]. Por otro lado, los biosensores de glucosa son el ejemplo más común de biosensores electroquímicos, estos suelen consistir de un lector portátil digital y un chip que contiene una configuración de tres electrodos, en el cual la determinación selectiva de la concentración de glucosa en las muestras es catalizada por la función enzimática de la glucosa oxidasa cargada sobre la superficie del electrodo de trabajo (Figura 5) [26].

**Figura 5.** Biosensor electroquímico ampliamente utilizado hoy en día  
En la imagen se visualiza un biosensor electroquímico de glucosa, el cual hoy en día es uno de los biosensores maás completos y sofisticados. Modificado de [26].



## 6.2. Grafeno inducido por láser (LIG)

Desde su descubrimiento, el grafeno inducido por láser (LIG) ha recibido una atención creciente debido a su buena conductibilidad eléctrica, propiedades mecánicas, ópticas, térmicas, fabricación rápida y bajo costo, así como por su potencial en los campos de la electrónica portátil y en los sensores biológicos que requieren alta flexibilidad y versatilidad, [27].

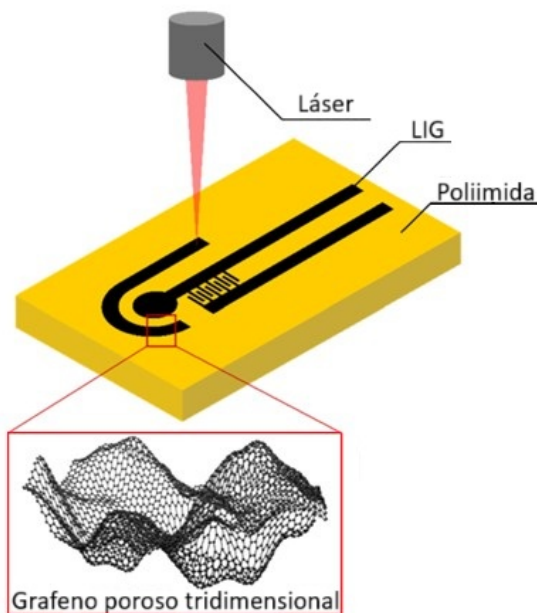
### 6.2.1. Fabricación de LIG

En 2014 se descubrió que polímeros como la poliimida (PI) podían ser convertidos directamente en grafeno poroso utilizando una máquina láser de CO<sub>2</sub> [28]. Durante la irradiación con láser se provoca en una película de PI la generación fototérmica de grafeno debido al aumento de temperatura local de la película (Figura 6). El rápido aumento de la temperatura localizada en el sustrato de PI debido a la irradiación láser rompe los enlaces C-O, C=O y N-O, dando lugar a la recombinación del enlace C-C. En otras palabras, los átomos de carbono sp<sub>3</sub> se convierten fototérmicamente en átomos de carbón sp<sub>2</sub> mediante la irradiación láser pulsada. Cabe destacar que la formación de morfología de grafeno poroso se debe a la rápida desgasificación del PI calentado [28].

Dicho proceso de carbonización inducido por láser se puede dividir en las siguientes etapas: (1) ruptura de la nanoestructura de la superficie, (2) grafitización de fibras y (3) transición de fibras a partículas carbonizadas, [28]. Debido a diversos experimentos se sabe que parámetros como la longitud de onda del láser, la potencia de salida, distancia focal y la distribución de pulso afectan el rendimiento de LIG,[5].

**Figura 6.** Proceso de fabricación de LIG a partir de una película de PI

En la imagen se visualiza la inducción de grafeno a partir de películas poliimida por medio del efecto térmico de un láser de CO<sub>2</sub>. Modificado de [6].



Adicionalmente, por medio de este método de directo de fabricación se puede realizar cualquier patrón complejo de grafeno deseado en películas de PI previamente realizado en softwares de diseño, facilitando los procedimientos de fabricación de dispositivos eléctricos personalizados [5].

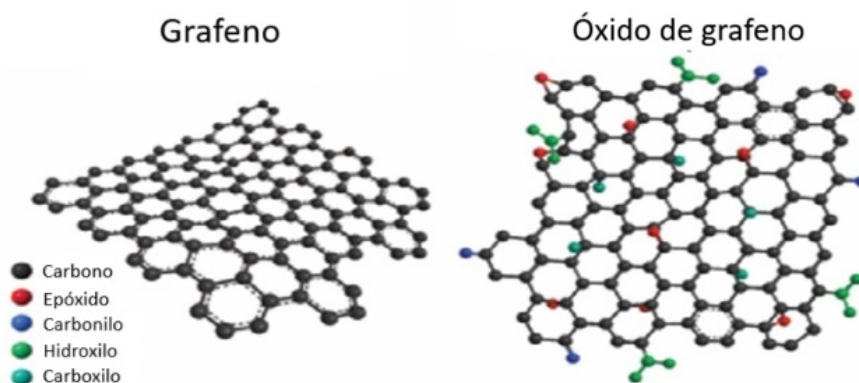
### 6.2.2. Aplicación de LIG como biosensor

Los sensores electroquímicos basados en LIG muestran un gran potencial en la detección de muestras biológicas, este se ha utilizado como transductor de biosensores involucrados en la conversión de las interacciones entre un receptor y moléculas objetivo en mediciones detectables [19]. Adicionalmente características como su conductibilidad eléctrica, rendimiento electroquímico, capacidad de inmovilizar diferentes moléculas entre otros [19], se han desarrollado una gran variedad de dispositivos LIG, que aprovechan estas características en diverso campos [27].

Cabe destacar que algunas propiedades especiales del grafeno solo son accesibles si está funcionalizado con grupos orgánicos como hidroxilo, carboxilo o amino, por lo que algunos derivados de grafeno como el óxido de grafeno (GO), tienen numerosos grupos funcionales en sus estructuras como hidroxilo, epóxido, carbonilo y carboxilo (Figura 8), generados por un proceso de oxidación por medio de una mezcla de ácidos fuertes y agentes oxidantes [19], que les ayudan a interactuar con otras moléculas, ya que los grupos que contienen oxígeno y los dominios sp<sub>2</sub> permiten que el grafeno y sus derivados se unan a otras moléculas a través de enlaces covalentes y no covalentes [29].

**Figura 7.** Comparación entre estructura y composición entre grafeno y óxido de grafeno

En la imagen se realiza una comparación entre la estructura de grafeno (el cual únicamente se conforma de carbono) y la estructura de óxido de grafeno, el cual además de carbono posee grupos epóxido, carbonilo, hidroxilo y carboxilo. Modificado de [29].



### 6.3. Interacción antígeno-anticuerpo

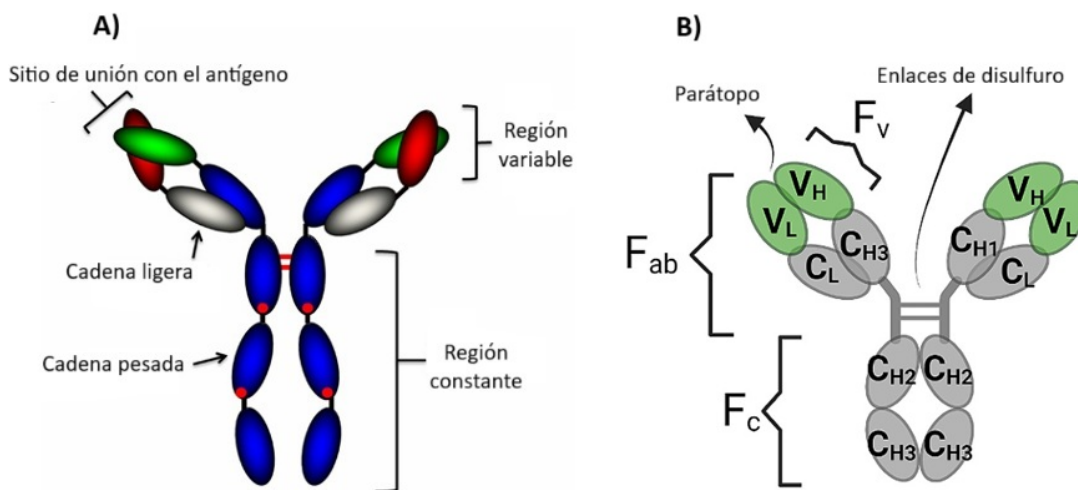
El sistema inmunológico juega un papel importante en la protección del cuerpo contra organismos infecciosos, que son potencialmente dañinos para el huésped [6]. Un antígeno puede ser una proteína, polisacáridos y otras moléculas procedentes de patógenos, células huésped alteradas o incluso fuentes sintéticas, estas desencadenan respuestas inmununitarias fundamentales y esenciales para la inmunidad adaptativa al ser identificados como extraños o no propios en el organismo [30]. Una vez que se reconoce a un antígeno, el sistema inmunológico adquirido crea células inmunitarias específicamente diseñadas para atacar ese antígeno. La inmunidad adquirida es controlada por linfocitos, que son los encargados de la secreción de inmunoglobulinas (Igs/Anticuerpos) de tal forma que la inmunidad adquirida crea memoria inmunológica después de una respuesta inicial de un patógeno específico, conduciendo a respuestas mejoradas a posibles encuentros posteriores con ese patógeno [6].

Los anticuerpos son glicoproteínas séricas altamente solubles involucradas en los mecanismos de defensa del sistema inmunológico [24]. Estos pueden dividirse en cinco clases dependiendo de las secuencias de la región constante de su cadena pesada: IgM, IgD, IgG, IgE y IgA. La estructura básica de un anticuerpo se puede subdividir en dos áreas distintas: el fragmento de unión al antígeno (fab) y el fragmento constante (fc) [6].

Un anticuerpo tiene cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que se encuentra unidas por enlaces de disulfuro (Figura 8 (A)) [6]. Las cadenas pesadas se encuentran compuestas por una región variable ( $V_H$ ) y tres regiones constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Las cadenas ligeras se encuentran compuestas por una región variable ( $V_L$ ) y una región constante ( $C_L$ ) (Figura 8 (B)) [24].

**Figura 8.** Estructura de un anticuerpo

En la imagen se ilustra la estructura de un anticuerpo, el cual está conformado por un sitio de unión con un antígeno (parte activa), dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de región constante (A), a su vez de ilustra la composición de cada cadena (B). Modificado de [6] y [24].



El componente Fab del anticuerpo contiene la región variable del fragmento (F<sub>v</sub>), donde se pueden localizar las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Las CDRs forman los sitios de unión del antígeno con el anticuerpo y confieren especificidad al antígeno [6]. Así mismo, es importante mencionar que las plataformas de detección analítica que miden la reacción conjugada específica entre anticuerpos y antígenos se denominan inmuno-sensores. En general, biocompatibilidad y la unión de alta afinidad de los anticuerpos hacia los antígenos hacen que esta molécula sea llamativa para su uso en diversos campos como en diagnósticos [19].

### 6.3.1. Inmovilización de anticuerpos en una superficie

Es importante mencionar que el rendimiento de un bio/inmuno-sensor depende de tres factores críticos: (1) su capacidad para inmovilizar moléculas biológicas manteniendo su actividad natural; (2) la accesibilidad del elemento de reconocimiento al analito relevante en solución; y (3) baja adsorción no específica al soporte sólido. De esta forma, las propiedades fisicoquímicas de la interfaz o superficie del sensor juegan un papel significativo en lograr una inmovilización óptima de los anticuerpos y a limitar la adsorción no específica [6]. De esta forma, el paso de inmovilización afecta el límite de detección y la sensibilidad, por lo tanto se debe evitar una inmovilización del anticuerpo en la superficie del sensor a través de los sitios de unión al antígeno (regiones V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>), ya que daría como resultado una reducción de la actividad del anticuerpo con el antígeno, por lo que se debe procurar realizar una inmovilización a través de la región F<sub>c</sub>, [6].

En la literatura se han informado varios enfoques para realizar una inmovilización de anticuerpos, los dos principales que se han empleado para la fabricación de inmuno-sensores son la inmovilización no covalente y la covalente [6].

De esta forma en la inmovilización no covalente, los anticuerpos se pueden adsorber en la superficie del sensor mediante simples fuerzas no covalentes, incluyendo enlaces electrostáticos, iónicos, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals, [6]. La adsorción es un método atractivo debido a su simplicidad, sin embargo; el rendimiento general de los inmunosensores basados en anticuerpos físicamente adsorbidos suele ser bajo debido a la falta de orientación funcional de los anticuerpos (Figura 9 (A)) [6].

A su vez, la inmovilización covalente de anticuerpos en diversas superficies sólidas es el enfoque de inmovilización más estudiado, ya que este puede facilitar el almacenamiento a largo plazo [6]. La unión covalente implica la modificación de la superficie para lograr grupos reactivos como grupos hidroxilo, tiol, carboxilo o amino en la superficie para una posterior inmovilización, [6]. Cabe mencionar que se pueden aplicar varios métodos químicos para lograr la fijación de anticuerpos en la superficie de un electrodo sólido, [24].

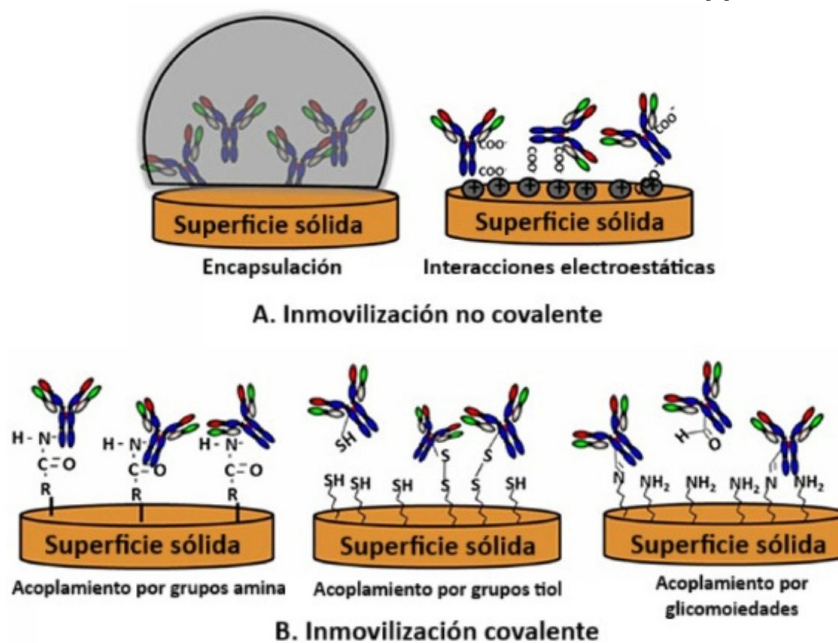
Dada la alta estabilidad de los enlaces covalentes, los métodos de modificación covalente tienen una gran importancia al funcionalizar grafeno con biomoléculas. Cabe destacar que superficies como GO poseen abundantes grupos funcionales que contienen oxígeno, como los grupos carboxilo e hidroxilo, lo que las convierte en sustratos ideales para inmovilizar biomoléculas que también contienen estos grupos funcionales. Es bien sabido que la mayoría de las biomoléculas (como proteínas, enzimas, anticuerpos, péptidos, etc.) contienen numerosos grupos amino, que podrían formar enlaces amida estables con los grupos carboxilo en la superficie de GO con la asistencia de química especializada, anclando así las biomoléculas a los nanomateriales [31].

La inmovilización de un elemento de bioreconocimiento que puede unirse selectivamente a la molécula objetivo relevante es altamente crítica para el rendimiento de biosensores. En particular, los anticuerpos son las moléculas biológicas más populares en el desarrollo de biosensores, donde se inmoviliza un antígeno en la superficie de transductor y se detecta un anticuerpo, o bien el anticuerpo se inmoviliza como bioreceptor en el transductor para detectar un antígeno [24].

El objetivo de la inmovilización covalente es lograr un enlace estable e irreversible entre el elemento de bioreconocimiento y el electrodo, con una densidad de empaquetamiento y orientación adecuadas que mantengan una alta accesibilidad y afinidad de unión para las especies objetivo. Los biosensores electroquímicos para la detección de patógenos han utilizado típicamente técnicas establecidas para la preparación de la capa de bioreconocimiento [3], de tal forma que es necesaria la realización de una funcionalización de la superficie del electrodo, para posteriormente proceder a realizar un proceso de inmovilización (Figura 9 (B)) [24].

**Figura 9.** Procesos de inmovilización de un anticuerpo

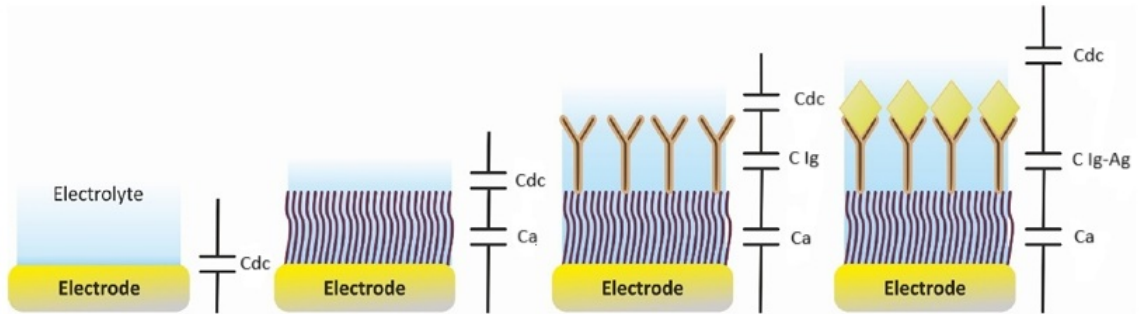
En la imagen se ilustra el proceso de inmovilización no covalente, el cual depende únicamente de interacciones electrostáticas, por otro lado; la inmovilización covalente puede crear enlaces ya sea con grupos amina, tiol o acoplamiento por glicomoidades, entre otros. Modificado de [6].



### 6.3.2. Efecto de la unión antígeno/anticuerpo en la señal EIS

Dado a que EIS en particular puede monitorear de manera sensible los cambios en la capacitancia o la resistencia al transporte de carga asociado con el analito unido al elemento de bioconocimiento, se ha encontrado en esta técnica una amplia aplicación en el desarrollo de inmunosensores, esto se debe a que cuando el anticuerpo interactúa con su correspondiente antígeno, se forma un inmunocomplejo en la superficie del electrodo, lo que dificulta el transporte de electrones. El grado de bloqueo de transporte de electrones depende de la concentración del antígeno unido, [24]. De manera más amplia, la interacción y el contacto del electrodo con el electrolito dan como resultado una capacitancia de doble capa ( $C_{cd}$ ), posteriormente si se realiza un recubrimiento aislante daría como resultado una segunda capacitancia ( $C_a$ ) en serie, luego al funcionalizar el electrodo con anticuerpos se presentaría una tercera capacitancia ( $C_{Ig}$ ) y finalmente al presentarse inmunocomplejos producto de la interacción de antígenos y anticuerpos daría como resultado una variación en las capacitancias ( $C_{Ig/Ag}$ ) en serie (Figura 10).

**Figura 10.** Capacitancias en serie producto de la manipulación de la superficie de electrodos  
 La imagen ilustra la variación en la capacitancia interferencial producida por la interacción en la superficie del electrodo y la solución a analizar, de tal forma que al modificar la superficie se agregan capacitancias en serie en el sistema. Modificado de [32].



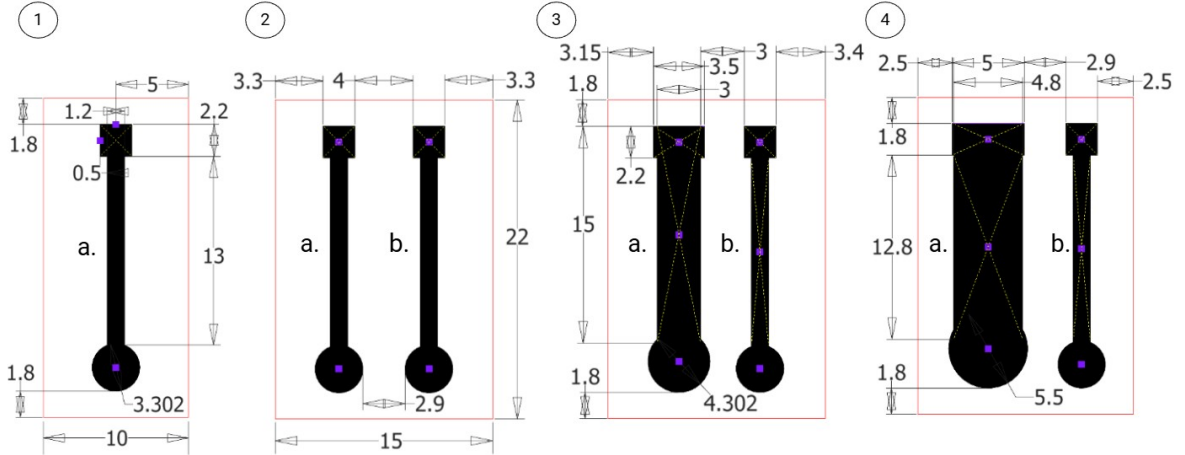
Por lo tanto, los eventos de unión de componentes de anticuerpo antígeno complementarios alteran las propiedades eléctricas en el espacio entre dos electrodos, donde los cambios en la conductividad del espacio corresponden a cambios en el componente de impedancia real  $Zr(\omega)$  y los cambios en la capacitancia del espacio corresponden a cambios en el componente de impedancia imaginaria  $Zi(\omega)$  [8].

## 7.1. Diseño de electrodos

Los electrodos LIG empleados para realizar las mediciones electroquímicas fueron diseñados utilizando el software Autodesk Inventor (Autodesk Inc., San Francisco, CA, EE.UU), en este se realizaron cuatro diseños diferentes (Figura 11), el primer diseño consistió únicamente de un canal, este fue el único diseño cuya área se colocó dentro de una zona rectangular de 10 x 22 mm (Figura 11 (1)). A partir del segundo diseño, todos los electrodos LIG se conformaron por dos canales y se colocaron dentro de una zona rectangular de 15 x 22 mm, de tal forma que el segundo diseño mantenía las mismas dimensiones en sus canales que el establecido en el primero (Figura 11(2)); por otro lado, el tercer y cuarto diseño también se diseñaron con las mismas dimensiones en uno solo de sus canales; sin embargo, el canal restante se elaboró con un área considerablemente mayor (Figura 11(4 y 3)). Así mismo, para la posterior fabricación mediante grabado láser, en dicho software las áreas que se deseaba que fueran inducidas a grafeno se representaron con color negro sólido, mientras que las áreas que se deseaba fueran cortadas estuvieron conformadas por un borde rojo de 0.01 mm de grosor.

**Figura 11.** Diseños elaborados de electrodos LIG

Diseños elaborados en milímetros (mm) de electrodos LIG que contenían un electrodo de trabajo (a) y según el caso, también un contraelectrodos (b), fabricación propia.



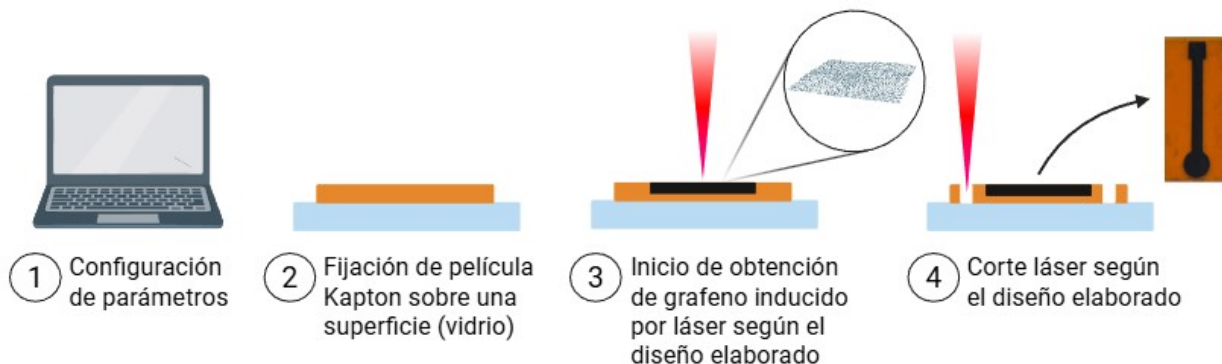
## 7.2. Fabricación de electrodos

Los electrodos diseñados se fabricaron empleando una cortadora láser PLS4.75 (Universal Laser Systems, Scottsdale, Arizona, EE.UU.), para ello se utilizaron películas de poliimida Kapton, las cuales se esterilizaban previamente con etanol cada vez que se procedía a realizar el grabado y corte láser.

Dichas películas se colocaron en una superficie limpia de vidrio que actuó como soporte durante todo el proceso de fabricación. Para evitar un desplazamiento durante la inducción de grafeno y corte láser, los bordes de las películas se fijaron al vidrio empleando goma en barra (Figura 12 (2)). Adicionalmente, se ajustaron los parámetros de potencia y velocidad de la cortadora utilizando el programa Universal Laser Systems Control Panel, con el fin de promover la inducción adecuada de grafeno sobre la superficie de la poliimida Kapton. De tal forma que para la realización de grabado láser (color negro) se utilizó una velocidad de 7.5 % y potencia de 17 %, por otro lado; para realizar el corte láser se utilizó una velocidad de 30 % y una potencia de 100 %. Una vez colocados los parámetros, la cortadora láser comenzó realizando el grabado según el diseño establecido, una vez terminado este, comenzó a realizar el corte y con ello finalizó la fabricación de los electrodos.

**Figura 12.** Proceso de fabricación de electrodos LIG

Para el proceso de fabricación se comenzó con la configuración de parámetros (1), luego con la fijación de la película Kapton (2) y con ello dar inicio al grabado (3) para finalizar con el corte láser (4). Fabricación propia en BioRender.

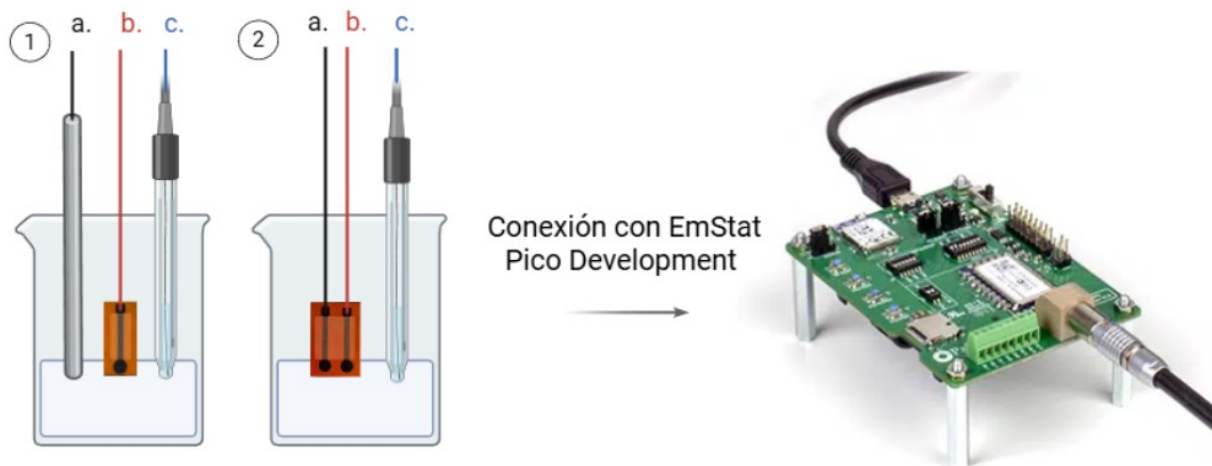


### 7.3. Caracterización electroquímica de electrodos

Para realizar una caracterización electroquímica de los electrodos fabricados, primero se colocó una pieza de Kapton tape en el área de los canales. Luego, se realizó la técnica de voltametría cíclica (VC), en la cual se hizo uso de seis concentraciones diferentes (0, 0.5, 1.5, 2.0, 2.5 mM) de ferricianuro de potasio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) elaboradas con tampón de fosfato salino (PBS) (Calbiochem®, MilliporeSigma, St. Louis, MO, EE. UU.). Cabe destacar que para la realización de las técnicas electroquímicas se empleó el software PStace5 (PalmSens, versión 5.11.1006) y una placa EmStat Pico Development (PalmSens, Houten, Países Bajos), de tal forma que para VC se realizó un barrido de voltaje que dio inicio en -0.6 V hacia 0.9 V, con una tasa de escaneo de 0.1 V/s y un escalón de potencial de 0.01 V por ciclo; por cada concentración, se realizaron tres mediciones de manera aleatoria.

Posteriormente, para evaluar las propiedades de la superficie de los electrodos elaborados, se realizó la técnica de EIS haciendo uso de PBS, el mismo software y placa anteriormente mencionados, con un voltaje DC de 0 V, un rango de frecuencia que dio inicio en 0.1 Hz hacia 100000 Hz y un voltaje AC de 10 mV. Cabe destacar que para ambas pruebas, según el diseño caracterizado, el sistema de electrodos se conformó por un electrodo de trabajo LIG, un contraelectrodo de acero inoxidable o LIG y un electrodo de referencia Ag/AgCl (MCLOIAUZQLP, Ubna Distribution Lle, EE.UU.). Los tres electrodos se colocaron dentro de la solución a analizar para todas las pruebas realizadas, obteniendo así la data necesaria para poder realizar un posterior análisis (Figura 13).

**Figura 13.** Configuraciones electroquímicas de electrodos LIG según el diseño correspondiente. Las configuraciones electroquímicas empleadas para las mediciones se conformaron por el siguiente sistema: el contraelectrodo se conecto al cable de color negro (a), el electrodo de trabajo al cable rojo (b) y el electrodo de referencia al cable azul (c), fabricación propia en BioRender.



## 7.4. Inmovilización de anticuerpos en el electrodo de trabajo

### 7.4.1. Inmovilización no covalente

Para proceder con la inmovilización de anticuerpos de manera no covalente, primero se colocaron los electrodos fabricados sobre cajas Petri, posteriormente; se colocaron 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpos de cabra anti-IgG humana, conjugado FITC (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en cada electrodo de trabajo y se dejó incubar durante 26 y 28 h a 4 °C.

### 7.4.2. Inmovilización covalente

Previo a la realización de una inmovilización covalente, primero fue necesario manipular los electrodos LIG para promover la obtención de grupos carboxilos. De tal forma que se hizo un tratamiento tipo piraña suave conformado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  con una proporción 4:1, colocando la solución únicamente en el electrodo de trabajo durante cinco minutos, posteriormente se realizó un lavado con PBS (Figura 14).

#### Figura 14. Proceso de oxidación de electrodos LIG

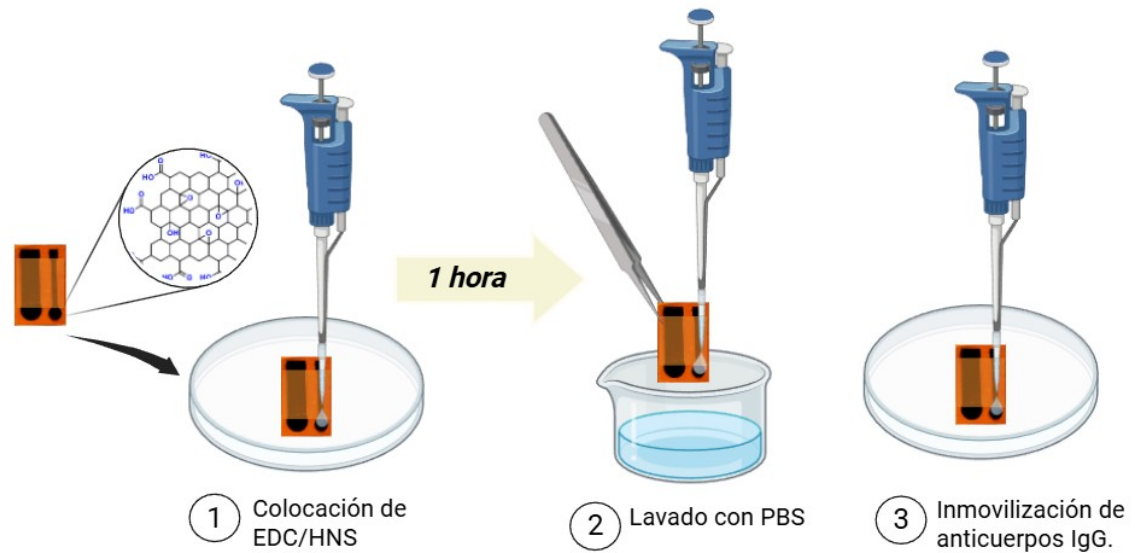
Para realizar el proceso de oxidación de grafeno, se comenzó colocando el electrodo en una caja de petri de vidrio (1), posteriormente se expuso únicamente al electrodo de trabajo a la solución piraña (2), una vez finalizado el proceso se lavaron los electrodos con PBS (3), obteniendo así oxido de grafeno (GO) (4), fabricación propia en BioRender.



Una vez realizada la oxidación de grafeno, se hizo uso de dos diferentes proporciones de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreuro (EDC) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), la primera consistió de 0.4 M de EDC y 0.05 mM de NHS disuelto en PBS mientras que la segunda se conformó de 0.25 de EDC y 0.5 mM de NHS también disuelto en PBS, cada condición fue aplicada en un electrodo de trabajo independiente durante 1 hora (Figura 15), promoviendo así la activación de los grupos carboxilo mediante EDC/NHS y con ello el acoplamiento de 1  $\mu$ M de anticuerpos IgG de suero humano (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) disuelto en PBS mediante los grupos amina para la formación de enlaces covalentes (Figura 15), finalmente; en una cámara húmeda se incubaron los electrodos por una noche a 4 °C.

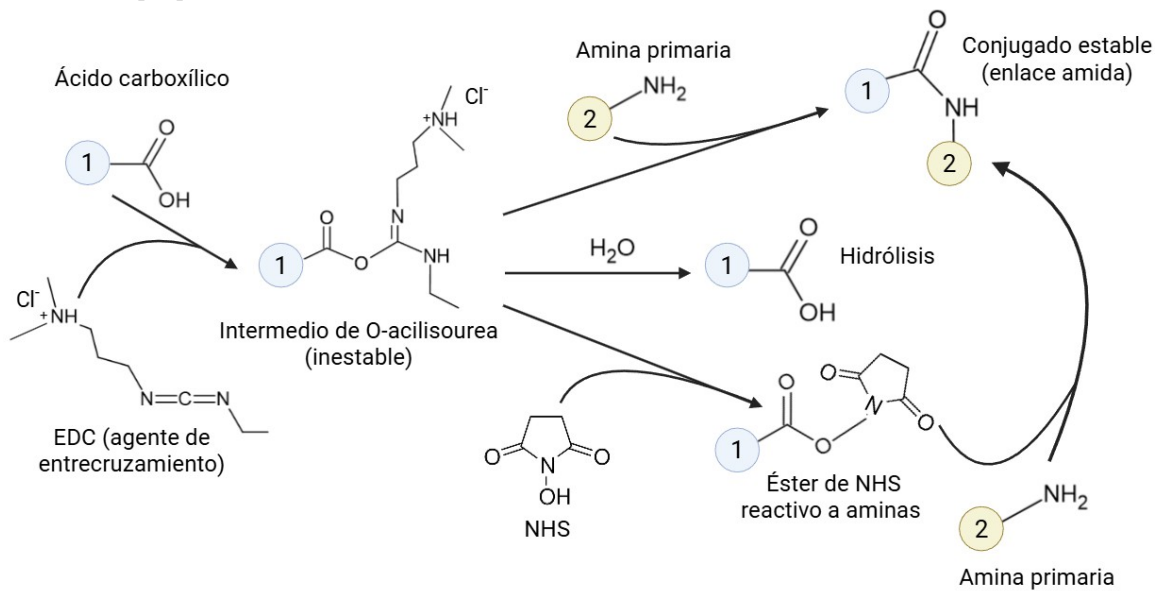
**Figura 15.** Proceso de inmovilización covalente de anticuerpos IgG

Para realizar el proceso de inmovilización covalente se colocó EDC/NHS (caso 1 o caso 2) (1), trascurrido 1 hora se lavo con PBS (2), finalmente se inmovilizaron los anticuerpos IgG (3) y se dejo incubar durante una noche fabricaci3n propia en BioRender.



**Figura 16.** Etapas de activaci3n y acoplamiento covalente

El proceso de inmovilizaci3n covalente implic3 la activaci3n de grupos carboxilos presentes en el grafeno oxidado mediante EDC/NHS, con ello se promovi3 que la superficie fuera altamente reactiva a los grupos amina presentes en los anticuerpos, formando as3 conjugados estables (enlaces amida), fabricaci3n propia en BioRender.

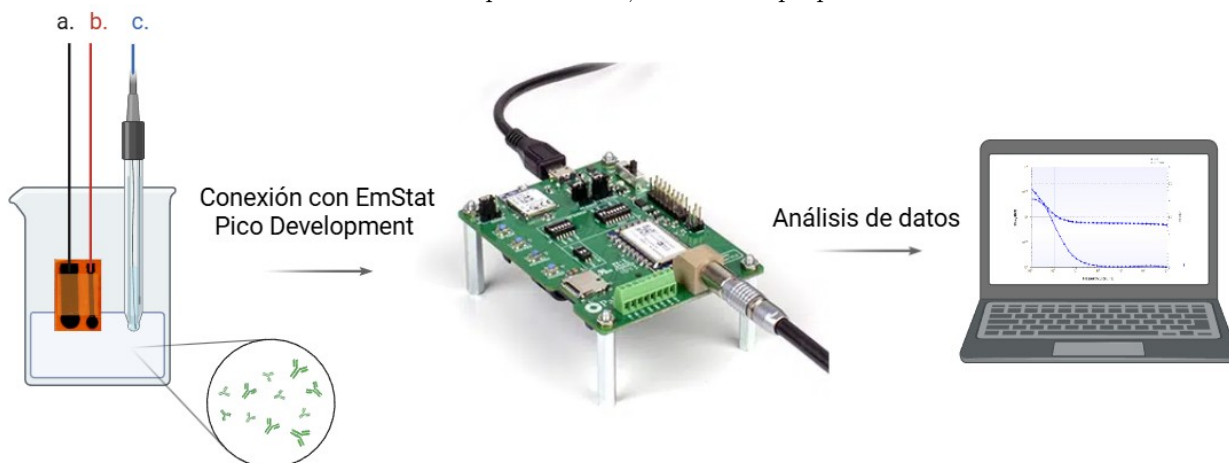


## 7.5. Aplicación como biosensor

Para evaluar las interacciones entre biomoléculas, en el proceso de inmovilización no covalente se elaboró una disolución 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IgG de suero humano en PBS. Con ello se realizaron múltiples pruebas de EIS para medir nuevamente la variación de la superficie de los electrodos tras dicha interacción. Por otro lado, en el proceso de inmovilización covalente se elaboraron tres diferentes disoluciones de Anti-IgG (1, 2.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en PBS. De tal forma que de manera independiente se realizaron pruebas de EIS, evaluando así las variaciones de la superficie y con ello realizando un análisis final de los resultados obtenidos (Figura 17).

**Figura 17.** Aplicación de electrodos como biosensor

Se empleó la configuración electroquímica correspondiente al diseño seleccionado, en el cual: el contraelectrodo se conectó al cable de color negro (a), el electrodo de trabajo al cable rojo (b) y el electrodo de referencia al cable azul (c). Así mismo, dependiendo del tipo de inmovilización empleada, se analizaron diferentes los diferentes analitos descritos previamente, fabricación propia en BioRender.

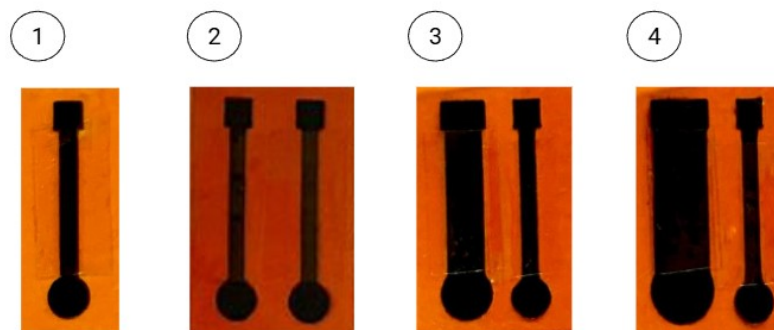


### **8.1. Diseño y fabricación de los electrodos**

Se diseñaron y fabricaron electrodos con cuatro disposiciones diferentes (Figura 18). Las variaciones consistieron en el número de canales y en el área del contraelectrodo presente en cada diseño, de tal forma que el electrodo No.1 consistió únicamente de un canal (electrodo de trabajo), el electrodo No.2 consistió de dos canales de mismas dimensiones (contraelectrodos y electrodos de trabajo), el electrodo No.3 consistió de dos canales; sin embargo, el contraelectrodo en este poseía un área 2.5 veces mayor que el electrodo de trabajo. Finalmente, el electrodo No.4 poseía un contraelectrodo con un área 3 veces mayor al electrodo de trabajo. Lo cual permitió evaluar desempeños electroquímico en pruebas posteriores, así mismo el método de fabricación permitió la obtención de una buena definición de los patrones diseñados.

**Figura 18.** Diseños fabricados de electrodos LIG

El diseño No.1 consistió únicamente de un canal, el cual desempeñó el papel de electrodo de trabajo (1), el diseño No.2 se conformo de dos canales de la misma dimensión, conformado por un contraelectrodo y electrodo de trabajo (2), mientras que el diseño No.3 el primer canal, el cual desempeñó el papel de contraelectrodo poseyó un área 2.5 mayor al segundo canal, el cual se empleo como electrodo de trabajo (3), a su vez en el diseño No.4 el contraelectrodo poseyó un área 3 veces mayor al electrodo de trabajo (4).



## 8.2. Caracterización electroquímica

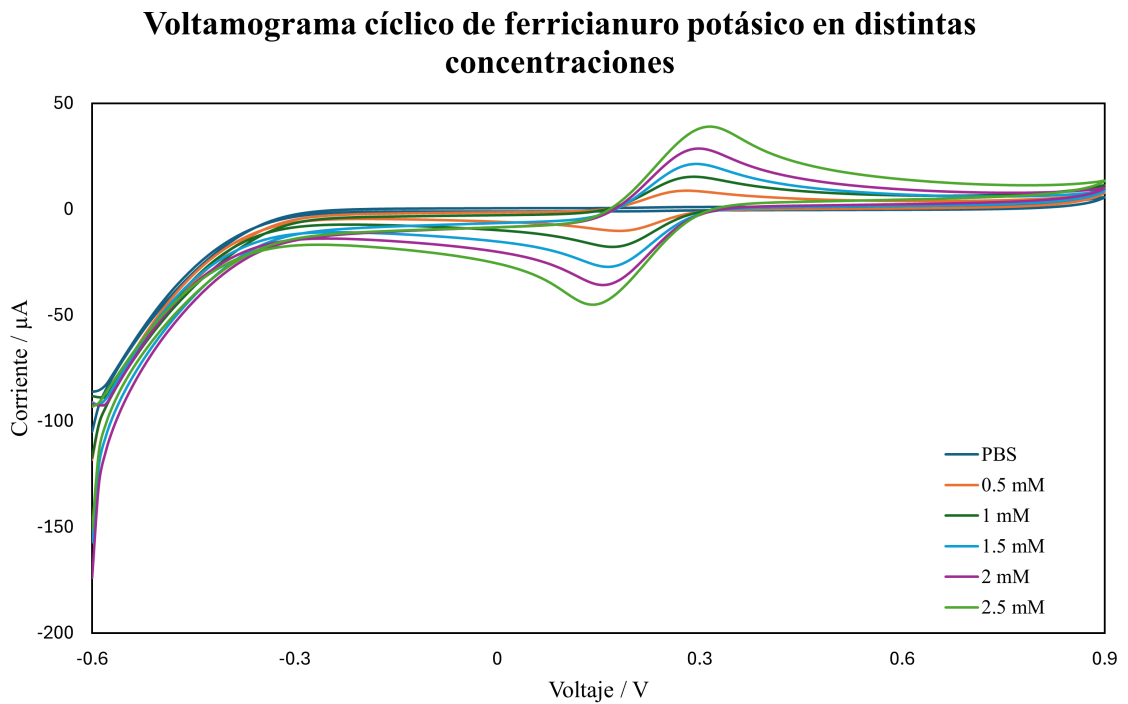
Con el objetivo de evaluar las propiedades electroquímicas de los electrodos previo a su aplicación como biosensor y asegurando su reproducibilidad, se realizó la caracterización electroquímica de los diseños realizados. De tal forma que se realizaron pruebas de voltametría cíclica (VC) y de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) a los electrodos sin ningún tipo de activación y/o modificación de su superficie. Es importante mencionar que los primeros tres diseños fueron caracterizados utilizando una placa EVAL-AD5941; sin embargo, las mediciones obtenidas mostraron señales con alta presencia de ruido y falta de reproducibilidad, impidiendo la obtención de datos confiables. Posteriormente, se reemplazó dicha placa por una EmStat Pico Development, con la cual se repitieron las pruebas de caracterización empleando el electrodo No.4, obteniendo finalmente respuestas electroquímicas consistentes. Debido a esto, los análisis presentados en esta sección corresponden únicamente al electrodo No.4, el cual fue seleccionado como modelo final para procedimientos posteriores.

Para las pruebas de voltametría cíclica se observó el comportamiento de una reacción de oxidación/reducción al aplicarse un barrido de potencial realizado en un ciclo (Figura 19). A partir de ello, se identificaron las variaciones en la corriente medida producto de la variación de la concentración de  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Cabe destacar que por cada concentración se realizaron tres mediciones de manera aleatoria, promediándose para obtener una única gráfica, dando como resultado valores de desviaciones estándar para confirmar la reproducibilidad de las pruebas. De tal forma que fue posible identificar una relación lineal de los resultados obtenidos correspondientes a las corrientes medidas según las diferentes concentraciones; los valores correspondientes a los picos de oxidación presentes entre 0.1 a 0.5 V fueron de  $1.18 \pm 0.08$  en las mediciones con PBS,  $8.74 \pm 0.34$  empleando una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$ ,  $15.22 \pm 0.22$  con una concentración de 1.0  $\mu\text{M}$ ,  $21.38 \pm 1.46$  con una concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ ,  $28.67 \pm 1.59$  empleando una concentración de 2.0  $\mu\text{M}$  y finalmente;  $39.20 \pm 0.84$  con una

concentración de 2.5 uM, observando dicha relación lineal de los datos en (Figura 20); así mismo se obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.992 para estos datos. Por otro lado, en los resultados provenientes de la reducción se obtuvieron en los valores negativos en los picos presentes en -0.1 a 0.3 V, específicamente los valores obtenidos fueron de  $-1.12 \pm 0.10$  en las mediciones con PBS,  $-10.22 \pm 0.21$  empleando una concentración de 0.5 mM,  $-17.84 \pm 0.36$  con una concentración de 1.0 uM,  $-27.20 \pm 1.11$  empleando una concentración de 1.5 uM,  $-35.76 \pm 0.46$  con una concentración de 2.0 uM y  $-45.18 \pm 1.89$  con una concentración de 2.5 uM, así mismo su correlación lineal también se representa en (Figura 20); obteniendo un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.999.

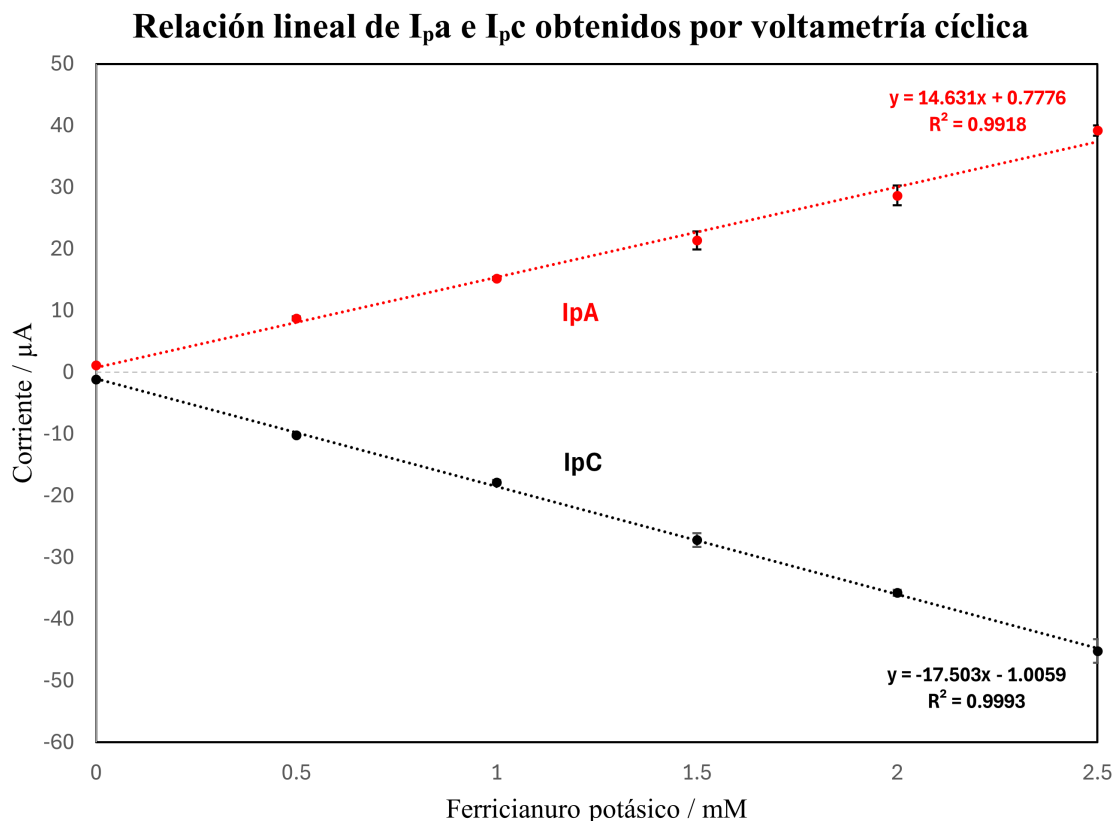
**Figura 19.** Voltamograma correspondiente a la caracterización electroquímica

La caracterización presentada con VC únicamente representa los resultados obtenidos del diseño No.4, así mismo; los datos presentados corresponden al promedio de tres mediciones independientes ( $n = 3$ ).



**Figura 20.** Correlación lineal entre los valores de corriente obtenidos en la oxidación (Picos anódicos /  $I_{pA}$ ) y reducción (Picos catódicos /  $I_{pC}$ )

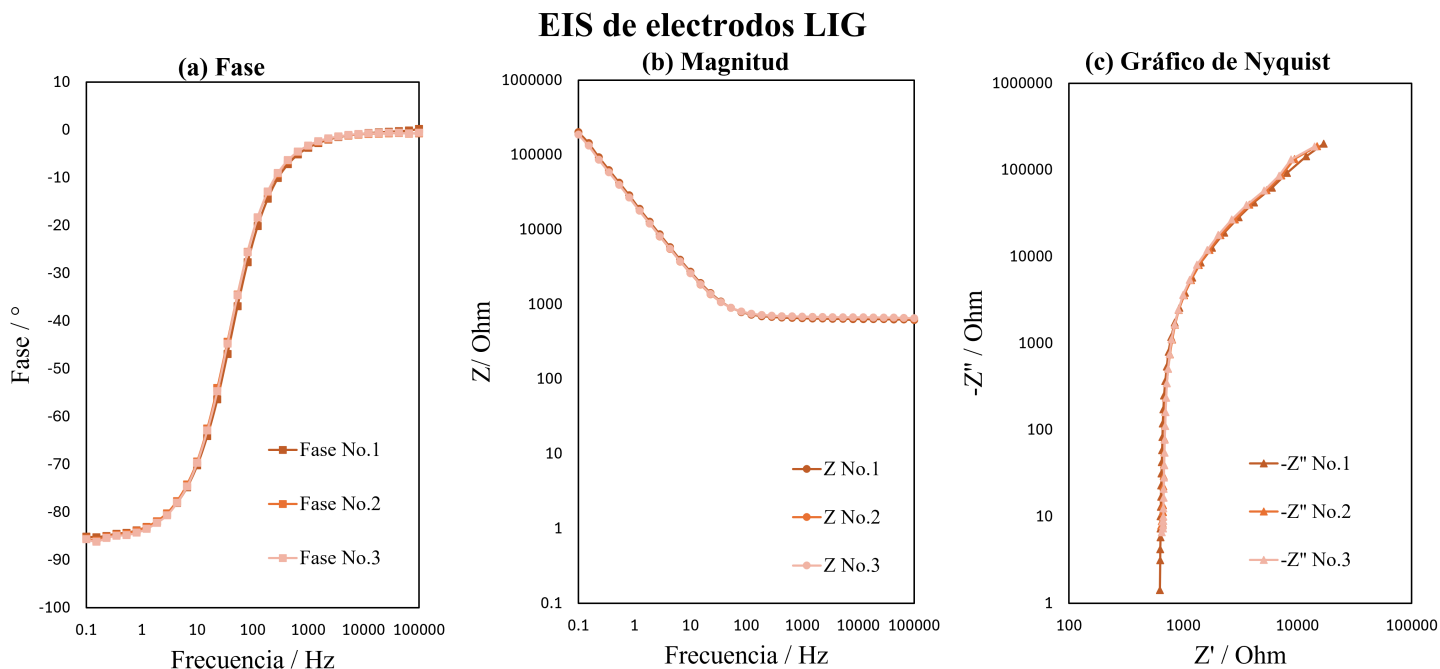
Los datos presentados corresponden al promedio de tres mediciones independientes ( $n = 3$ ), y las barras de error representan la desviación estándar de los valores obtenidos.



Por otro lado, se realizó al electrodo seleccionado tres mediciones de EIS con PBS, dando como resultado tres gráficas en las cuales se presentaron dichas mediciones a modo de verificar la reproducibilidad de los datos obtenidos con EIS, correspondientes a la magnitud de la impedancia, fase y gráficos de Nyquist que descomponen la magnitud en su componente resistiva y en su componente capacitiva, de tal forma que se pudo observar el efecto de la capacitancia producida en la interfaz electrodo-electrolito representada en la fase se visualiza en 21 (a), los valores de impedancia de LIG, los cuales fueron de  $10^5 \Omega$  a  $10^3 \Omega$  en las frecuencias pequeñas y  $600 \Omega$  a  $700 \Omega$  en las frecuencias altas, estas se visualizan en la figura 21 (b), proporcionando información sobre la resistividad de la superficie de LIG sin ninguna modificación, por otro lado; también se visualiza la descomposición de los valores imaginarios y reales de la magnitud en la figura 21 (c), cabe mencionar que las tres mediciones realizadas mostraron un comportamiento consistente entre sí.

**Figura 21.** Caracterización electroquímica con PBS realizada mediante EIS de LIG

Los datos presentados corresponden a tres mediciones independientes ( $n = 3$ ) con PBS del electrodo No.4, de tal forma que se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de la magnitud de la impedancia (b) y un gráfico de Nyquist (c).



### 8.3. Inmovilización de anticuerpos

#### 8.3.1. Inmovilización no covalente de anticuerpos

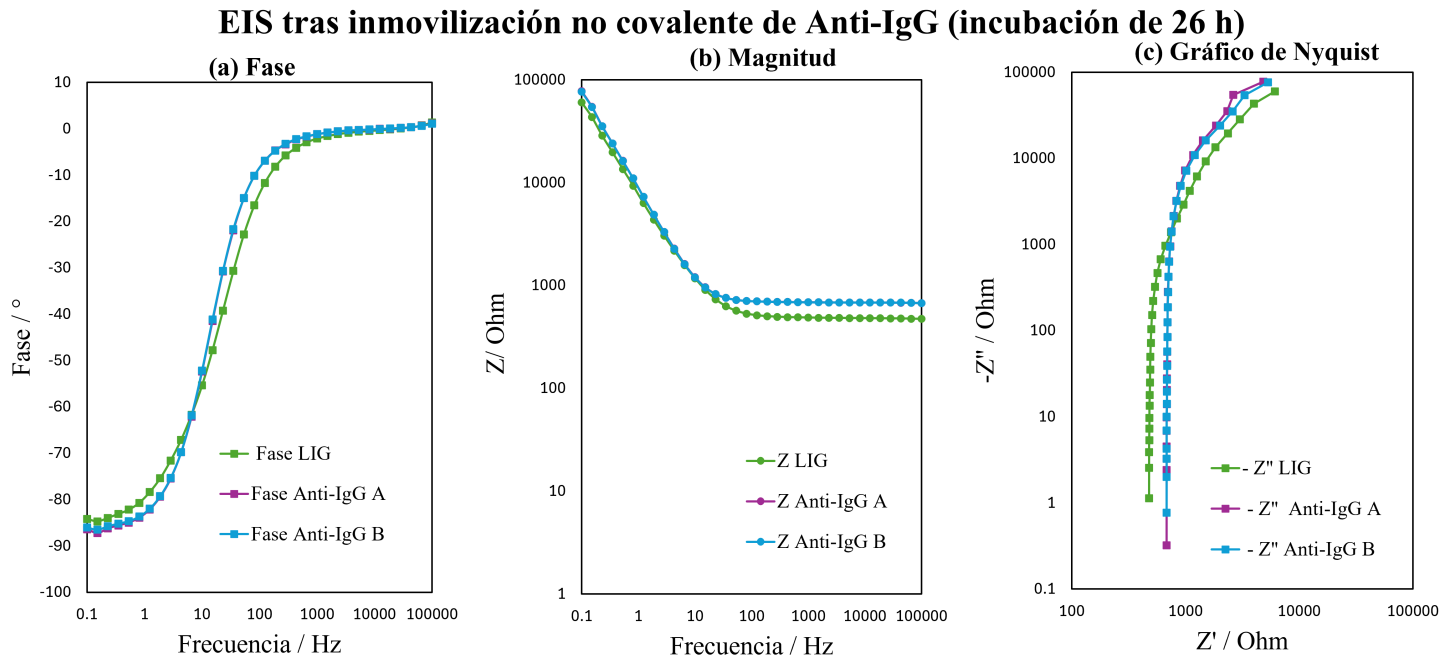
Con el objetivo de inmovilizar anticuerpos sobre la superficie del electrodo de trabajo previo a una evaluación como biosensor, se realizaron dos procedimientos de unión diferentes. En el procedimiento de inmovilización no covalente se realizaron dos diferentes tiempos de incubación, con el fin de realizar una comparación entre estos y su efecto en la adsorción de los anticuerpos Anti-IgG. Así mismo, por cada electrodo evaluado se realizaron dos mediciones consecutivas de EIS con el propósito de evaluar la estabilidad de la capa inmovilizada y verificar la permanencia de los anticuerpos tras una segunda medición. De tal forma que debido a la naturaleza exploratoria de esta prueba, los resultados se presentan de manera descriptiva y no incluyen un análisis estadístico.

De tal forma que tras transcurridos 26 h de incubación de Anti-IgG, se obtuvo una variación perceptible en la impedancia presente en las frecuencias altas (10 a 100,000 Hz), dicho comportamiento corresponde a la componente capacitiva, obteniendo que tras la inmovilización de los anticuerpos la capacitancia aumento levemente (Figura 22 (a)). Por otro lado, también se observa un leve aumento en la componente resistiva presente en el rango de frecuencias bajas (0.1 a 10 Hz) (Figura 22 (b)). Dicha variación en la capacitancia también se observa en la fase, esto al obtener un aumento o tendencia a ángulos negativos correspondiente a un comportamiento capacitivo (Figura 22 (a)). Como resultado, se obtuvieron leves

variaciones en el gráfico de Nyquist, obtenido que la componente imaginaria del sistema tuvo un leve aumento en comparación de las mediciones de EIS de LIG (Figura 22 (c)). De igual forma, se observó un comportamiento consistente en las dos mediciones realizadas, reflejado en las tres gráficas que conformaron dicho análisis.

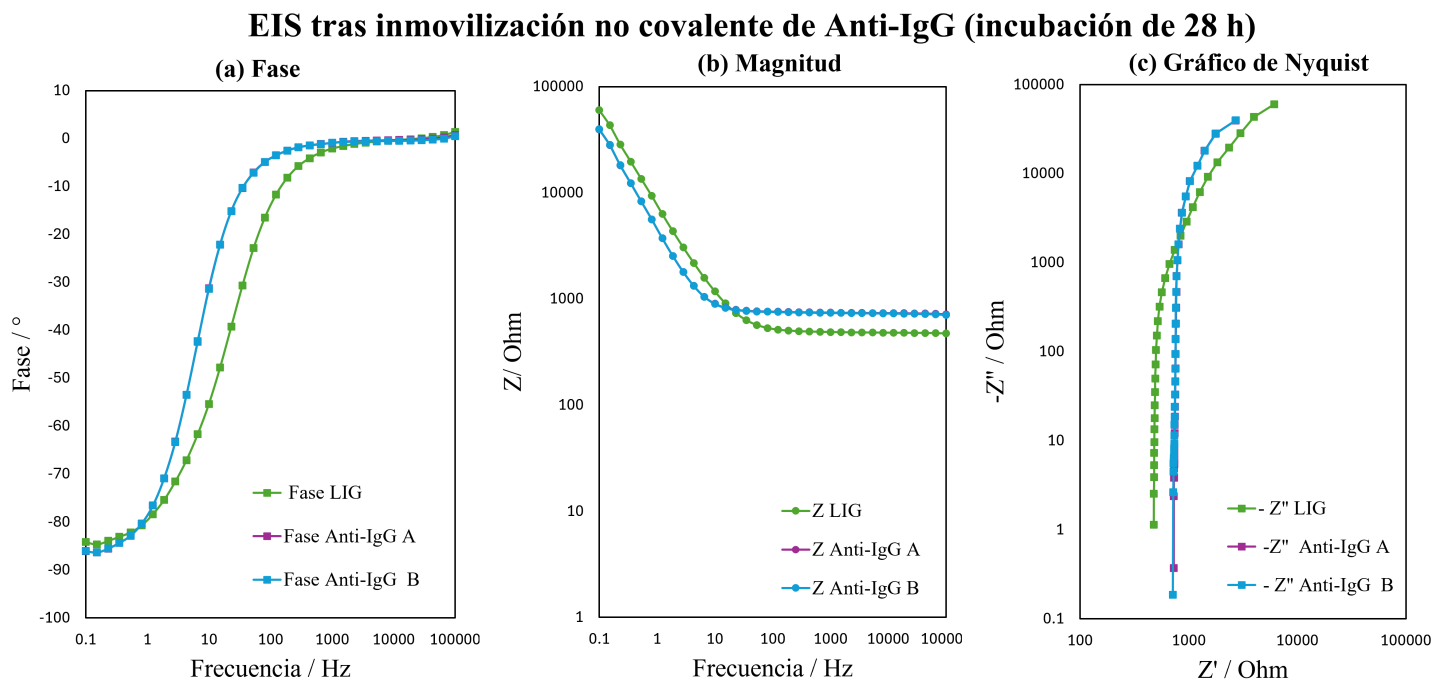
**Figura 22.** EIS proveniente de la evaluación de la inmovilización no covalente de Anti-IgG (26h de incubación)

Cabe destacar que Anti-IgG A y anti-IgG B corresponden a la primera y segunda medición de EIS respectivamente, de tal forma que se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).



Por otro lado, tras transcurridos 28h de incubación se observa una mayor variación en la impedancia presente en las frecuencias altas (10 a 100000 Hz); sin embargo, se observa una reducción en la parte resistiva del sistema, correspondiente a las frecuencias (0.1 a 10 Hz) (Figura 23 (b)). Con ello se obtuvo una variación en el gráfico de Nyquist (Figura 23 (c)), donde nuevamente se obtuvieron leves variaciones en el gráfico de Nyquist, obtenido que la componente imaginaria del sistema con los anticuerpos inmovilizados tuvo un leve aumento. Así mismo, es importante destacar que los datos obtenidos de la primera y segunda medición de EIS fueron consistentes entre sí.

**Figura 23.** EIS proveniente de la evaluación de la inmovilización no covalente de Anti-IgG (28h de incubación)  
 Cabe destacar que Anti-IgG A y anti-IgG B corresponden a la primera y segunda medición de EIS respectivamente, de tal forma que se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

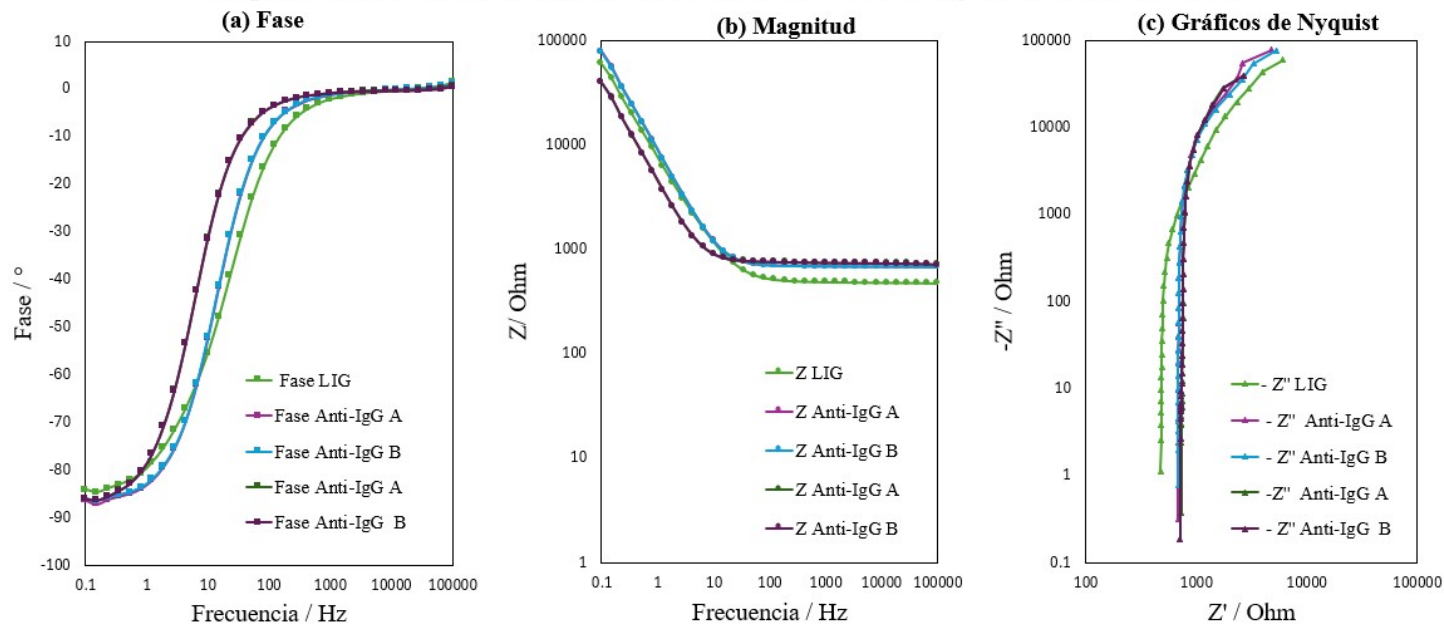


A modo de verificar el rendimiento de los dos distintos periodos de incubación realizados, se realizó una comparación directa entre los resultados obtenidos, de tal forma que se obtuvo que un periodo de incubación de 28 h aumento el comportamiento capacitivo, pero disminuyo levemente el comportamiento resistivo del sistema a comparación con los resultados obtenidos tras una incubación de 26 h, cabe destacar que el comportamiento resistivo del sistema no solo corresponde a la resistencia de la superficie del electrodo evaluado, sino que también se encuentra influenciado por la resistencia de la solución analizada.

**Figura 24.** Comparación de resultados obtenidos mediante EIS tras incubaciones de 26 h y 28 h

Cabe destacar que Anti-IgG 1 corresponde a un periodo de incubación de 16h y Z anti-IgG 2 corresponden a un periodo de incubación de 28 h, por otro lado la notación A y B, hace referencia a la primera y segunda medición de EIS respectivamente, de tal forma que se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

### Comparación de mediciones obtenidas de EIS tras 26 h y 28 h de incubación



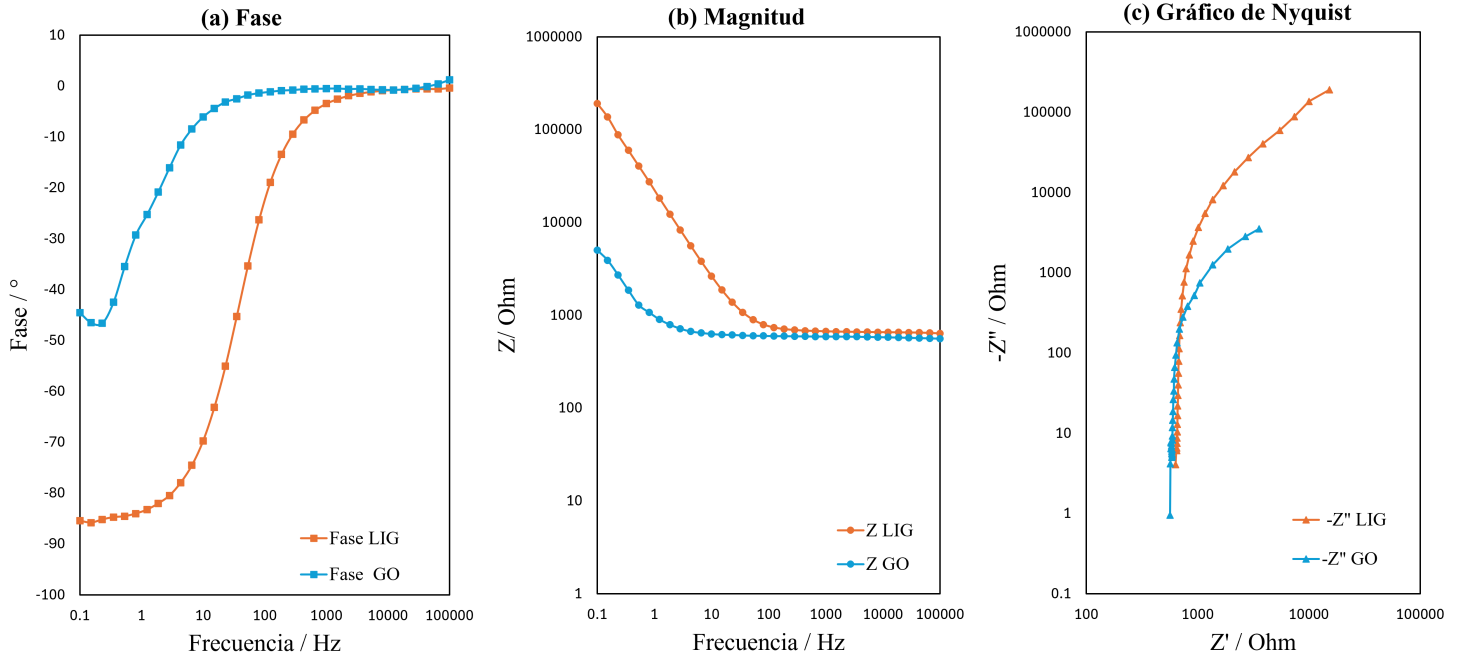
### 8.3.2. Inmovilización covalente de anticuerpos

Para realizar una inmovilización covalente de anticuerpos IgG sobre la superficie del electrodo de trabajo, fue necesaria una manipulación previa de los electrodos. De tal forma que posterior a la oxidación de la superficie del electrodo de interés, se realizaron las respectivas pruebas de EIS para obtener una comparación entre los resultados obtenidos de GO y la caracterización de LIG. Dando como resultado una reducción significativa en el comportamiento capacitivo ideal, al obtener una fase cercada a 45° (Figura 25 (a)), a su vez, la magnitud de la impedancia disminuyó en todo el rango de frecuencias en comparación con los resultados obtenidos para LIG (Figura 25 (b)), a su vez, la componente imaginaria del sistema también disminuyó drásticamente, tal y como se visualiza en el gráfico de Nyquist (Figura 25 (c))

**Figura 25.** Comparación de resultados obtenidos mediante EIS de LIG y GO

Tras la oxidación de grafeno mediante EIS se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

### Comparación de mediciones de EIS obtenidas de LIG y GO.

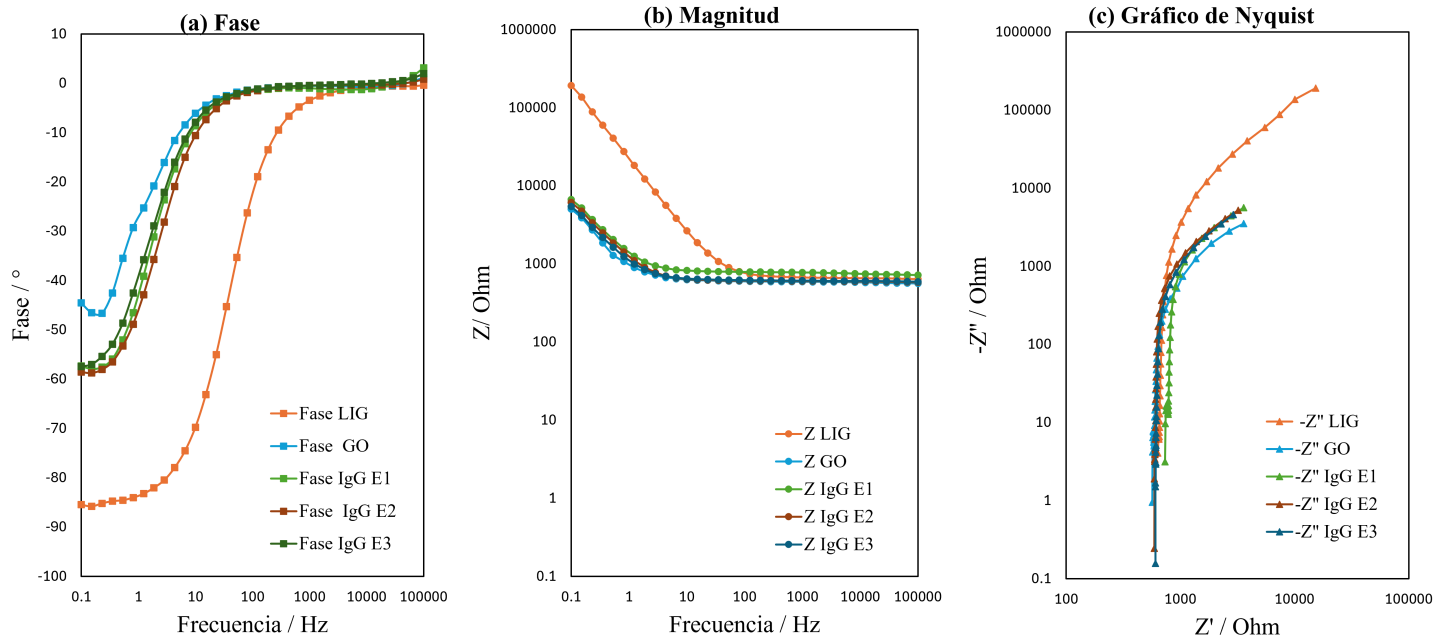


Posterior a la oxidación de grafeno y a la adición de dos diferentes proporciones de EDC/NHS (caso 1 y 2) se pudo realizar una comparación entre la capa de IgG inmovilizada y los resultados obtenidos de LIG y GO. De tal forma que se evaluaron tres electrodos para cada caso con PBS. Para el caso 1 se obtuvo que tras la inmovilización los valores correspondientes a la parte capacitiva de la impedancia aumentaron (presentes en el rango de frecuencias de 100 a 100000 Hz) y la parte resistiva del sistema aumento (presentes en el rango de frecuencias de 0.1 a 100 Hz) en comparación con el resultado obtenido para GO (Figura 26 (b)). A su vez el comportamiento capacitivo ideal aumento, acercándose un poco más a la fase obtenida en LIG (Figura 26 (a)), con ello en el gráfico de Nyquist se aumento la componente imaginaria tras la inmovilización en los tres electrodos (Figura 26(a)).

**Figura 26.** EIS con PBS tras inmovilización covalente de IgG (Caso 1)

Para el caso 1 se evaluaron tres electrodos para verificar la reproducibilidad en la inmovilización de IgG, de tal forma que IgG E1, IgG E2 e IgG E3 hicieron referencia a los resultados obtenidos del electrodo No.1, electrodo No.2 y electrodo No.3 respectivamente, de tal forma que mediante EIS se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

### EIS tras una inmovilización covalente de IgG (Caso 1)

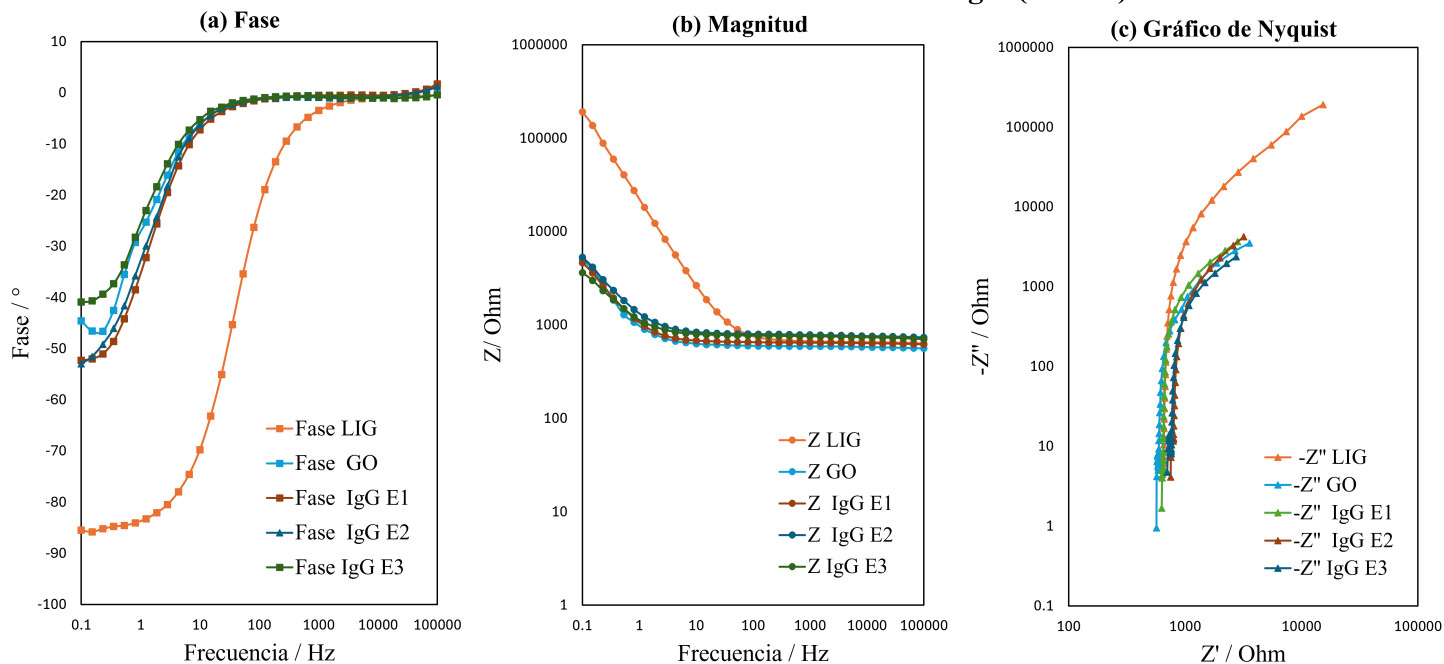


Por otro lado, para el caso 2 de EDC/NHS uno de los electrodos mostró mayor variación en la fase (Figura 27 (a)), la magnitud aumento en todos los electrodos a comparación de los obtenidos para GO (Figura 27 (b)), a su vez en el gráfico de Nyquist también se observa un aumento en la componente imaginaria de los electrodos tras la inmovilización (Figura 27 (c)).

**Figura 27.** EIS con PBS tras inmovilización covalente de IgG (Caso 2)

Para el caso 2 se evaluaron tres electrodos para verificar la reproducibilidad de los resultados tras una inmovilización de IgG, de tal forma que IgG E1, IgG E2 e IgG E3 hicieron referencia a los resultados obtenidos del electrodo No.1, electrodo No.2 y electrodo No.3 respectivamente activados con el caso 2 de EDC/NHS, de tal forma que mediante EIS se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

### EIS tras una inmovilización covalente de IgG (Caso 2)



## 8.4. Evaluación como biosensor

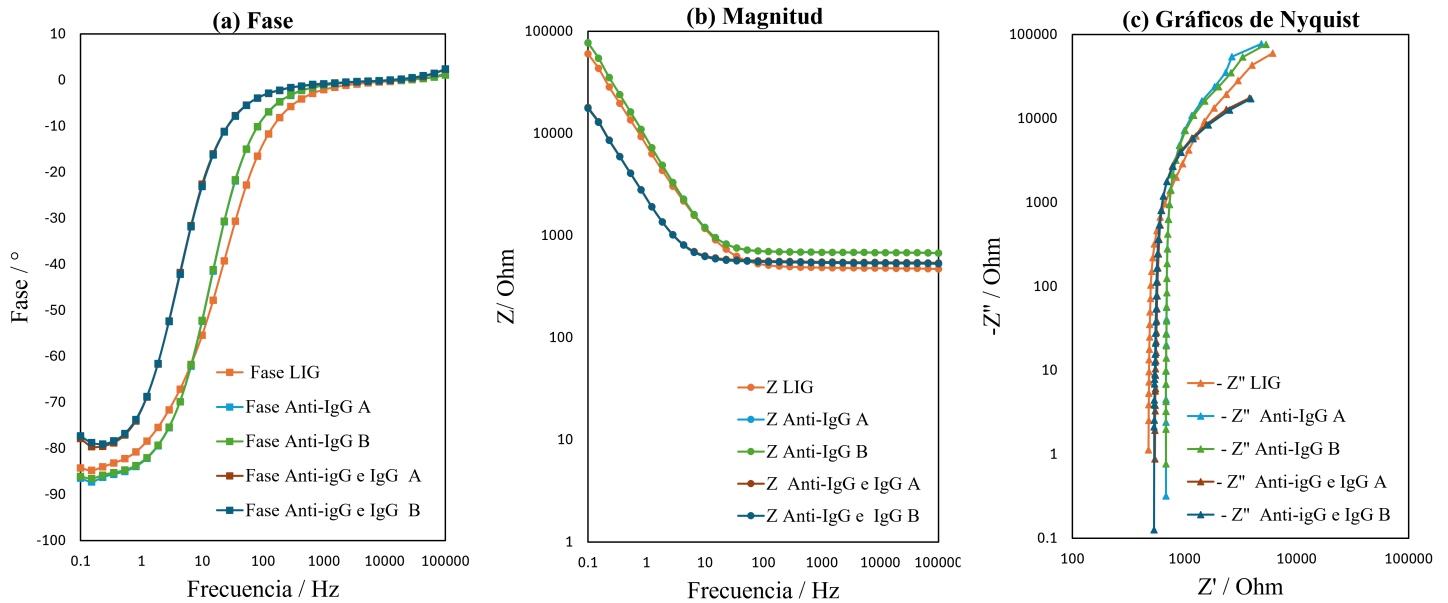
### 8.4.1. Método de inmovilización no covalente

Una vez inmovilizados los anticuerpos Anti-IgG, se realizaron pruebas de bioreconocimiento, de tal forma que para una inmovilización no covalente tras 26 h de incubación, hubo una disminución en la fase obtenida del sistema (Figura 28 (a)), a su vez, la magnitud de la impedancia no aumento (Figura 28 (b)), dando como resultado una disminución en la componente imaginaria del sistema (Figura 28 (c)), cabe destacar que se realizaron dos mediciones para evaluar la consistencia de los resultados.

**Figura 28.** Evaluación de bioconocimiento entre Anti-IgG e IgG (incubación de 26 h)

Es importante resaltar que la notación A y B hacen referencia a una primera y segunda medición respectivamente, esto para evaluar si era posible obtener el mismo resultado más de una vez, de tal forma que mediante EIS se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

**EIS correspondiente a la medición de antígenos (IgG) posterior a una inmovilización no covalente (incubación 26 h)**

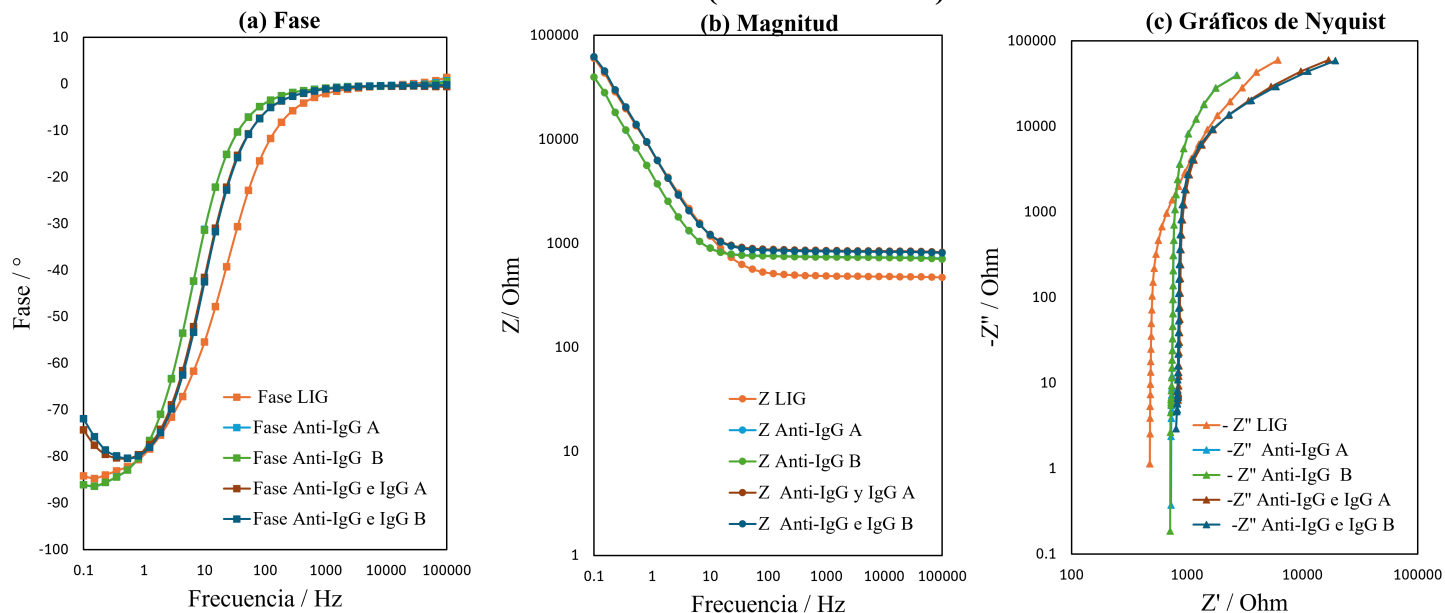


Por otra parte, la evaluación de bioconocimiento tras un periodo de incubación de 28 h, dio como resultado la disminución de la fase a comparación con los resultados obtenidos únicamente de Anti-IgG (Figura 29 (a)), sin embargo la impedancia del sistema aumento, obteniendo un patrón reconocible entre las variaciones realizadas en el rango de frecuencias de 100 Hz a 100000 Hz. De tal forma que la impedancia de 700 Ohms tras las pruebas de bioconocimiento aumentaron a 800 ohms (Figura 29 (b)), asimismo; este mismo patrón no pudo observarse en el gráfico de Nyquist (Figura 29 (c)).

**Figura 29.** Evaluación de bioreconocimiento entre Anti-IgG e IgG (incubación de 28 h)

Es importante resaltar que la notación A y B hacen referencia a una primera y segunda medición respectivamente, esto para evaluar si era posible obtener el mismo resultado más de una vez, de tal forma que mediante EIS se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

**EIS correspondiente a la medición de antígenos (IgG) posterior a una inmovilización no covalente (incubación 28 h)**



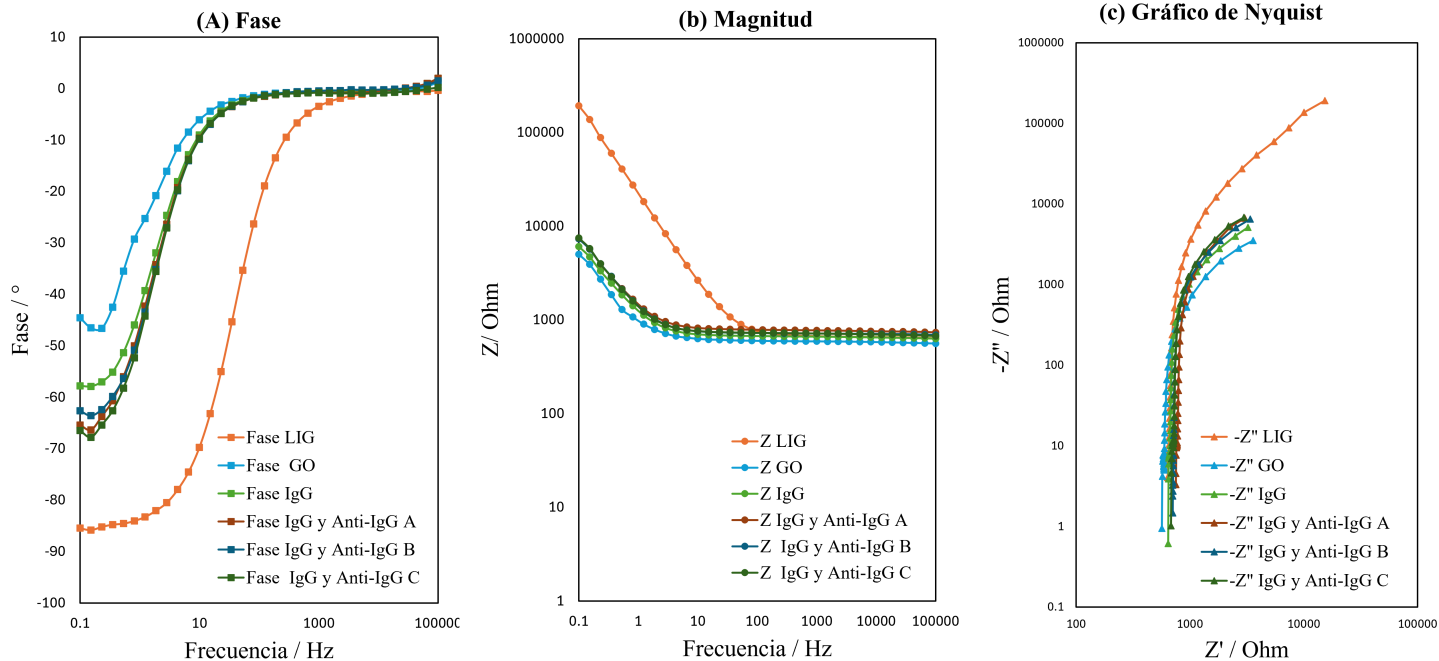
### 8.4.2. Método de inmovilización covalente

Para una realizar una evaluación de la interacción entre IgG y Anti-IgG, se emplearon tres diferentes concentraciones de Anti-IgG (1 (A), 2.5 (B) y 5 (C)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para el caso 1 se obtuvo que a medida que aumento la concentración de Anti-IgG, la fase obtenida fue cada vez más capacitiva, pasando de 45 °obtenidos en las mediciones correspondientes en las mediciones realizadas para GO, hasta 65 °en IgG/Anti-IgG, (Figura 30 (a)), asimismo; se observo que en la impedancia, transcurrida la interacción de bioreconocimiento la impedancia aumento, sin embargo no se obtuvo una tendencia incremental con el aumento de la concentración de Anti-IgG (Figura 29 (b)). Por otra parte, por medio del gráfico de Nyquist, se pudo observar el aumento en la componente imaginaria conforme fue aumentando la concentración de Anti-IgG, sin embargo la concentración de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Anti-IgG no obtuvo resultados alineados a la tendencia que se observa para el resto de mediciones (Figura 29 (c)).

**Figura 30.** Evaluación de bioreconocimiento tras una inmovilización covalente (Caso 1)

Se evaluaron tres diferentes concentraciones: A, B y C, las cuales correspondieron a 1, 2.5 y 5 ug/mL de Anti-IgG respectivamente, tal forma que mediante EIS se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

**EIS correspondiente a la medición de antígenos (Anti-IgG) tras una inmovilización covalente (Caso 1)**

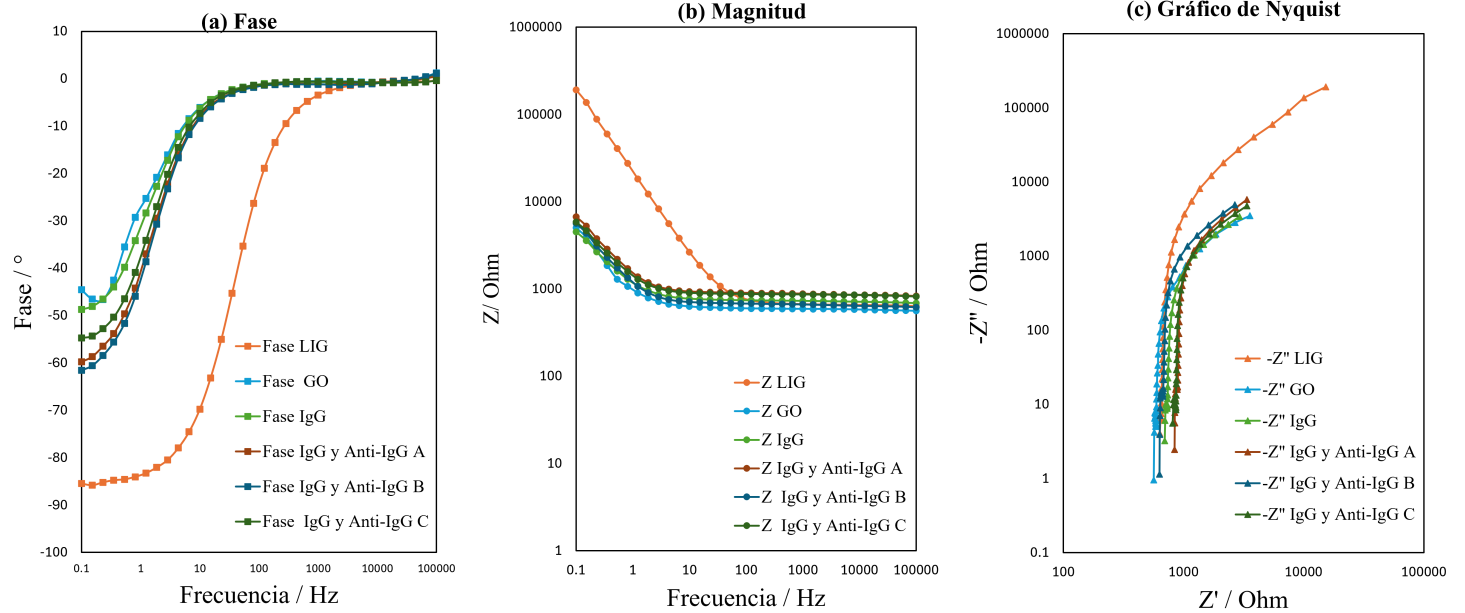


Así mismo, para el caso 2 tras las pruebas de bioreconocimiento en general también aumento la fase, de las concentraciones analizadas, se observo que la concentración de 5 ug/mL (C) fue la que obtuvo una fase menor (Figura 31 (a)) en comparación con el resto de concentraciones. Por su parte, en la magnitud si bien es cierto en la mayoría de los casos esta aumento, no hubo variación entre los resultados obtenidos entre 1 ug/mL (A) y 5 ug/mL(c), a su vez en el gráfico de Nyquist si se pudo visualizar una mayor variación entre modificaciones, únicamente la concentración de 5 ug/mL (C) no siguió la tendencia incremental.

**Figura 31.** Evaluación de bioreconocimiento tras una inmovilización covalente (Caso 2)

Se evaluaron tres diferentes concentraciones: A, B y C, las cuales correspondieron a 1, 2.5 y 5 ug/mL de Anti-IgG respectivamente, de tal forma que mediante EIS se obtuvo un diagrama de fase (a), un diagrama de magnitud (b) y un gráfico de Nyquist (c).

**EIS correspondiente a la medición de antígenos (Anti-IgG) tras una inmovilización covalente (Caso 2)**



Se realizó el desarrollo de un biosensor de grafeno inducido por láser que contó tanto con un electrodo de trabajo como con un contraelectrodo, para ello se logro realizar los diseños pertinentes para posteriormente llevar a cabo con éxito la fabricación. Es importante mencionar que en el diseño de los electrodos LIG no se contemplo un electrodo de referencia de manera interna, sin embargo; si se hizo uso de una configuración de tres electrodos en la que se empleó un electrodo de referencia externo, con la intención de procurar la estabilidad del sistema y proporcionar un punto de referencia, sin embargo en estudios previos [33] reportan que este tercer electrodo en pruebas de EIS no farádico puede ser opcional. Así mismo, en reportes anteriores [34] se describe que los mejores electrodos analíticos se obtuvieron con una entrada de baja potencia láser y baja velocidad de escaneo, tal y como los parámetros empleados en la fabricación de los electrodos en este estudio. Por otro lado, modelos teóricos para la caracterización electroquímica de electrodos de grafeno inducido por láser (LIG) se centran principalmente en cómo los parámetros de fabricación afectan la morfología y, por ende, el desempeño electroquímico de los electrodos. De tal forma que para validar si la caracterización electroquímica de los electrodos fue exitosa, fue fundamental emplear técnicas estandarizadas y criterios claros de interpretación previamente descritos en la literatura [35].

Es importante mencionar que para realizar la caracterización electroquímica de los electrodos se emplearon los métodos de voltametría cíclica (CV) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). Específicamente para las pruebas de VC fue necesaria la realización de un análisis estadístico de la variabilidad entre experimentos, asegurando que los resultados fueran reproducibles y comparables tal y como se describe en los resultados, de tal forma que producto de tres mediciones independiente de manera aleatoria por cada concentración de  $K_3[Fe(CN)_6]$ , se obtuvo una relación entre la corriente medida y el aumento de la concentración, a su vez la desviación estándar representada por las barras de error en los resultados demostraron una reproducibilidad altamente consistente. Asimismo, debido a la realización de pruebas EIS sin un proceso farádico, fue posible interpretar el comportamien-

to del sistema como un circuito AC, analizándose tres electrodos de manera independiente, de tal forma que en los resultados obtenidos se obtuvo también una alta consistencia en los resultados obtenidos, confirmando así la reproducibilidad de fabricación y respuesta electroquímica de los electrodos. En esencia, una prueba de EIS no farádico se aproxima más al comportamiento de un circuito ideal. Los sistemas que muestran un “comportamiento capacitivo” normalmente no presentan un semicírculo notable en el diagrama de Nyquist ( $R_{ct}$  = infinito). A su vez, en la literatura se describe que el diagrama de magnitud de bode si es conveniente para analizar cómo cambia la impedancia cuando se altera un parámetro del sistema como por ejemplo las capas en el material [36].

De manera específica, en la caracterización del electrodo LIG mediante EIS se pueden observar como la magnitud de la impedancia del sistema aumenta a frecuencias pequeñas ya que la impedancia capacitiva en dichas frecuencias se aproxima al comportamiento de un corto circuito; presentando un impedimento mayor al paso de corriente. Conforme fue aumentando la frecuencia, la impedancia fue disminuyendo ya que a frecuencias altas la capacitancia del sistema actuó mayormente como un conductor, permitiendo un mejor flujo de corriente. Por otro lado, la fase obtenida en dicha caracterización se aproxima a un comportamiento de capacitancia ideal, ya que se espera que un condensador ideal tenga un ángulo observado de  $-90^\circ$  [32], a su vez fue crucial la identificación de los valores obtenidos de  $|Z|$ , dado a que para la correcta interpretación de posteriores resultados, fue fundamental el análisis de las gráficas obtenidas mediante EIS de LIG (sin alguna modificación en su superficie) ya que estas proporcionaron un punto de referencia al describir el comportamiento inicial de Cdl en el sistema.

Es importante mencionar que las superficies tridimensionales como LIG son atractivas en el sentido de que ofrecen una mayor área superficial para la unión de anticuerpos y pueden minimizar la interferencia estérica que podría impedir la captura de antígenos, aunque el diseño de superficies es importante, la capacidad de unir de manera fiable un anticuerpo al electrodo resultó aún más fundamental [37]. Para verificar si la inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie del electrodo de trabajo fue exitosa, la literatura recomienda emplear técnicas de caracterización, dado a que en estudios del comportamiento electroquímico de electrodos LIG mediante CV se centran en su evaluación para aplicaciones en la detección química [38], se optó por la selección de pruebas de EIS para evaluar la variación de la superficie tras la inmovilización de biomoléculas e interacciones de bioreconocimiento, ya que este permitió registrar los cambios en el entorno dieléctrico interfacial (producto de las variaciones de la superficie del electrodo de trabajo) [33]. Así mismo, en estudios se describe que los cambios de capacitancia ocasionados por la adición de biomoléculas se miden a bajas frecuencias de estimulación, típicamente hasta 1kHz [32], a su vez es importante resaltar que cuando se realiza la inmovilización de receptores en un sistema o se presentan escenarios de bioreconocimiento, se da como resultado la adición de capacitancias en serie, al obtener una capacitancia equivalente total ( $C_T$ ) del sistema, el valor de  $C_T$  disminuye, con ello la  $|Z|$  del sistema aumenta [33].

Para realizar una inmovilización no covalente se realizaron dos diferentes periodos de incubación (26 h y 28 h) con el fin de realizar una comparación entre estos y su efecto en la absorción física de los anticuerpos Anti-IgG. En cuanto al análisis de los resultados obtenidos de una inmovilización no covalente con un periodo de incubación de 26h, se infirió que el aumento de  $|Z|$  presente en las frecuencias en el rango de 10 Hz a 1k Hz, fue el resultado de la

disminución de la capacitancia total del sistema, por lo que podría atribuirse a la presencia de anticuerpos inmovilizados sobre el electrodo de interés. Así mismo la fase se acercó aún más al comportamiento capacitivo ideal. Por otro lado, la  $|Z|$  obtenida mediante las pruebas realizadas con un periodo de incubación de 28 h mostró un cambio levemente mayor en el rango de frecuencias de 10 Hz a 1K Hz a comparación con el periodo de incubación de 26 h, infiriendo una mayor absorción física de Anti-IgG; sin embargo, en frecuencias menores a 10 Hz la magnitud disminuyó, contradiciendo lo esperado según la teoría. Pese a esto, en algunos estudios también reportan [39] una disminución en  $|Z|$  con periodos de incubación más largos, a su vez también se ha descrito que periodos largos de incubación pueden llegar a afectar la respuesta electroquímica del biosensor. Adicionalmente, dado que la inmovilización no covalente de anticuerpos no garantiza una interacción estable, se realizaron dos mediciones para verificar la consistencia de los datos, con ello en los resultados se visualizó que el proceso no covalente si fue capaz de proporcionar un mismo resultado en dos ocasiones repetidas.

Para verificar la funcionalidad de los anticuerpos inmovilizados de manera no covalente también fue fundamental realizar pruebas de EIS con concentraciones del antígeno seccionado, permitiendo verificar si existían sitios de unión del anticuerpo que se encontraran accesibles y activos [37]. Es importante recalcar que la orientación de los anticuerpos desempeña un papel crítico en el rendimiento de los inmunosensores, idealmente un anticuerpo inmovilizado debe estar orientado de manera que el sitio  $F_c$  del anticuerpo este hacia el sustrato, sin embargo; los anticuerpos inmovilizados de manera aleatoria pueden asumir varias orientaciones en la superficie. Aunque la absorción física ofreció la vía de unión más simple, fue de cierta forma incontrolable, los anticuerpos pudieron inmovilizarse de manera aleatoria, desnaturalizarse o desplazarse en pasos posteriores mediante lavado [37]. De tal forma que tras las pruebas de bioreconocimiento entre Anti-IgG e IgG, para un periodo de incubación de 26 h, la  $|Z|$  disminuyó en las frecuencias menores a 10 Hz en comparación con los resultados obtenidos únicamente de la inmovilización del anticuerpo y así mismo no se vio un aumento de  $|Z|$  en el rango de frecuencias de 10 Hz a 1k Hz, por lo que a pesar de haber mostrado el mejor rendimiento durante las pruebas de inmovilización, en las pruebas de bioreconocimiento no proporcionó resultados cercanos a lo que se describe en la teoría, en la cual se daría una mayor disminución en  $C_T$  y con ello, un aumento en  $|Z|$ . Por otro lado, en los resultados obtenidos de bioreconocimiento tras un periodo de incubación de 28 H, la  $|Z|$  aumento en el rango de frecuencias de 10 Hz a 1k Hz, si bien es cierto el rendimiento de un biosensor puede disminuir con los tiempos prolongados de incubación pudo existir una mayor accesibilidad del área activa del anticuerpo Anti-IgG que pudiera permitir un mayor bioreconocimiento con IgG.

Por otro lado, en un escenario ideal, los anticuerpos deberían inmovilizarse en su forma natural sin necesidad de grupos funcionales introducidos, tal que sus sitios de unión al antígeno estén libres de impedimentos y orientados de manera que se maximice la unión de bioreconocimiento; sin embargo, durante la realización de este estudio sí fue necesaria la funcionalización de la superficie previo a la inmovilización, por lo cual; se llevó a cabo la oxidación de grafeno, durante este procedimiento se observó que una pequeña cantidad de la solución piranha alcanzó la superficie del contraelectrodo contenido en algunos electrodos, introduciendo así una fuente potencial de error en la metodología. Tras la oxidación de LIG, mediante los resultados se observó la disminución considerable de la fase casi a la mitad en comparación con los resultados de LIG, esto reveló que la capa dieléctrica fue menos capaz de retener eficazmente una carga eléctrica, por lo tanto; la magnitud disminuyó a un

rango de  $500 \Omega$  a  $600 \Omega$ , este efecto puede atribuirse a la modificación de la superficie del electrodo de interés, al intencionalmente añadirse grupos orgánicos a la estructura de este. Adicionalmente, con el objetivo de realizar una comparación metodológica se realizaron dos diferentes caso de activación por EDC/NHS para las cuales, no fue posible la determinación de la ventaja de un caso sobre otro dado a la similitud de los resultados obtenidos en ambos casos. A su vez, la activación por EDC/NHS pudo dar como resultado uniones más difíciles de remover entre la superficie y los anticuerpos IgG, sin embargo; estos métodos no son dirigidos a un sitio específico y también pueden ocurrir orientaciones aleatoria desfavorables [37].

Una vez inmovilizados los anticuerpos de manera covalente, se realizaron mediciones EIS de todos los electrodos para evaluar la consistencia entre los resultados obtenidos, de tal forma que se pudiera establecer otro punto de partida para la comparación de resultados obtenidos en pruebas posteriores. En la fase de EIS correspondiente al proceso de inmovilización covalente para el caso No.1, el ángulo pasó de  $-45^\circ$  a  $-68^\circ$ , nuevamente acercándose un poco más al comportamiento capacitivo ideal inicial. La variación en la capacitancia interfacial se evidenció más por medio del gráfico de Nyquist, al observarse que tras la inmovilización la componente imaginaria del sistema aumento, evidenciando de esta forma que en los tres electrodos evaluados se logró una inmovilización de anticuerpos IgG, a su vez los tres electrodos evaluados obtuvieron un comportamiento bastante consistente entre sí.

Por otro lado, para el caso No.2 en el cual se empleó una mayor proporción de EDC y NHS en la solución EDC/NHS, se observo una menor consistencia en los datos obtenidos en las mediciones de los tres electrodos, incluso uno de ellos se alejo aún más del comportamiento capacitivo ideal en comparación de los resultados obtenidos de GO, esto no necesariamente se puede atribuir a la proporción de EDC/NHS, sino en el contacto indeseado del contraelectrodo con las soluciones empleadas en la metodología. A su vez, en el gráfico de Nyquist no se observó una consistencia en los tres electrodos evaluados clara a comparación del caso 1.

En cuanto a las pruebas de biorreconocimiento en el proceso de inmovilización covalente, a manera de que se pudiera evaluar una tendencia se evaluaron tres diferentes concentraciones de antígenos Anti-IgG. La concentración más pequeña de  $1 \text{ ug/mL}$  y  $5 \text{ ug/mL}$  de Anti-IgG en la caso 1 siguieron una tendencia incremental tanto en la fase (al acercarse un poco más al comportamiento capacitivo ideal) y en el gráfico de Nyquist, al visualizar que a partir de GO al aumentar las biomoleculas sobre la superficie, aumento la parte imaginaria del sistema; sin embargo, en  $|Z|$  este mismo efecto no se visualizó con claridad. De manera más amplia, se esperaba que al incrementar la concentración de Anti-IgG aumentaría aún más la  $|Z|$  de manera gradual pero no se obtuvo dicho resultado, esto pudo ser debido a una pérdida en la actividad del anticuerpo IgG. cabe mencionar que los grupos amino y carboxilo están presentes en toda la estructura de estas biomoleculas, debido a su prevalencia en toda la superficie, la inmovilización covalente dirigida a sitios específicos que apunte a estos grupos es difícil [37], por lo que es posible que algún porcentaje de los anticuerpos IgG no tuvieran disponible su área activa de reconocimiento para Anti-IgG. Para el caso No.2 de EDC/NHS, se observó el mismo comportamiento, específicamente en el gráfico de Nyquist, donde a partir de GO, a medida que aumentó la adición de biomoléculas, la parte imaginaria aumentó, sin embargo la concentración de  $2.5 \text{ ug/mL}$  de Anti-IgG no siguió la tendencia esperada, esto pudo ser debido a que el electrodo en el cual se evaluó dicha concentración, poseía una mayor

cantidad de anticuerpos con el área activa disponible. Asimismo, es importante mencionar que la poca variación en los resultados de bioreconocimiento también pudo deberse a la gran disponibilidad de anticuerpos inmovilizados y a la poca cantidad de antígenos disponibles, dado a que las proporciones utilizadas variaron significativamente entre sí, esto debido a la cantidad limitada de la preparación comercial del anticuerpo, lo que limitó la realización de concentraciones más altas de este analito que pudieran generar una respuesta más evidente tras el proceso de bioreconocimiento.

De tal forma que se identificó la necesidad de la realización de técnicas de caracterización de superficies que pudieran proporcionar con precisión información sobre la orientación de los anticuerpos ya que una limitante de las pruebas realizadas con EIS fue la imposibilidad de determinar la orientación de estos. Por otro lado, la placa EmStat Pico Development mostró ser un dispositivo de precisión que pudo mejorar la calidad de la caracterización, permitiendo identificar las contribuciones del electrodo de interés (electrodo de trabajo). Así mismo fue importante tomar en consideración prevenir la desnaturalización de los anticuerpos empleados, ya que se quería evitar que dichas moléculas pasaran por un proceso en el cual las proteínas perdieran su estructura tridimensional «Y» y por lo tanto; que perdieran su función biológica, este fenómeno puede ser inducido por calor; sin embargo, la desnaturalización de IgG se vuelve significativamente irreversible a temperaturas superiores a  $60^{\circ}\text{C}$ , de esta forma se ha reportado que anticuerpos IgG casi pierde completamente su capacidad de unión a antígenos después de un tratamiento térmico durante varios minutos a  $90^{\circ}\text{C}$ , otras clases de anticuerpos como IgA e IgM son más sensibles al tratamientos térmico que la IgG [40], dado a que durante la metodología no se trabajó a temperaturas tan elevadas, se disminuyó la probabilidad de desnaturalización por calor.

Los principales aportes de esta investigación consistieron en el desarrollo reproducible de electrodos LIG empleando parámetros de baja potencia y velocidad, esto se pudo verificar mediante la caracterización electroquímica con CV y EIS, obteniendo resultados prometedores para su reproducibilidad a gran escala. Así mismo se pudo realizar una observación sistemática de como el proceso de inmovilización y los periodos de incubación alteraron la respuesta obtenida por EIS, y su efecto en  $C_{dl}$ ,  $|Z|$  en el rango de 10 Hz a 1kHz, ángulo de fase y gráfico de Nyquist. Pese a la identificación de comportamientos inesperados en las frecuencias menores a 10 Hz, este efecto negativo resalta la importancia de mantener en lo posible un mayor control en la manipulación de la superficie de los electrodos así de como cuidar las condiciones que promuevan la actividad natural de los anticuerpos. Así mismo, se confirmó que la respuesta de EIS no farádico de LIG fue extremadamente sensible a los cambios interfaciales  $C_{dl}$  tal y como se describe en la teoría, mostrando como modificaciones en una superficie modifican el comportamiento capacitivo.

Una de las principales limitaciones del estudio como se mencionó con anterioridad, fue que EIS por sí solo no puede determinar la orientación de las biomoléculas, así mismo que no fue posible la verificación de la pérdida de la actividad natural de los anticuerpos empleados, dado a que los resultados obtenidos se basaron mayormente en interpretaciones teóricas de los fundamentos de EIS. Así mismo es necesario escalar el estudio con la realización de un mayor número de réplicas y condiciones experimentales de manera controlada que optimicen los resultados obtenidos en esta investigación.

Por medio del presente estudio se buscaba realizar el desarrollo de un biosensor capaz de detectar interacciones entre anticuerpos y antígenos, dado a la necesidad del desarrollo de tecnologías portátiles y de bajo costo en países en vías de desarrollo como Guatemala, debido a la importancia de diagnósticos tempranos y su relación en el pronóstico de enfermedades. Con ello se desarrollaron electrodos LIG que permitieran la evaluación de interacciones antígeno-anticuerpo con mediciones electroquímicas. Logrando el diseño y fabricación de electrodos LIG funcionales, validados por una caracterización electroquímica con CV y EIS, ya que esta demostró a nivel estadístico para CV y en la consistencia de las mediciones en EIS la reproducibilidad de los resultados, así como la presencia de buenas propiedades conductivas en los electrodos fabricados.

Por otro lado, la inmovilización no covalente de anticuerpos modifico la respuesta capacitiva del sistema, en general la adición de biomoléculas redujo la capacitancia equivalente en el rango de frecuencias de 10 Hz a 1k Hz y con ello la variación de la impedancia, dicho comportamiento se presento de manera más concisa en el periodo de incubación de 28h. Por su parte, en la inmovilización covalente el gráfico de Nyquist fue fundamental para evaluar las interacciones de reconocimiento, en general; al adicionar los receptores y los analitos, se observó un incremento en la parte imaginaria del sistema, sin embargo no fue posible observar una tendencia incremental con el aumento de las concentraciones de los antígenos. Por su parte, no fue posible concluir sobre la ventaja de un caso de EDC/NHS sobre otro, ya que ambos casos, se obtuvieron respuestas similares.

En cuanto a las implicaciones prácticas, esta investigación aportó en el asentamiento de bases para el desarrollo de biosensores LIG de bajo costo y escalables para la detección de interacciones entre anticuerpos y antígenos, si se logra obtener una mejor consistencia en los resultados de detección, logrando mejoras en las limitaciones en cuanto al rendimiento y estabilidad. Así mismo, esta investigación puede resultar útil en la elaboración de protocolos o bien como aporte para una guía en la selección de condiciones de procesos de inmovilización adecuadas en cuanto a periodos de incubación, beneficiando así la investigación emergente en biosensores en Guatemala. Desde una perspectiva clínica, junto con la optimización del

biosensor se deben desarrollar metodologías en el país para la detección de biomarcadores específicos, para que con ello se pueda escalar a una evaluación de bioreconocimiento presentes en procesos fisiológicos de enfermedades en la región. Así mismo se deben realizar validaciones futuras de este tipo de dispositivos en muestras biológicas reales y con ello contribuir significativamente al fortalecimiento de el desarrollo biomédico de dispositivos médicos en la región.

---

## Recomendaciones

---

Se recomienda optimizar el protocolo de manipulación química empleado en el proceso de inmovilización covalente, de tal forma que se pueda realizar la funcionalización evitando una exposición accidental en el contraelectrodo, así mismo la realización de la optimización de lavados y bloqueos de superficie no específicos para evitar absorciones no específicas o bien, el diseño de un electrodo que no permita que al colocar las soluciones respectivas en el electrodo de trabajo, estas entren en contacto con el contraelectrodo.

Así mismo al tratarse de mediciones EIS capacitivas se podrían realizar pruebas sin el electrodo de referencia, esto con la intención de tratar de miniaturizar todo el sistema, ya que se provee que este pueda sentar las bases para un dispositivo portátil que pueda ser de fácil acceso en regiones aisladas como puntos de atención médica.

Realizar experimentos de control positivo y negativo que puedan validar los resultados obtenidos por medio de las experimentaciones, dado a que idealmente se debe de optar por la implementación de ensayos que sirvan como punto de comparación para validar los resultados obtenidos. A su vez, optimizar la relación anticuerpo/antígeno evaluando distintas concentraciones para garantizar la formación de complejos detectables.

Agregar en lo posible replicas que permitan un estudio estadístico y con ello promover que todo el sistema, tanto la inmovilización como las pruebas de bioreconocimiento sean reproducibles.

Finalmente una vez optimizado el diseño y los protocolos, podría introducirse la aplicación de anticuerpos y antígenos propios de una enfermedad presente en la región, para que con ello finalmente el dispositivo pueda contribuir no solo como prueba de concepto sino también en sentar las bases del potencial de estos dispositivos como diagnósticos accesibles de enfermedades en específicas en la región.

- 
- [1] P. D. Burbelo, J. M. Keller y M. J. Iadarola, «Comprehensive Antibody Profiles as Personalized Indicators of Health and Disease,» *Discovery Medicine*, vol. 24, n.º 132, págs. 161-168, 2017.
  - [2] J. T. Ballew et al., «Antibody biomarker discovery through in vitro directed evolution of consensus recognition epitopes,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, n.º 48, págs. 19 330-19 335, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1314792110.
  - [3] E. Cesewski y B. N. Johnson, «Electrochemical biosensors for pathogen detection,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 159, pág. 112 214, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112214.
  - [4] N. Tsurusawa et al., «Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis,» *Journal of Clinical Medicine*, vol. 10, n.º 21, 2021. DOI: 10.3390/jcm10215197.
  - [5] C. Wang, M. Liu, Z. Wang, S. Li, Y. Deng y N. He, «Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices,» *Nano Today*, vol. 37, 2021. DOI: 10.1016/j.nantod.2021.101092.
  - [6] S. Sharma, H. Byrne y R. J. O’Kennedy, «Antibodies and antibody-derived analytical biosensors,» *Essays in Biochemistry*, vol. 60, págs. 9-18, 2016. DOI: 10.1042/EBC20150002.
  - [7] Y. Huang, J. Xu, J. Liu, X. Wang y B. Chen, «Detección de enfermedades relacionadas con biosensores electroquímicos: una revisión,» *Sensores*, vol. 17, n.º 10, pág. 2375, 2017. DOI: 10.3390/s17102375.
  - [8] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös y E. Reimhult, «Electrochemical Biosensors—Sensor Principles and Architectures,» *Sensors*, vol. 8, págs. 1400-1458, 2008. DOI: 10.3390/s8031400.
  - [9] R. McNerney, «Diagnostics for Developing Countries,» *Diagnostics*, vol. 5, n.º 2, págs. 200-201, 2015. DOI: 10.3390/diagnostics5020200.
  - [10] GRUPO BANCO MUNDIAL, *Panorama de la Salud: Latinoamérica y el Caribe 2020*, <https://doi.org/10.1787/740f9640-es>, Fecha de acceso: 19 de marzo de 2025, Paris: OECD, 2020.

- [11] Organización Panamericana de la Salud, *Salud en las Américas: Guatemala*, <https://hia.paho.org/es/perfiles-de-pais/guatemala>, Fecha de acceso: 20 de marzo de 2025, Organización Mundial de la Salud, sep. de 2024.
- [12] M. L. Sin, K. E. Mach, P. K. Wong y J. C. Liao, «Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases,» *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 14, n.º 2, págs. 225-244, 2014. DOI: 10.1586/14737159.2014.888313.
- [13] P. Bollella et al., «Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 89, n.º 1, págs. 152-166, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112214.
- [14] A. Singh et al., «Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope,» *Biosensors*, vol. 11, n.º 9, pág. 336, 2021. DOI: 10.3390/bios11090336.
- [15] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall y W. R. Heineman, «Electrochemical biosensors,» *Chemical Society Reviews*, vol. 39, n.º 5, págs. 1747-1763, 2010. DOI: 10.1039/b714449k.
- [16] M. Morales y J. Halpern, «Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors,» *Bioconjugate Chemistry*, vol. 29, n.º 10, págs. 3231-3239, 2018. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00592. dirección: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00592>.
- [17] V. Naresh y N. Lee, «A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors,» *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 21, 2021. DOI: 10.3390/s21041109. dirección: <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- [18] R. Xu, L. Ouyang, H. Chen, G. Zhang y J. Zhe, «Recent Advances in Biomolecular Detection Based on Aptamers and Nanoparticles,» *Biosensors*, vol. 13, n.º 4, pág. 474, 2023. DOI: 10.3390/bios13040474. dirección: <https://doi.org/10.3390/bios13040474>.
- [19] J. Peña-Bahamonde, H. N. Nguyen, S. K. Fanourakis y D. F. Rodrigues, «Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences,» *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 16, pág. 75, 2018. DOI: 10.1186/s12951-018-0400-z. dirección: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0400-z>.
- [20] Y. Saylan, Ö. Erdem, S. Ünal y A. Denizli, «An alternative medical diagnosis method: Biosensors for virus detection,» *Biosensors*, vol. 9, n.º 2, pág. 65, 2019. DOI: 10.3390/bios9020065.
- [21] E. Kandahari, E. J. Smith y J. C. Goeltz, «Beyond the Textbook: Introducing Undergraduates to Practical Electrochemistry,» *Journal of Chemical Education*, vol. 98, n.º 10, págs. 3263-3268, 2021. DOI: 10.1021/acs.jchemed.1c00155. dirección: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00155>.
- [22] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan y A. Mulchandani, «Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications,» *Sensors*, vol. 21, n.º 19, pág. 6578, 2021. DOI: 10.3390/s21196578.
- [23] T. Kim et al., «Applications of Voltammetry in Lithium Ion Battery Research,» *Journal of Electrochemical Science and Technology*, vol. 11, n.º 1, págs. 14-25, 2020, Mini-Review. DOI: 10.33961/jecst.2019.00628. dirección: <https://doi.org/10.33961/jecst.2019.00628>.

- [24] C. Robinson, V. B. Juska y A. O’Riordan, «Surface chemistry applications and development of immunosensors using electrochemical impedance spectroscopy: A comprehensive review,» *Environmental Research*, vol. 237, pág. 116 877, 2023. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116877.
- [25] A. Yakoh, U. Pimpitak, S. Rengpipat, N. Hirankarn, O. Chailapakul y S. Chaiyo, «Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 176, pág. 112 912, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112912. dirección: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912>.
- [26] R. Y. A. Hassan, «Avances en nanobiosensores electroquímicos para aplicaciones biomédicas y ambientales: del trabajo actual a las perspectivas futuras,» *Sensors*, vol. 22, n.º 19, pág. 7539, 2022. DOI: 10.3390/s22197539. dirección: <https://doi.org/10.3390/s22197539>.
- [27] R. Ye, D. K. James y J. M. Tour, «Laser-Induced Graphene: From Discovery to Translation,» *Advanced Materials*, vol. 31, n.º 1, 2018. DOI: 10.1002/adma.201803621.
- [28] K. Settu, P. Chiu e Y. Huang, «Laser-Induced Graphene-Based Enzymatic Biosensor for Glucose Detection,» *Polymers*, vol. 13, n.º 16, pág. 2795, 2021. DOI: 10.3390/polym13162795. dirección: <https://doi.org/10.3390/polym13162795>.
- [29] S. Shahriari, M. Sastry, S. Panjekar y R. K. Singh Raman, «Graphene and graphene oxide as a support for biomolecules in the development of biosensors,» *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 14, págs. 197-220, 2021. DOI: 10.2147/NSA.S334487.
- [30] I. Sela-Culang, V. Kunik e Y. Ofran, «La base estructural del reconocimiento antígeno-anticuerpo,» *Frontiers in Immunology*, vol. 4, pág. 302, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00302. dirección: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>.
- [31] Z. Jiang, B. Feng, J. Xu, T. Qing, P. Zhang y Z. Qing, «Graphene biosensors for bacterial and viral pathogens,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 166, pág. 112 471, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112471.
- [32] A. C. Lazanas y M. I. Prodromidis, «Electrochemical Impedance Spectroscopy A Tutorial,» *ACS Measurement Science Au*, vol. 3, n.º 3, págs. 162-193, 2023. DOI: 10.1021/acsmesuresciau.2c00070.
- [33] H. Zhang et al., «Electrochemical Impedance Spectroscopy-Based Biosensors for Label-Free Detection of Pathogens,» *Biosensors*, vol. 15, n.º 7, pág. 443, 2025. DOI: 10.3390/bios1507044. dirección: <https://doi.org/10.3390/bios1507044>.
- [34] T. Pinheiro et al., «Influence of CO<sub>2</sub> laser beam modelling on electronic and electrochemical properties of paper-based laser-induced graphene for disposable pH electrochemical sensors,» *Carbon Trends*, vol. 11, pág. 100 271, 2023. DOI: 10.1016/j.cartre.2023.100271. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666281723000361>.
- [35] W. Teixeira et al., «Principal Component Analysis as a Tool for Electrochemical Characterization of Modified Electrodes: A Case Study,» *Journal of The Electrochemical Society*, 2022. DOI: 10.1149/1945-7111/ac5e48. dirección: <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac5e48>.

- [36] N. O. Laschuk, E. B. Easton y O. V. Zenkina, «Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry,» *RSC Advances*, vol. 11, págs. 28 723-28 742, 2021. DOI: 10.1039/d1ra03785d. dirección: <https://doi.org/10.1039/d1ra03785d>.
- [37] N. Welch, J. Scoble, B. Muir y P. Pigram, «Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review),» *Biointerphases*, vol. 12, n.º 2, pág. 02D301, 2017. DOI: 10.1116/1.4978435. dirección: <https://doi.org/10.1116/1.4978435>.
- [38] A. Behrent, C. Griesche, P. Sippel y A. Baeumner, «Process-property correlations in laser-induced graphene electrodes for electrochemical sensing,» *Mikrochimica Acta*, vol. 188, 2021. DOI: 10.1007/s00604-021-04792-3. dirección: <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04792-3>.
- [39] J. Zorea, R. P. Shukla, M. Elkabets y H. Ben-Yoav, «Probing antibody surface density and analyte antigen incubation time as dominant parameters influencing the antibody–antigen recognition events of a non-faradaic and diffusion-restricted electrochemical immunosensor,» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 412, págs. 1709-1717, 2020. DOI: 10.1007/s00216-020-02417-x. dirección: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02417-x>.
- [40] Y. Akazawa-Ogawa, H. Nagai e Y. Hagihara, «Heat denaturation of the antibody, a multi-domain protein,» *Biophysical Reviews*, vol. 10, págs. 255-258, 2017. DOI: 10.1007/s12551-017-0361-8. dirección: <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0361-8>.

