
Diseño y fabricación de electrodos de grafeno inducidos por láser para su utilización en aplicaciones de biosensado

Carmen Lucía Vásquez Meléndez



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería




**Diseño y fabricación de electrodos de grafeno inducidos por
láser para su utilización en aplicaciones de biosensado**

Trabajo de graduación presentado por Carmen Lucía Vásquez Meléndez
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica


Guatemala,


2024

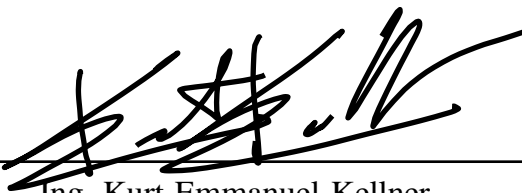
Vo.Bo.:

(f) 
M. Sc. Carlos Esquit

Tribunal Examinador:

(f) 
M.Sc. Carlos Esquit

(f) 
Dr. Luis Alberto Rivera Estrada

(f) 
Ing. Kurt Emmanuel Kellner

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de febrero de 2025.

Siempre tuve interés por hacer algo que tuviera un impacto positivo en la vida de las personas y pienso que esta carrera es una gran oportunidad para hacerlo, poniendo la ciencia al beneficio de la salud de las personas. Esta tesis fue inspirada por mi interés en aplicar mis conocimientos en el tema de la diabetes, ya que es un problema que afecta a muchísimas personas, incluyendo seres queridos.

Quiero agradecer, primero, a Dios por darme una vida tan bendecida y siempre demostrarme lo bueno que es; por darme fuerzas y sabiduría para siempre seguir adelante. Agradezco a mi familia, especialmente a mi papá y a mi mamá, por siempre creer en mí y mostrarme su apoyo y amor incondicional en todo momento; por siempre motivarme a dar lo mejor de mí y enseñarme que soy capaz de todo lo que me proponga. Les agradezco por ser mis ejemplo de disciplina, perseverancia y paciencia; por darme una vida llena de oportunidades que me han permitido crecer, aprender y reflejar lo que me han enseñado. Le doy gracias también a mi hermana por ser mi ejemplo de determinación y esfuerzo; por demostrarme la importancia de dar lo mejor de sí en todo lo que haga y cómo ese esfuerzo da sus frutos. A ellos les dedico todos mis logros.

Agradezco a mi asesora, Ph. D. Vanessa Jungbluth, por todo su apoyo y acompañamiento durante este año. Gracias por sus enseñanzas, dedicación, paciencia y compromiso; sin ella, este proyecto no habría sido posible. Le agradezco también a Ph. D. José Andrés Leal por su apoyo en este trabajo, así como por su dedicación durante estos años para que podamos ser profesionales preparados. Le doy gracias a todas las personas del Departamento de Ingeniería Electrónica, Mecatrónica y Biomédica, director, encargados, profesores y técnicos. Gracias por brindarnos las herramientas para desarrollarnos profesionalmente y por su dedicación y apoyo para que podamos hacerlo de la mejor manera.

Agradezco también a mis amigos y amigas; a quienes conocí durante estos años de carrera, con quienes pudimos apoyarnos durante la carrera para seguir adelante aún cuando sentíamos que era muy difícil; con quienes compartí muy buenos momentos e hicieron que ir a la universidad se sintiera más bonito. También agradezco a quienes, desde hace varios años, han estado junto a mí durante distintas etapas de mi vida y que mutuamente nos hemos visto crecer y madurar. Quienes siempre creen en mí, me muestran su apoyo incondicional en todo momento y a quienes desde lejos me lo demuestran constantemente también.

Prefacio	IV
Índice	v
Lista de figuras	VII
Resumen	IX
Abstract	X
1 Introducción	1
2 Antecedentes	3
3 Justificación	5
4 Objetivos	7
4.1 Objetivo general	7
4.2 Objetivos específicos	7
5 Alcance	8
6 Marco teórico	10
6.1 Diabetes	10
6.1.1 Definición	10
6.1.2 Base molecular	11
6.1.3 Causas y clasificación	12
6.1.4 Síntomas	13
6.1.5 Manejo	14

6.2	Biosensores	14
6.2.1	Definición	14
6.2.2	Biosensores para detección de glucosa	16
6.2.3	Biosensores amperométricos	17
6.2.4	Voltametría cíclica	18
6.3	Grafeno	19
6.3.1	Propiedades	19
6.3.2	Métodos de fabricación	20
6.3.3	Grafeno inducido por láser	20
7	Metodología	22
7.1	Validación de placa EVAL-AD5941ELCZ	22
7.2	Diseño de electrodos	24
7.3	Fabricación de electrodos	25
7.4	Caracterización electroquímica de electrodos	26
7.5	Evaluación de aplicación de biosensado	27
8	Resultados	29
8.1	Validación de la placa EVAL-AD5941ELCZ	29
8.2	Diseño y fabricación de los electrodos inducidos por láser	32
8.3	Caracterización electroquímica de los electrodos de grafeno inducido por láser	33
8.4	Evaluación de aplicación de biosensado	37
9	Discusión	41
10	Conclusiones	45
11	Recomendaciones	47
12	Referencias	49

Lista de figuras

Figura 1.	Proceso de secreción de la insulina por parte de las células beta, desencadenado por la elevación de concentración de glucosa en la sangre.	12
Figura 2.	Estructura básica de un biosensor.	15
Figura 3.	Biosensor amperométrico basado en un sistema de 3 electrodos.	18
Figura 4.	Estructura del grafeno.	19
Figura 5.	Grafeno inducido por láser observado por medio de un microscopio electrónico de barrido.	21
Figura 6.	Placa EVAL-AD5941ELCZ.	23
Figura 7.	Conexión de resistencia con placa EVAL-AD5941ELCZ.	24
Figura 8.	Diseño de electrodo de trabajo y contraelectrodo (mm).	25
Figura 9.	Conexión del sistema de electrodos con la placa EVAL-AD5941ELCZ para realizar las evaluaciones electroquímicas.	27
Figura 10.	Mecanismo de reacción de la glucosa con la glucosa oxidasa (GOx).	28
Figura 11.	Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de 100 Ω .	30
Figura 12.	Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de 1k Ω .	30
Figura 13.	Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de 4.7k Ω .	31
Figura 14.	Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de 10k Ω .	31
Figura 15.	Electrodo de grafeno inducido por láser.	32
Figura 16.	Curvas de respuesta de voltametría cíclica del electrodo de grafeno inducido por láser por cada concentración de ferricianuro potásico.	33

Figura 17.	Curva de calibración de los picos de corriente de oxidación de la voltametría cíclica contra las diferentes concentraciones de ferricianuro potásico.	34
Figura 18.	Promedio de las curvas de respuesta de voltametría cíclica de las concentraciones de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 mM de ferricianuro potásico, obtenidas de las mediciones de cuatro diferentes electrodos.	35
Figura 19.	Curva de calibración de los promedios de las respuestas de voltametría cíclica de los cuatro electrodos distintos, midiendo las distintas concentraciones de ferricianuro potásico.	35
Figura 20.	Amperometría de las concentraciones de ferricianuro potásico medidas con uno de los electrodos de grafeno inducido por láser.	36
Figura 21.	Curva de calibración de los puntos medidos a los 60 segundos de la amperometría de las distintas concentraciones de ferricianuro potásico, medidas con uno de los electrodos.	37
Figura 22.	Curvas de respuesta de voltametría cíclica de concentración de 2.0 mM de ferricianuro potásico, realizadas con electrodo antes y después de haber inmovilizado GOx en la superficie del electrodo de trabajo.	38
Figura 23.	Amperometría de las diferentes concentraciones de glucosa medidas con uno de los electrodos de grafeno inducido por láser con GOx inmovilizada en la superficie de su electrodo de trabajo.	39
Figura 24.	Curva de calibración de puntos medidos a los 60 segundos de la amperometría de las distintas concentraciones de glucosa.	40

La diabetes afecta a millones de personas, especialmente en países de ingresos medios y bajos. Es una de las principales causas de muerte. Los pacientes deben controlar diariamente sus niveles de glucosa en la sangre para tomar decisiones importantes que les permitan regularlos. Para este propósito, el desarrollo de un sistema de medición sencillo y preciso es importante. Por ello, se propuso un biosensor para la medición de glucosa basado en grafeno inducido por láser. Primero, se llevaron a cabo pruebas de voltametría cíclica de resistencias para validar la placa de evaluación. Luego, se diseñaron y fabricaron los electrodos de grafeno inducido por láser, caracterizados electroquímicamente por medio de pruebas de voltametría cíclica y amperometría de ferricianuro potásico. Seguidamente, se inmovilizó glucosa oxidasa en su superficie para medir diferentes concentraciones de glucosa por medio de la amperometría.

Las pruebas de resistencia dieron como resultados pendientes positivas de voltaje contra corriente. Por otra parte, se logró fabricar los electrodos, los cuales, al ser evaluados electroquímicamente, dieron como resultado una relación directamente proporcional en cuanto a las concentraciones y corrientes obtenidas en puntos específicos. Las mediciones de glucosa también indicaron resultados crecientes de corriente para cada concentración. A partir de ello, se concluyó que la placa mide resultados más precisos cuando la resistencia es mayor a la interna. Asimismo, los electrodos tuvieron mediciones electroquímicas reproducibles, capaces de medir las distintas concentraciones de glucosa, cumpliendo, por lo tanto, con su función de biosensor.

Palabras clave: Biosensor, glucosa, grafeno inducido por láser, electroquímica, voltametría cíclica, amperometría.

Diabetes affects millions of people, especially in low- and middle-income countries. It is one of the leading causes of death. Patients must monitor their blood glucose levels daily in order to make important decisions that allow them to regulate these levels. For this purpose, the development of a simple and accurate measurement system is important. Therefore, a biosensor for glucose measurement based on laser-induced graphene was proposed. First, cyclic voltammetry tests of resistors were carried out to validate the evaluation board. Then, the laser-induced graphene electrodes were designed and fabricated, and electrochemically characterized using cyclic voltammetry and amperometry with potassium ferricyanide. Next, glucose oxidase was immobilized on their surface to measure different glucose concentrations using amperometry.

The resistance tests resulted in positive slopes of voltage versus current. Furthermore, the electrodes were successfully fabricated, and when electrochemically evaluated, showed a directly proportional relationship between the concentrations and the currents obtained at specific points. Glucose measurements also showed increasing current values for each concentration. From this, it was concluded that the board provides more accurate measurements when the resistance is greater than the internal resistance. Likewise, the electrodes exhibited reproducible electrochemical measurements, capable of detecting different glucose concentrations, thus fulfilling their function as a biosensor.

Keywords: Biosensor, glucose, laser-induced graphene, electrochemistry, cyclic voltammetry, amperometry.

La diabetes es una de las principales causas de muerte y discapacidad a nivel mundial, afectando especialmente a los países en desarrollo. Los dispositivos utilizados para monitorear la glucosa en la sangre, como glucómetros y medidores continuos, no son tan caros, aunque, a largo plazo y al no tener accesorios reutilizables, pueden representar altos gastos recurrentes. Asimismo, pueden presentar limitaciones en la exactitud de sus mediciones bajo ciertas condiciones. Estos son factores que han llevado al desarrollo de alternativas asequibles y precisas. Entre ellas, se encuentran los biosensores basados en diversos materiales. El grafeno inducido por láser ha demostrado un gran potencial por su bajo costo y buena funcionalidad en cuanto a sus propiedades, como la alta selectividad y sensibilidad.

Este proyecto se basó en el diseño y fabricación de un biosensor compuesto por un sistema de tres electrodos, basado en el grafeno inducido por láser. Para ello, se llevaron a cabo mediciones electroquímicas (voltametría cíclica y amperometría) con una placa EVAL-AD5941ELCZ. Los resultados se validaron por medio de voltametrías cíclicas aplicadas a resistencias. Luego, se desarrollaron los electrodos de grafeno inducido por láser. Para caracterizarlos, las pruebas se aplicaron a distintas concentraciones de ferricianuro potásico. Seguidamente, se inmovilizó glucosa oxidasa (GOx) en la superficie del electrodo de trabajo para medir distintas concentraciones de glucosa por medio de la amperometría.

En los capítulos 3 y 4, se presentan los antecedentes del proyecto, los cuales incluyen la relación del monitoreo de la glucosa con la diabetes, así como distintos tipos de biosensores para medir la glucosa. Además, la justificación incluye datos relevantes acerca de la diabetes y la razón de haber elegido el grafeno inducido por láser para la creación del biosensor en este trabajo. Seguido de estos (capítulo 5), se tiene el alcance, en el cual se explica lo realizado en

este proyecto y sus limitaciones. Luego, en el marco teórico (capítulo 6), se desarrollan temas relevantes, como la diabetes, los biosensores y el grafeno. En la metodología (capítulo 7) se encuentran todas las partes que se llevaron a cabo para el cumplimiento de los objetivos. Los resultados (capítulo 8) muestran las gráficas y datos medidos, para luego discutir y analizarlos (capítulo 10). Finalmente, se tienen las conclusiones (capítulo 11) en cuanto al cumplimiento de los objetivos y las recomendaciones (capítulo 12) para la optimización del trabajo.

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica en la que los niveles de glucosa en la sangre son elevados. Esto puede deberse a una secreción insuficiente de insulina por parte del páncreas o que el cuerpo no pueda procesar adecuadamente la insulina producida. Según la causa, la mayoría de casos se dividen en dos categorías: Diabetes tipo 1 o tipo 2 [1]. El monitoreo de los niveles de glucosa en la sangre para estos pacientes es esencial para identificar el efecto que tienen sobre esta diversos factores, como la alimentación, actividad física, estrés, y en caso de ser necesario, que se deba realizar un ajuste en sus medicamentos [2].

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes técnicas de monitorización de glucosa, con una demanda creciente debido a la prevalencia mundial de casos de diabetes, junto con los avances de la ciencia y la tecnología. Dichos dispositivos presentan mejoras continuas significativas en la precisión de la recolección de datos [3]. La selección y aplicación de una dosis adecuada de insulina para regular los niveles de glucosa se logra mediante la medición contante de la glucemia [4].

Los biosensores son dispositivos integrados autónomos que, por medio de elementos de reconocimiento biológico que se encuentra en contacto directo con un elemento de transducción, proveen información analítica cuantitativa o semicuantitativa. Dicha información es obtenida mediante la detección de un analito o grupo de analitos específicos. Estos dispositivos son aplicados en una gran variedad de ámbitos, como lo son la industria de alimentos, monitoreo ambiental y salud. Con relación a la salud, los sensores de medición de glucosa han sido de las aplicaciones más exitosas y relevantes en cuanto a biosensores [5].

Actualmente, la mayoría de los biosensores de glucosa actuales son electroquímicos, ya que presentan mejor sensibilidad, reproducibilidad, fácil mantenimiento y, en general, son dispositivos de bajo costo. Los biosensores enzimáticos amperométricos de glucosa, que son de tipo electroquímico, son los dispositivos más comunes disponibles comercialmente [6]. Los métodos habituales en los que se utilizan este tipo de biosensores de glucosa son los sistemas de monitoreo continuo de glucosa (MCG) y los biosensores de glucosa para pruebas de diagnóstico en el punto de atención [6]. Los monitores continuos de glucosa son dispositivos que se adhieren a la piel del paciente, generalmente en el brazo y reacciona con las moléculas de glucosa del líquido intersticial [7].

Los biosensores de glucosa para pruebas de diagnóstico en puntos de atención, llamados también glucómetros, utilizan tiras reactivas desechables de papel o plástico con electrodos que contienen enzimas y un mediador redox para la detección de la glucosa [6]. Para realizar la medición, se requiere una muestra de sangre capilar del paciente, la cual se aplica en las tiras reactivas. Dichas tiras se insertan en el medidor, el cual utiliza un factor de conversión para mostrar los resultados equivalentes a la cantidad de glucosa en la sangre [6].

La diabetes es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, siendo catalogada como una de las mayores epidemias en la historia de la humanidad, convirtiéndose también en una de las principales causas de muerte y discapacidad [8], [9]. Para el año 2021, según la Federación Internacional de Diabetes, se estimó que 537 millones de adultos entre 20 y 79 años padecían de diabetes, de los que más de 3 de cada 4 vivían en países de ingresos bajos y medios. Así mismo, en Guatemala, alrededor de 1,149.5 mil adultos entre 20 y 79 años padecían de esta enfermedad, conformando un 11.4% de este grupo poblacional, sin tomar en cuenta los casos no diagnosticados [10].

Los pacientes diabéticos deben mantener un control minucioso y constante de los niveles de glucosa en su sangre, lo que requiere el uso de dispositivos especializados para ello, como lo son los glucómetros y los medidores continuos de glucosa (MCG). A pesar de la amplia variedad de beneficios de estos dispositivos, estos aún presentan desventajas, que afectan tanto la comodidad del paciente como la exactitud de los resultados. Por ello, es importante buscar alternativas que resuelvan este tipo de problemas en la detección de glucosa.

Los glucómetros generalmente no son tan caros, sin embargo, requieren de tiras reactivas y otros accesorios que suelen tener precios elevados y que no son reutilizables, por lo que deben ser adquiridos cada cierto tiempo. Esto es un problema, considerando la alta cantidad de personas en entornos de bajos recursos o países en desarrollo, como es el caso de Guatemala, que padecen de diabetes, y quienes generalmente no cuentan con seguros médicos que los ayuden a cubrir dichos gastos. Así mismo, dichas tiras pueden ser afectadas por diversos factores, como temperaturas extremas, humedad y tienen cortos periodos de expiración, lo cual puede llegar a afectar la exactitud de los resultados de la prueba [11].

Para solucionar estas problemáticas, en busca de mejores alternativas, se han desarrollado diferentes variaciones de biosensores. Estos están basados en diversidad de materiales y técnicas que buscan obtener mejores resultados. El grafeno es uno de los materiales que ha tenido un auge en la aplicación en este tipo de tecnologías, específicamente en biosensores electroquímicos, debido a su estructura física única y por sus propiedades químicas y eléctricas [12]. Al compararlo con otros materiales que son utilizados en sensores, como los son el oro, silicio o nanotubos de carbono, el grafeno presenta ventajas como menores costos, mayor sensibilidad, tiempo de respuesta más rápido y mejor biocompatibilidad [13]. Una de las técnicas más utilizadas para generar el grafeno es la inducción por láser, aplicado a electrodos.

Los electrodos de grafeno inducido por láser, utilizados para la medición de la glucosa y otras aplicaciones en biosensores, son una alternativa de bajo costo. Esto se debe a que su proceso de producción es simple y los materiales utilizados, así como las técnicas de detección aplicadas, son de baja complejidad a comparación de otros métodos [12]. Por lo tanto, la utilización de estos electrodos como biosensores de glucosa puede ayudar a reducir significativamente la carga financiera asociada con el control de la diabetes. Así mismo, al ser más asequibles, el acceso a este servicio de salud puede alcanzar a una población más amplia.

El grafeno también presenta otras propiedades que lo han hecho sobresalir en su aplicación en biosensores. Este presenta una alta área de superficie y alta conductividad, lo cual permite la captura y transducción eficiente de interacciones biomoleculares. Al ser utilizado en biosensores, también presentan una alta selectividad y sensibilidad, optimizando los resultados de las mediciones [13]. Estas características son esenciales para un biosensor eficaz, ya que permiten que las mediciones de las moléculas, en este caso la glucosa, sean precisas, incluso a bajas concentraciones [14].

4.1. Objetivo general

Diseñar y fabricar un sistema de 3 electrodos basado en grafeno inducido por láser para ser utilizado en aplicaciones de biosensado aplicando una voltametría cíclica.

4.2. Objetivos específicos

- Implementar y validar la placa EVAL-AD5941ELCZ para realizar mediciones de voltametría cíclica.
- Diseñar y fabricar electrodos de grafeno inducido por láser.
- Caracterizar electroquímicamente el electrodo realizando la técnica de medición establecida, utilizando ferricianuro de potasio.
- Evaluar los electrodos para ser aplicados como un biosensor.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo el diseño y fabricación de un sistema de 3 electrodos basado en grafeno inducido por láser para ser utilizados como un biosensor para la medición de glucosa. Para ello, se utilizará una placa de mediciones electroquímicas EVAL-AD5941ELCZ. Con ella, se llevarán a cabo pruebas de voltametría cíclica y amperometría.

Como primer paso, se llevarán a cabo pruebas de voltametría cíclica aplicada a resistencias de distintos valores (100, 1k, 4.7k y 10k Ω) con el fin de validar los resultados dados por la placa e identificar limitaciones o parámetros que haya que tomar en cuenta para el resto de pruebas. Estos valores se compararán con valores teóricos para identificar que tan exactos son los obtenidos experimentalmente. Para ello, se medirá la pendiente de la gráfica obtenida (Voltaje vs. Corriente) y el porcentaje de error al relacionar ambos datos.

Para el diseño de los electrodos, se incluirá un electrodo de trabajo junto con un contraelectrodo. Estos se fabricarán por medio de una máquina de corte láser bajo parámetros específicos para asegurar la formación del grafeno inducido por láser. Para la formación del sistema de los tres electrodos se utilizará un electrodo de referencia externo de Ag/AgCl y como contraelectrodo, una pieza de acero inoxidable. A pesar de haber incluido un contraelectrodo en el diseño grabado, el acero inoxidable servirá como control, ya que el electrodo de trabajo es en el que se llevarán a cabo las reacciones, por lo que se espera que en futuros trabajos pueda optimizarse el contraelectrodo de grafeno para ser utilizado. Además, se utilizará un único diseño a lo largo de todas las pruebas y no se llevarán a cabo mayores análisis para comprobar la formación del grafeno.

La caracterización electroquímica se llevará a cabo con cuatro electrodos distintos por medio de voltametrías cíclicas de concentraciones específicas de ferricianuro potásico (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mM). Para estas, se utilizarán los mismos parámetros cada vez, obteniendo resultados individuales por electrodo y luego promediando los datos por cada concentración para evaluar su reproducibilidad. Así mismo, se llevarán a cabo pruebas de amperometría con algunas de las concentraciones anteriores (0, 0.5, 1.5 y 2.5 mM).

Se inmovilizarán enzimas de Glucosa Oxidasa (GOx) en la superficie del electrodo de trabajo para ser utilizados como un biosensores de medición de glucosa. La inmovilización se llevará a cabo solamente por una técnica de adsorción, por lo que su estabilidad a largo plazo es limitada. Además, las concentraciones de glucosa (0, 2, 6, 8, 10 mM) se medirán por medio de pruebas de amperometría. Para ello, no se utilizarán muestras humanas, sino que soluciones preparadas. Así mismo, los biosensores desarrollados no pretenden ser una alternativa reutilizable ni usada en puntos de atención para prueba de diagnóstico debido a su estructura voluminosa y a las técnicas de medición aplicadas.

6.1. Diabetes

6.1.1. Definición

La diabetes mellitus, conocida como diabetes, es una enfermedad crónica relacionada al metabolismo de la glucosa en el cuerpo [15]. Se caracteriza principalmente por la hiperglucemia, en la cual los niveles de glucosa en la sangre son elevados. La insulina es la hormona encargada de la regulación de glucosa en el torrente sanguíneo. Cuando no se produce suficiente insulina o el cuerpo no la procesa adecuadamente, la glucosa se acumula en la sangre causando la condición diabética [16].

Los niveles normales de la concentración de glucosa se encuentran entre los 70 mg/dL y los 100 mg/dL en ayunas y por debajo de los 140 mg/dL luego de dos horas de haber comido [17]. Un caso es considerado como diabetes cuando la glucemia tiene un valor por arriba de los 126 mg/dL en ayunas [18]. Así mismo, si un paciente presenta niveles entre los 100 mg/dL y 125 mg/dL, es considerado como un caso de prediabetes [18]. Otros casos en lo que se puede diagnosticar la diabetes son si el paciente presenta síntomas y un nivel superior a los 200 mg/dL en una prueba de sangre aleatoria o resultados anormales en una prueba de tolerancia oral a la glucosa [19].

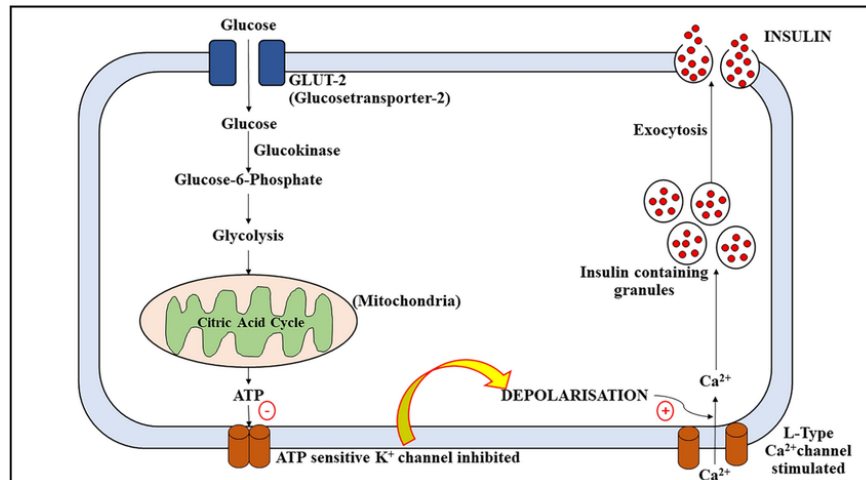
6.1.2. Base molecular

El páncreas es el órgano encargado del balance digestivo y de la regulación de glucosa, por medio de la producción de hormonas exocrinas y endocrinas que ayudan a ambos procesos respectivamente [20]. Alrededor del 98 % de la masa pancreática está compuesta de células acinares, encargándose del proceso exocrino. La función de estas células comprende la síntesis, almacenamiento y secreción de enzimas digestivas, como la lipasa y amilasa pancreáticas, para luego enviarlas al intestino delgado a través del duodeno para ayudar en el proceso digestivo [20], [21]. El resto del páncreas se encuentra conformado por islotes pancreáticos, conocidos también como islotes de Langerhans, los cuales son grupos de cinco diferentes tipos de células, encargadas de secretar diferentes hormonas que participan en el proceso endocrino, incluida la regulación de glucosa [20].

Las células que conforman los islotes pancreáticos son las células alfa (α), beta (β), delta (δ), epsilon (ϵ) y células PP [20]. Las principales hormonas secretadas por el páncreas son la insulina y el glucagón, las cuales tienen efectos hipoglucémicos e hiperglucémicos respectivamente [20], [22]. Estas son secretadas por las células beta y alfa respectivamente, las cuales comprenden la mayoría de las células de los islotes [20]. Varios factores hormonales, nutricionales y neurales activan la respuesta de dichas hormonas y la coordinación entre ambas es indispensable en la regulación de la homeostasis de la glucosa [22].

El proceso de secreción de insulina por parte de las células beta (Figura 1) comienza cuando los niveles de glucosa se elevan en la sangre [23]. La proteína GLUT2, o transportadora de glucosa, como su nombre lo indica, es la encargada de llevar la glucosa hacia las células beta [22]. Dentro de estas, la enzima glucoquinasa actúa como un sensor de glucosa y la fosforila a glucosa-6-fosfato ($C_6H_{13}O_9P$), generando luego ATP [23]. El ATP causa que los canales de K^+ de las células se cierren y que estas se depolaricen. A su vez, los canales de calcio dependientes de voltaje se activan y aumenta la concentración intracelular de calcio, causando la secreción pulsátil de insulina [23].

Figura 1: *Proceso de secreción de la insulina por parte de las células beta, desencadenado por la elevación de concentración de glucosa en la sangre.*



Nota: Adaptada de [24].

6.1.3. Causas y clasificación

La diabetes se clasifica en dos tipos principales, diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2, según la causa y la manera en la que esta se manifiesta. La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune en la que el sistema inmunitario ataca las células beta pancreáticas, causando que el páncreas tenga una producción baja o nula de de insulina. Las causas de este tipo se encuentran generalmente asociadas a la genética, inmunología, factores ambientales, entre otros [25]. La diabetes tipo 2 es causada por resistencia a la insulina, en la que el cuerpo utiliza ineficientemente la insulina secretada [1].

La diabetes tipo 1 la padecen alrededor del 5 al 10 de pacientes [1]. Es causada cuando el sistema inmune ataca y destruye las células beta, por lo que también se relaciona a otras condiciones autoinmunes como la celiaquía, la enfermedad tiroidea autoinmune y la artritis reumatoide [26]. Debido a esto, la producción de insulina se reduce o se deja de producir por completo [25]. Esto puede verse desencadenado por factores ambientales, como virus, o predisposiciones previas relacionadas a la genética [19], [27]. Dicha destrucción de las células beta generalmente se da de manera rápida en niños y adolescentes que se encuentran predispuestos y, de manera más lenta, en adultos [1]. Este tipo de diabetes es también llamada insulino-dependiente, ya que por la carencia de insulina los pacientes deben inyectarse dicha hormona para llevar un estilo de vida normal [1].

La diabetes tipo 2 es más común que la tipo 1, constituyendo alrededor del 90-95 de los pacientes [1]. Es causada por una disfunción de las células beta y resistencia a la insulina [1]. La resistencia a la insulina se da cuando las células de diferentes tejidos, como los músculos

y el hígado, no logran la homeostasis de la glucosa, a pesar de tener niveles suficientes de insulina. Debido a esto, se producen mayores niveles de insulina para compensar el proceso, aun en ayunas [28]. Esto puede desencadenar un caso de prediabetes, la cual es la condición en la que los niveles de glucosa en la sangre son elevados, pero no lo suficiente para ser considerados en el rango de diabetes [29]. Sin embargo, si este padecimiento se descuida, puede convertirse en diabetes tipo 2 [29]. Debido a su naturaleza, también es llamada insulino-independiente, ya que no es necesario el suministro de dicha hormona para su tratamiento [1].

La resistencia a la insulina puede desencadenarse por diversas causas. Una de las principales es el sobrepeso u obesidad y la falta de actividad física. Otras condiciones de salud como la presión arterial alta y los niveles anormales de colesterol, así como enfermedades cardíacas, también son causas comunes. Además, las mujeres que padecen de síndrome de ovario poliquístico se encuentran predispuestas a tener resistencia a la insulina [29]. La diabetes también puede darse durante el embarazo, la cual es llamada diabetes gestacional. La diferencia de esta condición con la diabetes de tipo 2 es que esta solamente se da durante la gestación, a pesar de tener causas similares. Sin embargo, existe la posibilidad de que la hiperglucemia continúe, llegando a convertirse en diabetes tipo 2 [1].

6.1.4. Síntomas

La diabetes puede manifestarse mediante diversos síntomas, derivados de la hiperglucemia. Son más visibles en la diabetes tipo 1 que en la tipo 2, debido a que la última se desarrolla gradualmente, por lo que, al principio, los síntomas pueden pasar desapercibidos [1]. Los más comunes son la polidipsia, sed excesiva; la poliuria, aumento frecuente de la necesidad de orinar; y la polifagia, incremento de la necesidad de ingerir alimentos [30]. A pesar de la polifagia, puede darse una pérdida de peso anormal [1]. Otros síntomas comunes son la fatiga, la visión borrosa y la contracción recurrente de infecciones [31].

La detección temprana de la diabetes y la reducción y balance de los niveles de glucosa, aparte de reducir los síntomas, son importantes para la prevención de complicaciones a largo plazo [31]. La nefropatía, neuropatía, retinopatía y cataratas diabéticas son causadas por la hiperglucemia prolongada [30]. Esto debido a que los niveles elevados de glucosa causan desbalances en distintos procesos biológicos que llegan a afectar varios órganos del cuerpo, resultando en dichas complicaciones, las cuales desencadenan sus propios síntomas [30]. Así mismo, entre los pacientes con diabetes prevalecen otros padecimientos como cardiopatías, enfermedad arterial coronaria y muerte súbita cardíaca [30].

6.1.5. Manejo

La diabetes puede tratarse y manejarse según el tipo y los factores que estén causando la elevación de glucosa en la sangre. Los pacientes que padecen diabetes tipo 1 necesitan de administración diaria de insulina. Durante el día se deben administrar múltiples dosis de insulina de acción prolongada, la cual provee insulina basal. Luego, antes de cada comida, se debe administrar insulina de acción rápida, la cual ayuda a controlar los niveles de glucosa luego de la ingesta [31].

La diabetes tipo 2 tiene la posibilidad de ser revertida, principalmente al implementar modificaciones en el estilo de vida [32]. Las principales recomendaciones para estos pacientes son la pérdida de peso, aumento de la frecuencia de actividad física, evitar fumar e ingerir bebidas alcohólicas, y mantener una dieta saludable que contribuya al balance de la regulación de los niveles de glucosa [32]. Esto, a su vez, debe ir acompañado por un monitoreo diario de la glucemia para poder tomar las decisiones correspondientes e identificar el efecto de dichos factores en su salud [33].

6.2. Biosensores

6.2.1. Definición

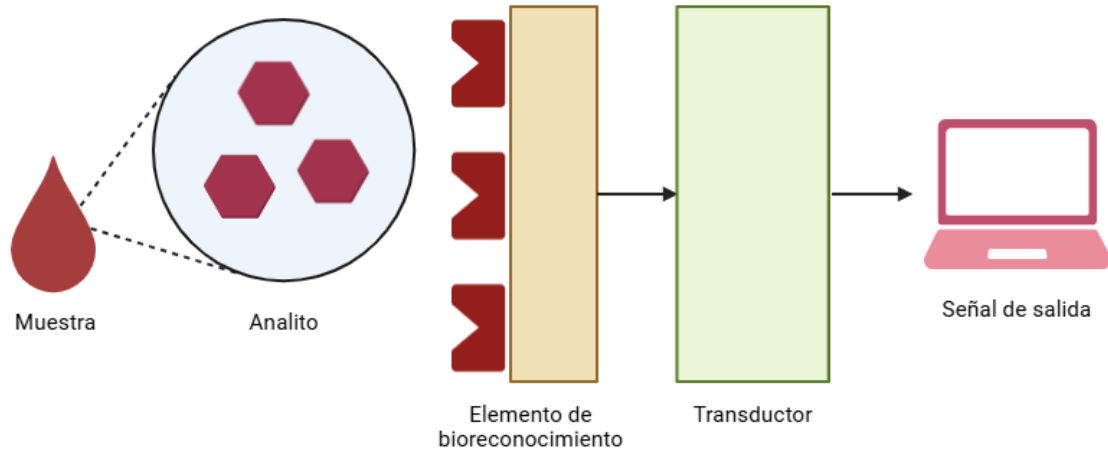
Los biosensores son dispositivos analíticos que tienen como fin la detección de compuestos químicos o biológicos mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas [34]. Estas señales son generadas por medio de reacciones bioquímicas en el dispositivo, el cual contiene un elemento de reconocimiento biológico, que pueden ser enzimas, anticuerpos, ácido nucleico o células, según el analito que se requiere detectar [34]. Las señales generadas son proporcionales a la concentración del analito detectado en la muestra [5].

El sistema del biosensor consiste de un grupo de componentes que trabajan en conjunto para la detección y cuantificación de información química o biológica (Figura 2). Los analitos son las sustancias a detectar, las cuales deben estar contenidas en una muestra [5]. En el caso de los biosensores con aplicaciones médicas, los analitos más comunes son la glucosa, ácido úrico, creatinina y lactato [35]. Las muestras en las que se pueden encontrar dichos analitos son la sangre, sudor, orina, saliva, lágrimas o tejido intersticial [36].

La estructura del biosensor consiste principalmente del elemento de bioreconocimiento y el transductor. Los elementos de bioreconocimiento son las moléculas que reconocen específicamente al analito que se requiere identificar [37]. Por lo tanto, dependiendo del propósito del biosensor, se elige el tipo de molécula adecuada que permita coincidir con el analito,

según sus características y propiedades, potenciando así el rendimiento del biosensor [37]. Dichos elementos se encuentran suspendidos sobre la superficie del transductor, el cual es el encargado de convertir la señal biológica en una señal que pueda ser medida cualitativa o cuantitativamente [5]. Si se agrega un elemento electrónico, es posible leer la señal de salida del transductor para rastrear, analizar y registrar los resultados y evaluar la salud del paciente, en el caso de los biosensores con aplicaciones médicas [38].

Figura 2: Estructura básica de un biosensor.



Nota: Elaboración propia.

Existen diversas clasificaciones de biosensores, dependiendo su tipo de transductor, y por lo tanto, de cómo se convierte la información y de la señal de salida que se obtiene. Así mismo, el tipo de transductor depende del material con el que esté fabricado, las especificaciones del sensor y el mecanismo que utilizará para convertir la señal [38]. Con base en esto, las diferentes clasificaciones de biosensores son: Electroquímicos, ópticos, térmicos/calorimétricos y piezoeléctricos [38]. Estos, a su vez, cuentan con distintas sub clasificaciones, que son variaciones de biosensores dependiendo del propósito y las necesidades de su aplicación.

Los biosensores electroquímicos utilizan reacciones químicas entre el analito y el elemento de bioreconocimiento, en las que se producen o consumen iones o electrones por parte del analito, transformando la información a propiedades eléctricas medibles proporcionales a la concentración del analito, como lo puede ser la corriente eléctrica [38]. Dicha transferencia directa de electrones en reacciones de reducción produce una corriente farádica, la cual es la base de este tipo de biosensores [38].

Los biosensores tienen que cumplir con ciertos parámetros para que su rendimiento sea el óptimo y que los resultados que produzcan sean lo más exactos posibles. Estas características son la selectividad, especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. La selectividad es la

capacidad de responder ante la clase de analito de interés, mientras que la especificidad significa que solamente se detectará y reconocerá con exactitud el analito específico, en ambas distinguiéndolos entre otras sustancias de interferencia en la muestra [5], [39]. La sensibilidad se define según la concentración mínima y máxima de analito que el biosensor puede reconocer y medir para producir una señal de salida [37]. La reproducibilidad es la capacidad que el sensor tiene para producir el mismo resultado al volver a realizar las mediciones de analito, así como de fabricar nuevamente el sensor y que sus resultados no varíen ante las mismas condiciones [37].

6.2.2. Biosensores para detección de glucosa

Los dispositivos para la detección de glucosa son de las aplicaciones más comunes de biosensores debido a la alta prevalencia de diabetes a nivel mundial, abarcando alrededor del 70 % del mercado de biosensores [40], [41]. Por ello, se han desarrollado una gran variedad de técnicas para el monitoreo y detección de los niveles de glucosa, los cuales pueden dividirse generalmente en no-enzimáticos y enzimáticos [17]. Los biosensores no-enzimáticos se basan en la modificación del electrodo de trabajo con nanomateriales, como lo pueden ser diferentes metales, óxidos de metal y nanomateriales basados en carbono, para luego obtener una respuesta que se encuentra directamente relacionada a la oxidación de la glucosa en dicha superficie modificada [17]. Esto es posible ya que los átomos de la superficie actúan como electrocatalizadores al reaccionar con la glucosa [42]. Las ventajas de este método son que los sensores poseen una alta estabilidad, sensibilidad y son fáciles de fabricar, sin embargo, su especificidad es muy baja [17].

Los biosensores enzimáticos son aquellos que dependen de una enzima para catalizar la reacción del analito específico [17]. En el caso de la detección de la glucosa, las enzimas que se utilizan son la glucosa deshidrogenasa (GDH) o la glucosa oxidasa (GOx) [42]. La GOx es la enzima que se utiliza de manera más común debido a que provee una alta sensibilidad y especificidad para el funcionamiento del sensor [17]. La función de la GOx es que, al ser inmovilizada en la superficie del sensor, cataliza la oxidación de la glucosa por medio de oxígeno molecular, lo que produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno [6]. Luego, el peróxido de hidrógeno es oxidado en un ánodo catalítico y produce un flujo de electrones que es posible reconocer mediante el electrodo y que representa proporcionalmente el número de moléculas de glucosa presentes en la sangre [6]. Así mismo, para la detección de glucosa, los biosensores electroquímicos, específicamente amperométricos, son los más comunes debido a factores como límites de detección bajos, bajos costos de producción y tiempos de respuesta mejores a comparación de otros métodos, lo cual los hace ideales para su aplicación [42].

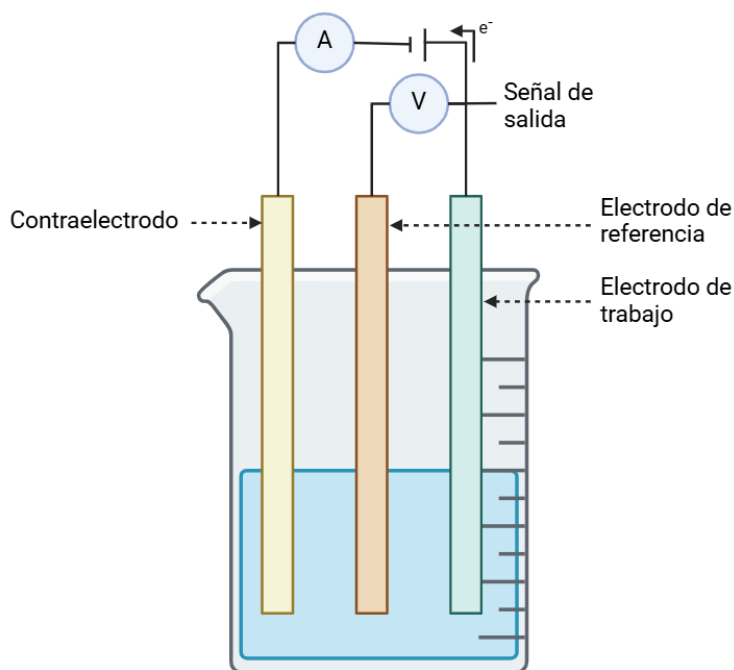
6.2.3. Biosensores amperométricos

La función de los biosensores amperométricos se basa en la transformación de la información biológica del analito específico en una muestra a una señal de corriente eléctrica que permita la identificación y medición de la misma [41]. Esta conversión se produce ante la interacción del analito con el elemento de reconocimiento biológico y el electrodo, al ocurrir un intercambio de electrones entre estos [43]. En este tipo de electrodos, el analito es sometido a una reacción de reducción u oxidación [38].

Este tipo de biosensor consiste generalmente de un sistema de tres electrodos con funciones distintas, siendo estos el electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia (Figura 3). En el electrodo de trabajo se encuentra el elemento de reconocimiento biológico a utilizar, por lo que en este ocurre el proceso electroquímico objetivo [44]. El contraelectrodo tiene como objetivo completar el circuito ya que a través de este ocurre el flujo de corriente (electrones) entre los otros dos electrodos [44]. Por su parte, el electrodo de referencia, como su nombre lo indica, funciona como un punto de referencia para poder medir el potencial de los otros electrodos en la celda electroquímica [44]. Esto es posible debido a que tiene su propio potencial de equilibrio bien definido y estable [44].

Tomando en cuenta el sistema de electrodos, las reacciones químicas son producidas al aplicar un potencial constante en los electrodos de trabajo, cuando los electrodos se encuentran en contacto con una solución electrolítica. Al ocurrir dicha reacción, se genera la señal de corriente eléctrica que corresponde a la concentración de los analitos [45].

Figura 3: Biosensor amperométrico basado en un sistema de 3 electrodos.



Nota: Elaboración propia.

6.2.4. Voltametría cíclica

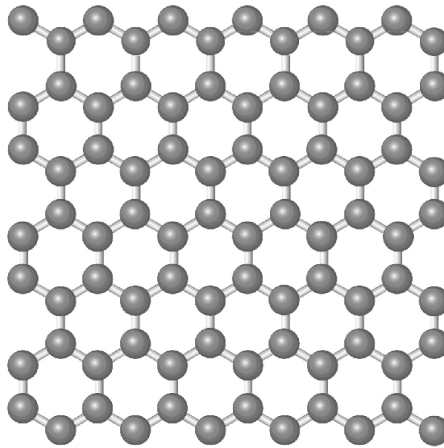
La voltametría cíclica es una prueba electroquímica en la que, por medio de los procesos de reducción y oxidación, se estudia el comportamiento de especies moleculares ante estas reacciones [44]. En esta prueba, se aplica un potencial variante, yendo de un valor a otro de manera cíclica. A partir de ello, se obtiene una respuesta de corriente, dependiente de los valores de voltaje. La primera sección, cuando se realiza un barrido de voltaje del potencial inicial al final se llama trazo catódico. Luego, cuando se invierte la dirección de barrido, desde el potencial final al inicial, se denomina trazo anódico [44]. Al aplicar esta prueba electroquímicamente, ocurren dos procesos principales. En el trazo catódico, se forma un pico positivo, el cual demuestra una reacción de oxidación. Luego, al invertirse el barrido de voltaje, se forma un pico negativo, indicando una reacción de reducción [46].

6.3. Grafeno

6.3.1. Propiedades

El grafeno es un material compuesto por una red bidimensional en forma de panal de átomos de carbono unidos por enlaces sp^2 y que tiene el grosor de un átomo [47]. Esta estructura está compuesta por átomos de carbono unidos mediante enlaces covalentes [48] (Figura 4). Su estructura hace que este material sea tanto flexible como robusto, lo que permite que se pueda funcionalizar o modificar su estructura de carbono [49]. A su vez, hace que el grafeno tenga una variedad de propiedades que lo han convertido en un material de interés para diversas aplicaciones [47].

Figura 4: *Estructura del grafeno.*



Nota: Adaptada de [50].

El grafeno es un material con una alta conducción eléctrica, debido a que permite una alta movilidad de electrones a temperatura ambiente [47]. Así mismo, ha llegado a ser considerado como una alternativa a los nanotubos de carbono para transistores de efecto campo (FET) debido a que tiene otras características como una gran extensión lateral y sensibilidad al efecto de campo, que suponen una facilidad de contacto [47].

Dentro de las propiedades mecánicas del grafeno resaltan que tiene un módulo de Young alto, con un valor de 1 TPa, y fuerza intrínseca de 130 GPa [51]. Por otra parte, dentro de sus propiedades químicas, se ha demostrado que el grafeno es capaz de detectar una gran variedad de moléculas, como gases y biomoléculas [49]. Esto es posible ya que, en función del grado de adsorción de la superficie y la gran área de superficie específica del grafeno, este cambia su conductancia y hay una transferencia de cargas entre el grafeno y las moléculas adsorbidas [49]. Así mismo, tiene una alta estabilidad térmica y conductividad térmica [52].

6.3.2. Métodos de fabricación

El grafeno es un material que puede obtenerse por distintos métodos de fabricación, los cuales se pueden dividir en descendentes y ascendentes [53]. Los métodos descendentes se refieren a la separación de las capas de grafeno apiladas que componen el grafito superando las fuerzas de van der Waals [54]. Entre los métodos que conforman esta categoría están la exfoliación micromecánica y exfoliación de grafito en solventes. Por su parte, en los métodos ascendentes se sintetiza el grafeno a partir de moléculas de carbón [54]. Estos métodos incluyen el crecimiento por deposición química de vapor (CVD por sus siglas en inglés) y el crecimiento epitaxial en carburo de silicio (SiC).

La exfoliación micromecánica es de los métodos más sencillos para la síntesis de grafeno. Esta técnica consiste en la deposición de micropilares de grafito en cinta adhesiva y realizando repeticiones de pegado y despegado de dicha cinta hasta obtener una fina capa de grafeno que componía el grafito. Sin embargo, si no se realiza adecuadamente, no asegura del todo que el material resultante cumpla con todas las características del grafeno [47]. La exfoliación de grafito en solventes consiste en utilizar ultrasonidos de alta intensidad para exponer polvos de grafeno que se encuentren en distintos solventes orgánicos [49].

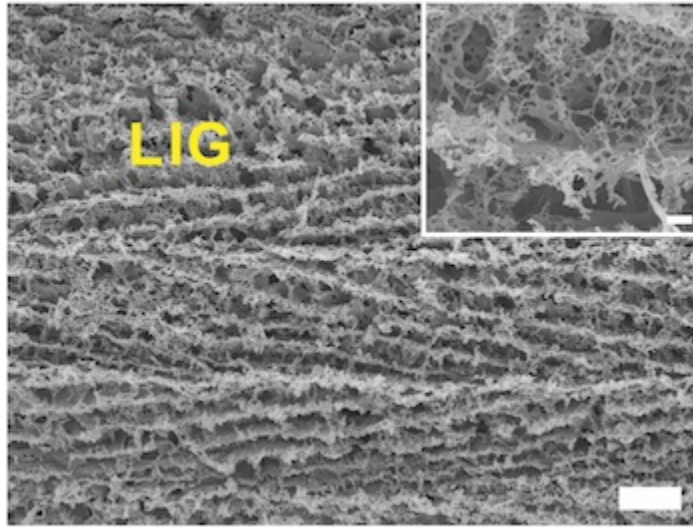
Los métodos de crecimiento que utilizan la deposición química de vapor se basan en la descomposición de precursores de carbono, como el alcanfor, por medio de cámaras de deposición química de vapor a temperaturas específicas, en las que a su vez se inyectan gases portadores de carbono como el metano [53]. El material descompuesto forma capas de grafeno sobre láminas de metal, como lo puede ser la espuma de níquel [40]. Por su parte, el crecimiento epitaxial en carburo de silicio consiste en la evaporación del silicio de obleas de carburo de silicio utilizando altas temperaturas, ya sea por medio de cámaras de vacío o presión atmosférica [49]. Esto da a lugar a la obtención de grafeno del tamaño de la oblea utilizada [49].

6.3.3. Grafeno inducido por láser

El grafeno inducido por láser es una forma del grafeno fabricado por medio de la grabación sobre un material precursor, generalmente poliimida, utilizando un láser infrarrojo de CO₂, con una longitud de onda de 10.6 μm [55]. La síntesis del grafeno inducido por láser ocurre debido a que, al aplicar el calor en la poliimida, los átomos de carbono que se encuentran enlazados tanto con oxígeno como con nitrógeno por medio de hibridación sp³ y sp², se descomponen y reorganizan formando varias capas de átomos de carbono hibridizados sp², los cuales conforman el grafeno [56].

Este tipo de grafeno tiene una textura porosa, como se observa en la Figura 5, y es caracterizado por tener propiedades como una elevada área de superficie, alta conductividad y alta estabilidad térmica [55]. Además, una de las ventajas que permiten poder utilizar este tipo de grafeno en una variedad de aplicaciones es que es posible modificar su forma y patrón por medio del diseño computarizado [56]. Debido a dichas características, el grafeno inducido por láser se utiliza en diversos campos cómo microfluidos, electrocatalizadores y sensores [55].

Figura 5: *Grafeno inducido por láser observado por medio de un microscopio electrónico de barrido.*



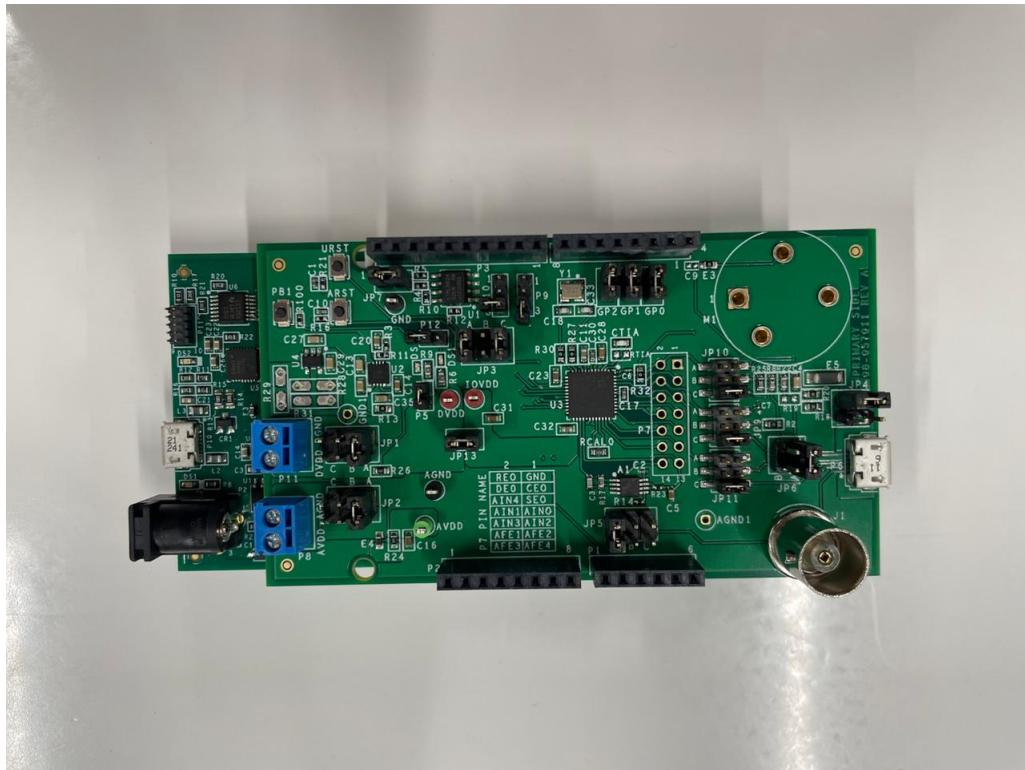
Nota: Adaptada de [57].

La metodología de este trabajo consiste en una serie de procesos y métodos, con el fin común de poder fabricar electrodos de grafeno inducido por láser, así como poder validar su funcionamiento. Para ello se muestran los materiales utilizados, con los respectivos métodos llevados a cabo para el cumplimiento de ello.

7.1. Validación de placa EVAL-AD5941ELCZ

Se utilizó la placa EVAL-AD5941ELCZ (Analog Devices, Massachusetts, EE.UU), la cual es una placa para realizar evaluaciones electroquímicas, en este caso con el fin de realizar voltametrías cíclicas (Figura 6). Esta consiste de un módulo base EVAL-ADICUP3029, junto con el módulo EVAL-AD5941ELCZ, el cual es el encargado de llevar a cabo las funciones específicas de electroquímica. El módulo base contiene un puerto de micro USB, en el cual se conecta un cable micro USB a USB-A para poder conectar la placa a la computadora. Por su parte, módulo EVAL-AD5940ELCZ contienen un módulo micro USB para insertar el cable de micro USB a pinzas de cocodrilo, las cuales se identifican por colores distintos. La pinza verde funciona como electrodo de trabajo (SE0), la pinza roja es el contraelectrodo (CE0) y la pinza blanca es el electrodo de referencia (RE0).

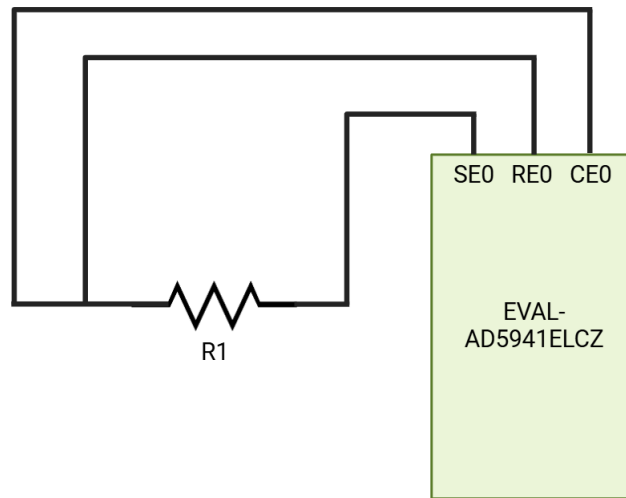
Figura 6: Placa EVAL-AD5941ELCZ.



Nota: Imagen propia.

Para poder validar el funcionamiento de la placa se llevaron a cabo pruebas de voltametría cíclica con componentes electrónicos, siendo resistencias de diferentes valores (100, 1k, 4.7k y 10k Ω). El principio de estos componentes se basa en la Ley de Ohm, la cual indica que el voltaje es igual al producto de la resistencia con la corriente. Por lo tanto, indican los valores de corriente proporcionales a valores de potencial específicos, según la resistencia del componente. Para estas pruebas se realizaron tres ciclos, aplicando un rango de voltaje de -1000 mV a +1000 mV, con una tasa de escaneo de 66.67 mV/s y un escalón de potencial de 2 mV. Así mismo, tomando en cuenta una resistencia interna de la placa de 100 Ω . En este caso, los cables para el electrodo de referencia y para el contraelectrodo se conectaron a uno de los extremos del componente y para el electrodo de trabajo en el otro extremo (Figura 7). Luego, los resultados de las pendientes de las gráficas de resistencias se compararon contra los valores teóricos de los valores de los componentes para validar dichos resultados.

Figura 7: *Conexión de resistencia con placa EVAL-AD5941ELCZ.*

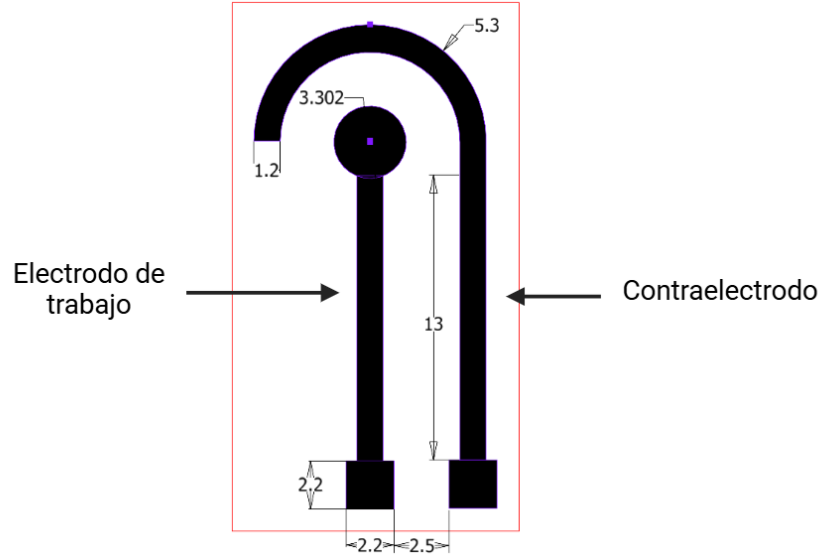


Nota: Elaboración propia.

7.2. Diseño de electrodos

El sistema de electrodos se diseñó por medio del software Inventor (Autodesk, San Francisco, CA, EE.UU). En este, se diseñó el sistema de electrodo de trabajo junto con el contraelectrodo (Figura 8). Para ello, se tomaron en cuenta ciertas características, como que el electrodo de trabajo tenga un área mayor para colocar el elemento de bioreconocimiento donde se llevará a cabo la reacción y que ambos electrodos cuenten con área suficiente en sus extremos para realizar las conexiones de cables, así como se observa en la parte inferior de cada uno.

Figura 8: *Diseño de electrodo de trabajo y contraelectrodo (mm).*



Nota: Elaboración propia.

En el software, los electrodos se diseñaron de color negro sólido para su grabación. Asimismo, se colocó un borde rojo alrededor para cortarlos individualmente. Dicho trazo se configuró con un grosor de 0.01 mm.

7.3. Fabricación de electrodos

Los electrodos diseñados se fabricaron por medio de una cortadora láser (PLS4.75, Universal Laser Systems, Scottsdale, Arizona, EE.UU.) para obtener el grafeno inducido por láser. Para ello, se utilizó una hoja de poliimida tipo *Kapton*[®] con un grosor de 75 μm (DuPont, EE.UU). La hoja se colocó sobre una pieza de acrílico, pegando las esquinas de la pieza del papel a esta, para evitar que la hoja se moviera durante el proceso de grabado. Al tener el diseño cargado en el software de impresión, se asignaron parámetros de material, velocidad y potencia de láser específicos para asegurar la formación del grafeno. Se seleccionó el material de poliimida *Kapton*[®], y se modificaron los parámetros de velocidad y potencia de láser de los diferentes colores, los cuales definen la acción de la máquina. Para el color negro (grabado) se utilizó una velocidad de 7.5 % y potencia de 17 %. Para el color rojo (corte) se aplicó una velocidad de 75 % y potencia de láser de 100 %. En este caso, el color negro representó el grabado de la figura de los electrodos y, por lo tanto, la formación del grafeno y con color rojo se realizó el corte de los bordes para cada sistema de electrodos individual.

Al obtener los electrodos inducidos por láser, cada uno de estos se limpió con etanol al 70 % y luego con agua destilada. Al estar secos, a cada uno se les colocó una pieza de *Kapton®* tape en la región de los canales.

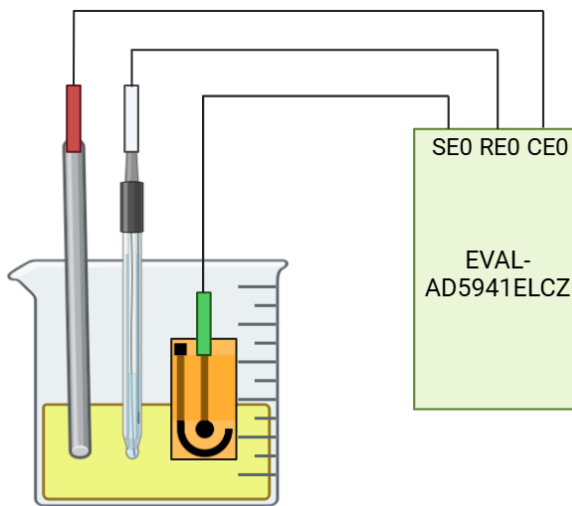
7.4. Caracterización electroquímica de electrodos

Los electrodos fabricados se caracterizaron electroquímicamente aplicando la voltametría cíclica en distintas concentraciones (0, 0.5, 1.5, 2.0, 2.5 mM) de ferricianuro potásico ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Sigma-Aldrich, Alemania) diluidas en 1x de solución tampón de fosfato (PBS por sus siglas en inglés) (OmniPur, Millipore, Burlington, Massachusetts, EE.UU.). De los electrodos fabricados, se seleccionó una muestra de cuatro para ponerlos a prueba, realizando la voltametría tres veces por concentración. Los parámetros utilizados fueron un rango de voltaje de -800 mV a +800 mV por 1 ciclo, una tasa de escaneo de 50 mV/s y un escalón de potencial de 10 mV.

El sistema de electrodos se conformó por un electrodo externo de referencia de Ag/AgCl (MCLOIAUZQLP, Ubna Distribution Llc, EE.UU.), una pieza de acero inoxidable como contraelectrodo para maximizar la estabilidad de las reacciones y el electrodo de trabajo de grafeno inducido por láser. Las tres partes se colocaron juntas dentro de la solución a medir, conectados a la placa con los cables correspondientes (Figura 9).

Como parte de las evaluaciones electroquímicas también se realizaron pruebas de amperometría de las concentraciones de ferricianuro potásico. Estas se realizaron con un voltaje fijo de 800 mV, siendo este la diferencia de potencial de 1000 mV en el electrodo de trabajo y 200 mV del electrodo de referencia, durante 80 segundos. Esto se repitió al menos cinco veces por concentración con cada electrodo.

Figura 9: *Conexión del sistema de electrodos con la placa EVAL-AD5941ELCZ para realizar las evaluaciones electroquímicas.*

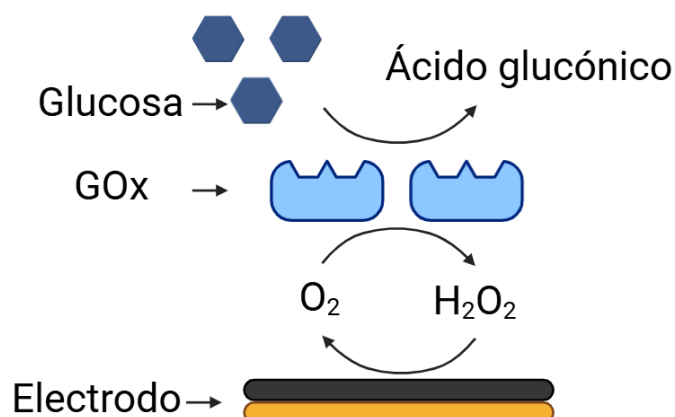


Nota: Elaboración propia.

7.5. Evaluación de aplicación de biosensado

La preparación del sistema de electrodos como biosensor comenzó al realizar la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). en el electrodo de trabajo inducido por láser. Al entrar en contacto con la glucosa, la GOx realiza una reacción de oxidación, catalizando la transferencia de dos electrones de la glucosa al oxígeno molecular para convertirla en ácido glucónico. El oxígeno luego produce peróxido de hidrógeno, el cual permite medir la concentración de glucosa electroquímicamente por el flujo de electrones que produce al ser oxidado en un ánodo catalítico (Figura 10). Dichos electrones, por lo tanto, son proporcionales a la cantidad de glucosa en la solución.

Figura 10: Mecanismo de reacción de la glucosa con la glucosa oxidasa (GOx).



Nota: Elaboración propia.

Para ello, se preparó una solución con 5 mg de GOx diluidos en 0.5 mL de agua destilada. En la región circular del electrodo de grafeno se colocaron 5 μ L de la solución. Seguidamente, dichos electrodos se almacenaron por durante la noche en el refrigerador, a una temperatura de 4 °C.

Los electrodos con GOx fueron caracterizados nuevamente por medio de la voltametría cíclica de la concentración de 2.0 mM de ferricianuro potásico para confirmar la presencia de la enzima en su superficie. La prueba se realizó bajo las mismas condiciones y parámetros aplicados anteriormente para comparar la reacción del ferricianuro potásico antes y después de inmovilizar la enzima.

Los electrodos con GOx fueron utilizados como un biosensor para detección de glucosa. Para ello, se realizó la amperometría de distintas concentraciones de glucosa (0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10 mM). Estas se prepararon con D-(+)-Glucosa (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU.) diluida en 1x de PBS. Para cada electrodo se utilizaron los parámetros aplicados anteriormente (potencial 800 mV durante 80 segundos) y se repitió la prueba por lo menos tres veces por concentración.

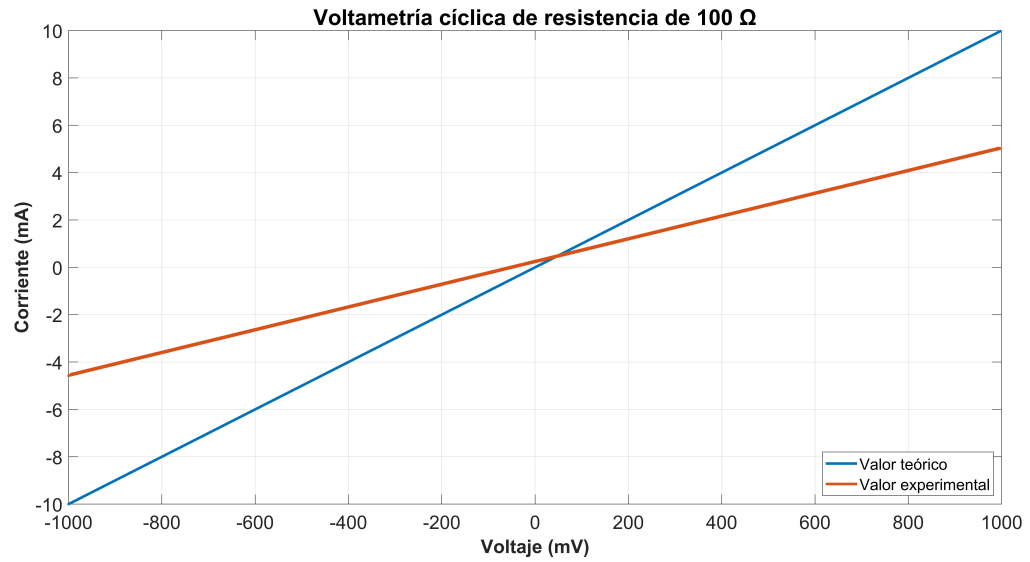
8.1. Validación de la placa EVAL-AD5941ELCZ

Para las primeras pruebas de validación de voltametría cíclica con la placa EVAL-AD5941ELCZ se realizaron mediciones con componentes de distintos valores de resistencia. Para cada prueba se obtuvieron gráficas del voltaje aplicado contra la corriente resultante a partir de ello. Así mismo, para validar dichos valores de corriente, se obtuvo la corriente teórica correspondiente en cada caso. La corriente obtenida a partir de la voltametría cíclica al haber aplicado un barrido de voltaje de -1000 mV a 1000 V a cada resistencia resultó en una gráfica lineal para cada caso (Figuras 11 - 14).

La corriente teórica que atraviesa una resistencia de 100 ohms al aplicarle el barrido de voltaje definido va desde los -10.0 mA hasta los 10.0 mA (Figura 11). Al realizar la voltametría cíclica, la corriente obtenida fue de -4.58 mA a 5.00 mA. Por otra parte, la corriente teórica al utilizar una resistencia de $1k \Omega$, se encuentra entre -1.00 mA a 1.00 mA (Figura 12). Mientras que al obtener el valor experimental de la corriente por medio de la voltametría cíclica, se obtuvieron resultados alrededor de -0.88 mA a 0.94 mA.

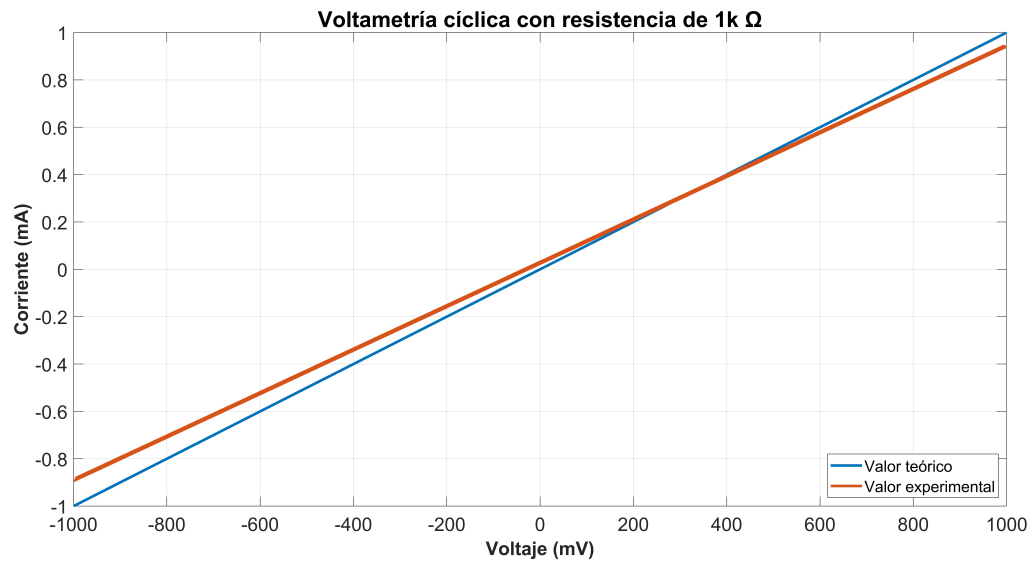
La corriente teórica en la resistencia de $4.7k \Omega$ se encuentra alrededor de $-212 \mu A$ a $212 \mu A$ (Figura 13); experimentalmente se obtuvieron valores desde $-196 \mu A$ hasta $221 \mu A$. Finalmente, con la resistencia de $10k \Omega$, la corriente medida fue alrededor de $-98.4 \mu A$ a $103 \mu A$, mientras que los valores teóricos rondaban desde $-100 \mu A$ a $100 \mu A$ (Figura 14).

Figura 11: Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de $100\ \Omega$.



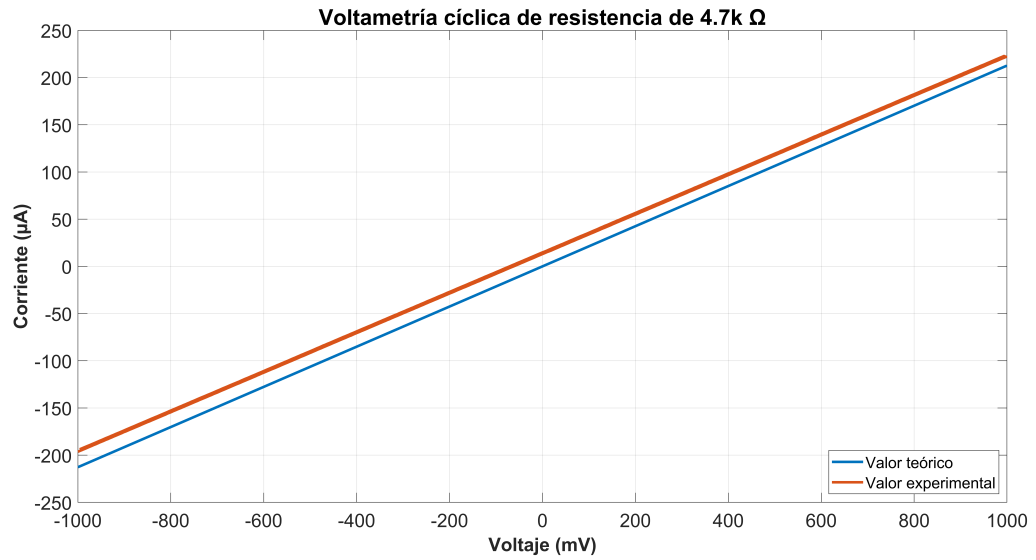
Nota: Elaboración propia.

Figura 12: Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de $1k\ \Omega$.



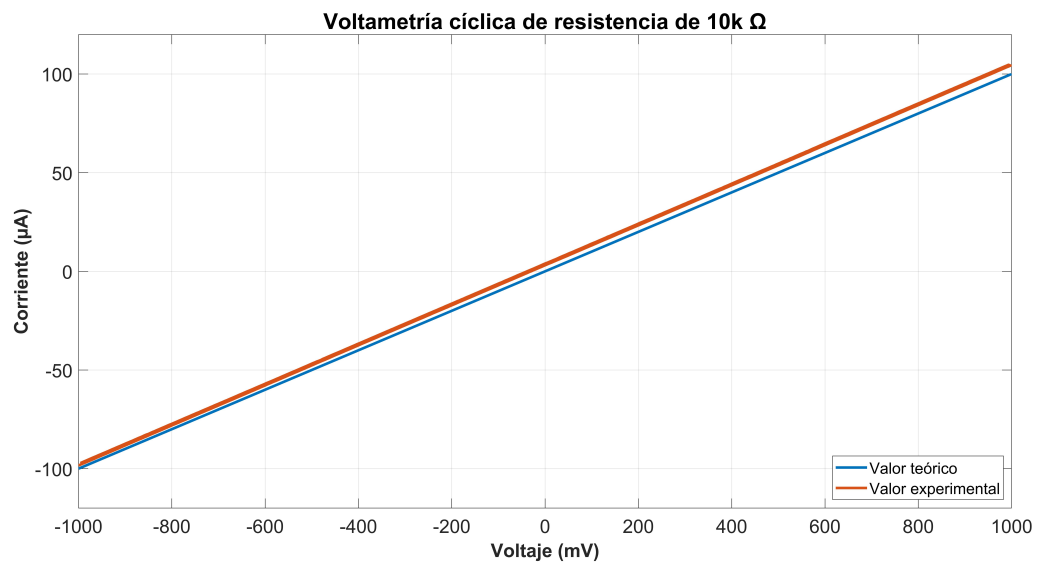
Nota: Elaboración propia.

Figura 13: Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de 4.7k Ω .



Nota: Elaboración propia.

Figura 14: Valores de corriente obtenidos por medio de voltametría cíclica aplicada a una resistencia de 10k Ω .



Nota: Elaboración propia.

A partir de las gráficas realizadas, se obtuvieron los valores de las pendientes de cada corriente experimental, para obtener así mismo los valores experimentales de resistencia para cada caso. Como se observa en el Cuadro 1, las pendientes de las gráficas variaron desde 4.80E-03 para la resistencia de 100 Ω , 9.17E-04 para 1k Ω , 2.09E-01 para 4.7k Ω y 1.02E-04 para 10k Ω respectivamente. Así mismo, se observa que los valores experimentales de resistencia, obtenidos por medio de la inversa de la pendiente, fueron distintos a los valores teóricos. Además, se obtuvo el porcentaje de error al comparar con los valores teóricos.

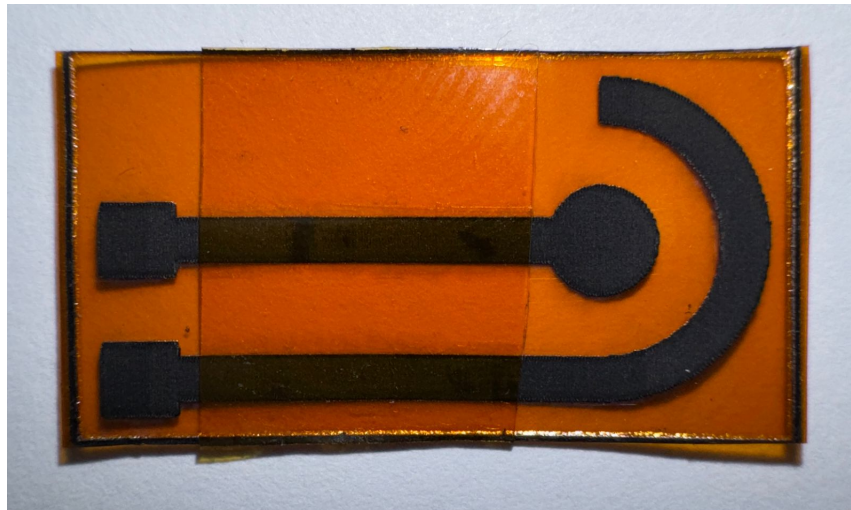
Cuadro 1: Comparación de las pendientes obtenidas en la voltametría cíclica para cada resistencia y los valores experimentales de resistencia

Resistencia teórica (Ω)	Pendiente m	Resistencia experimental (Ω)	Porcentaje de error (%)
100	4.80E-03	208	108
1000	9.17E-04	1090	9.01
4700	2.09E-01	4775	1.60
10000	1.01E-01	9858	1.43

8.2. Diseño y fabricación de los electrodos inducidos por láser

El sistema de electrodos diseñados, el cual cuenta con un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, fueron fabricados por medio de la máquina de corte láser (Figura 15). Así mismo, se observa la capa de *Kapton®* tape en ubicada en los canales para poder aislar y separar la parte activa del electrodo de referencia de la parte donde se realiza la conexión con las pinzas de lagarto.

Figura 15: Electrodo de grafeno inducido por láser.



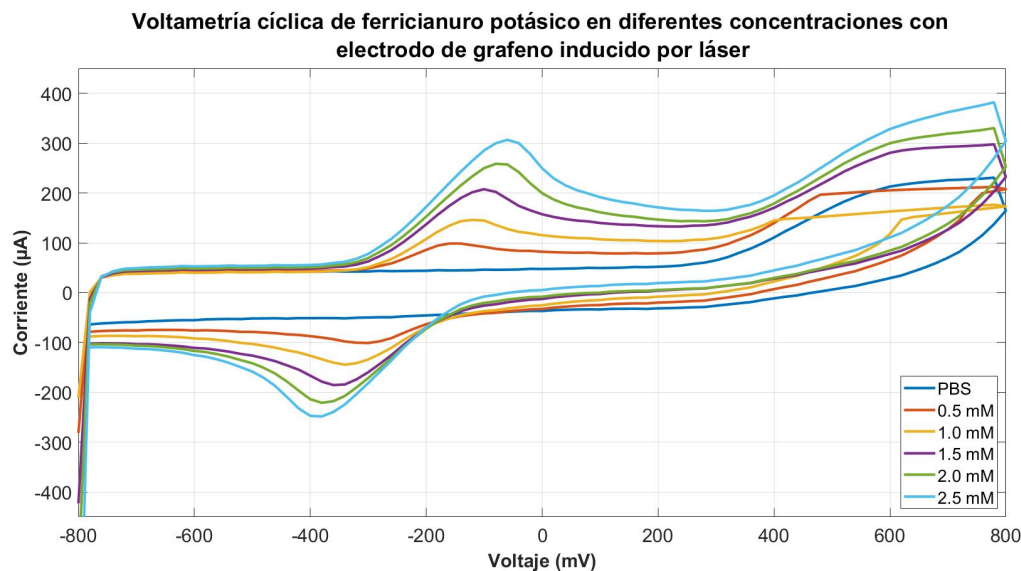
Nota: Elaboración propia.

8.3. Caracterización electroquímica de los electrodos de grafeno inducido por láser

La voltametría cíclica se aplicó utilizando diferentes concentraciones de ferricianuro potásico para poder observar la respuesta electroquímica de los electrodos fabricados, al crear una reacción de oxidación/reducción cuando se aplica un barrido de potencial cíclicamente. A partir de ello, se obtuvieron las curvas de la respuesta de voltametría ciclica de los cuatro electrodos distintos, bajo los mismos parámetros. Por cada electrodo, se realizaron tres mediciones por concentración, promediándose para formar una única gráfica por cada uno. En la figura 16 se muestran las distintas concentraciones medidas con uno de estos electrodos.

A través de estas es posible identificar como, según las concentraciones van aumentando, así aumentan también los picos de las curvas, tanto los picos de oxidación, que se encuentran aproximadamente entre los -200 mV a 0 mV de la potencia aplicada, así como los picos de reducción de la reacción, que ocurren cuando la potencia va desde los -200 mV a -600 mV aproximadamente. Cabe destacar también, que al realizar la prueba con PBS, es posible identificar que la curva de la respuesta de la voltametría en esta solución no forma ningún pico de reacción.

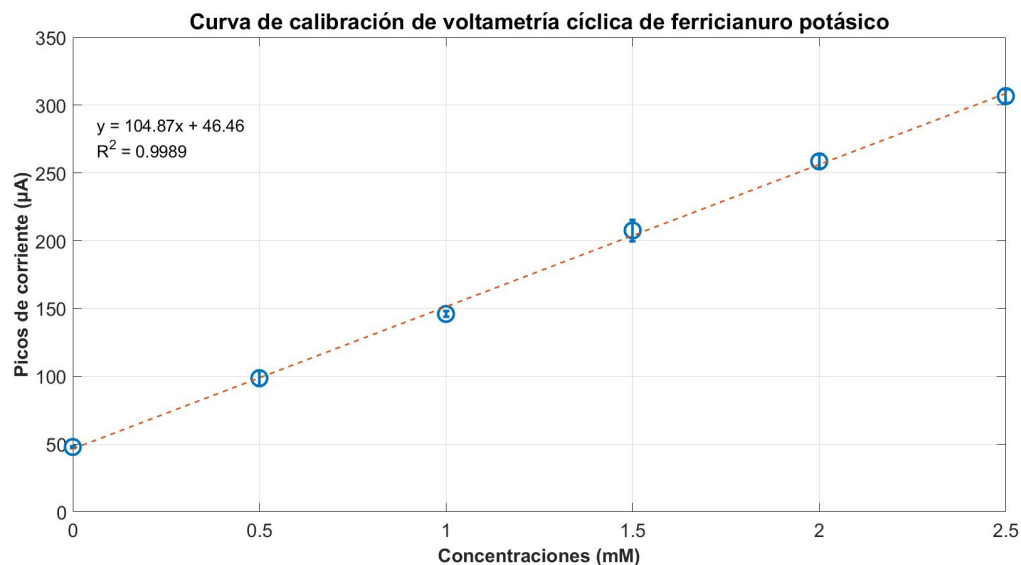
Figura 16: *Curvas de respuesta de voltametría cíclica del electrodo de grafeno inducido por láser por cada concentración de ferricianuro potásico.*



Nota: Elaboración propia.

A partir de las curvas de respuesta de voltametría cíclica, se tomaron los valores máximos de los picos de oxidación de cada concentración, obteniendo la curva de calibración correspondiente a la figura 17. Para cada concentración, los valores máximos fueron 47.87 ± 0.68 , 8.63 ± 5.65 , 146.01 ± 2.27 , 207.60 ± 7.95 , 258.53 ± 5.01 , 306.63 ± 5.08 respectivamente. En esta se observa que la relación entre las concentraciones utilizadas contra los picos de corriente representa una respuesta lineal con un R^2 de 0.99.

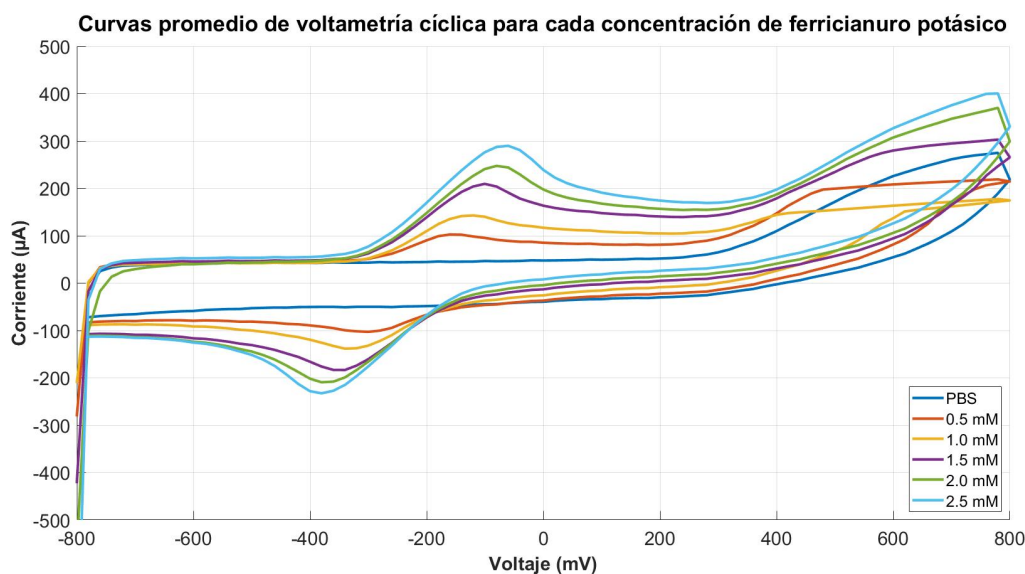
Figura 17: Curva de calibración de los picos de corriente de oxidación de la voltametría cíclica contra las diferentes concentraciones de ferricianuro potásico.



Nota: Elaboración propia. Barras de error representan la desviación estándar.

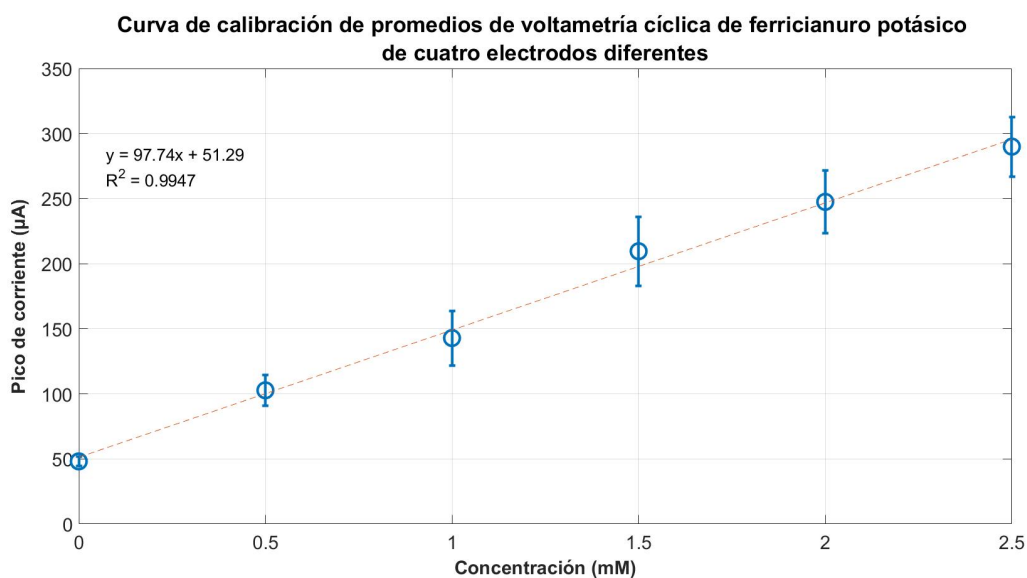
Las respuestas de voltametría cíclica obtenidas por cada uno de los electrodos se promediaron, obteniendo una única gráfica con todos los datos medidos. La Figura 18 representa, por lo tanto, los promedios de las mediciones obtenidas con los cuatro electrodos para cada concentración. Como se observa, los picos de oxidación siguen estando entre los -200 mV y 0 mV. Los valores máximos para los picos de cada una de las concentraciones son $48.11 \mu\text{A} \pm 3.62 \mu\text{A}$, $102.72 \mu\text{A} \pm 11.63 \mu\text{A}$, $142.89 \mu\text{A} \pm 20.98 \mu\text{A}$, $209.58 \mu\text{A} \pm 26.60 \mu\text{A}$, $247.52 \mu\text{A} \pm 24.26 \mu\text{A}$, $289.96 \mu\text{A} \pm 22.89 \mu\text{A}$ respectivamente. Al obtener la relación entre concentración y corriente de estos datos se identificó una respuesta lineal, con un valor de R^2 de 0.99 (Figura 19).

Figura 18: Promedio de las curvas de respuesta de voltametría cíclica de las concentraciones de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 mM de ferricianuro potásico, obtenidas de las mediciones de cuatro diferentes electrodos.



Nota: Elaboración propia.

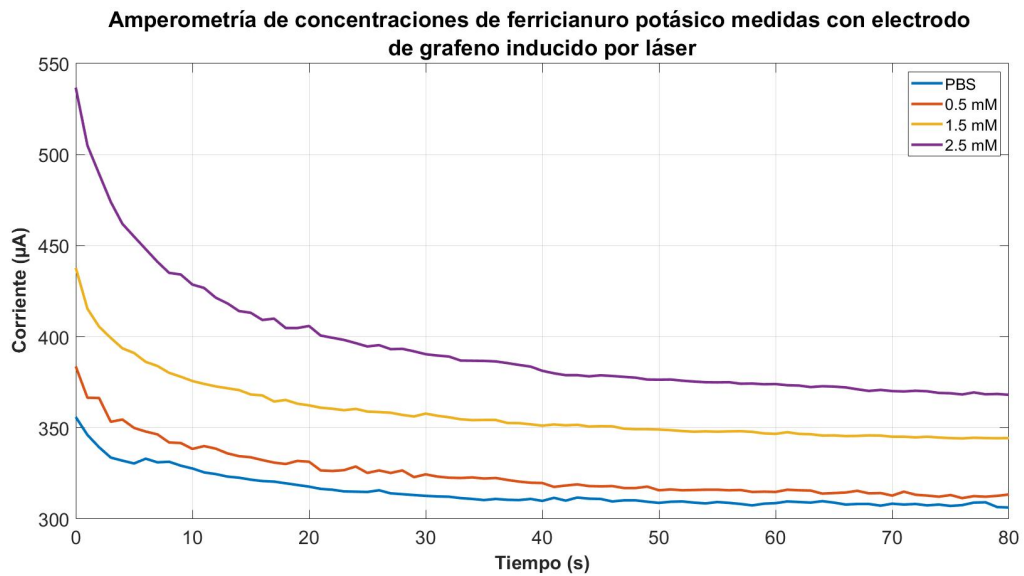
Figura 19: Curva de calibración de los promedios de las respuestas de voltametría cíclica de los cuatro electrodos distintos, midiendo las distintas concentraciones de ferricianuro potásico.



Nota: Elaboración propia. Los valores muestran el promedio de tres mediciones individuales y, las barras de error, la desviación estándar.

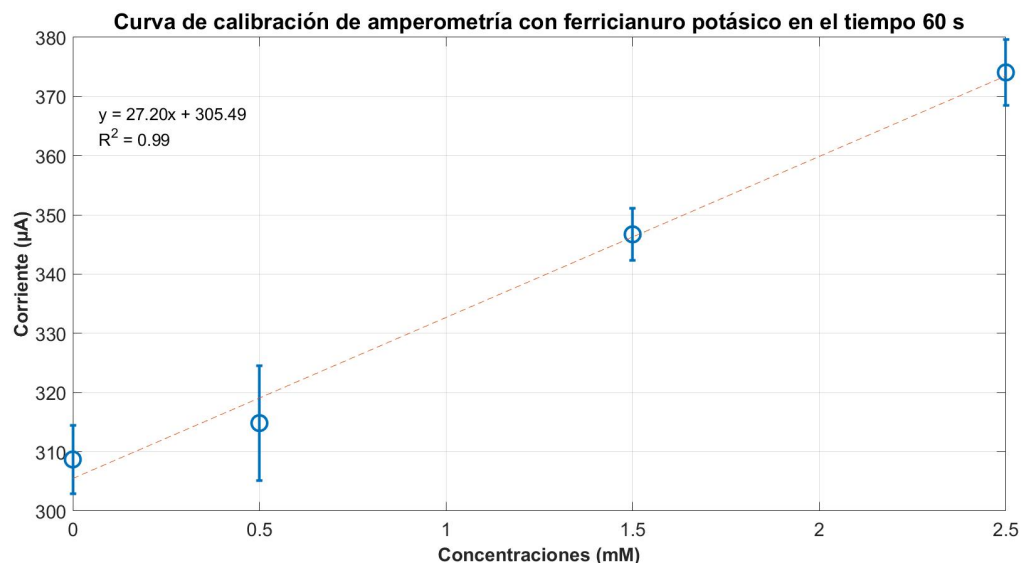
Con uno de los electrodos probados, se realizaron pruebas de amperometría con las concentraciones de 0, 0.5, 1.5 y 2.5 mM de ferricianuro potásico. Las curvas obtenidas representan el promedio de cinco corridas por cada concentración. Los valores de las curvas para cada una de las concentraciones aumentaron en relación a las concentraciones utilizadas (Figura 20). Para cada una, se tomó el valor de corriente a los 60 segundos: $308.70 \mu\text{A} \pm 5.80 \mu\text{A}$, $314.85 \mu\text{A} \pm 9.73 \mu\text{A}$, $346.72 \mu\text{A} \pm 4.38 \mu\text{A}$ y $374.06 \mu\text{A} \pm 5.52 \mu\text{A}$, respectivamente. Al realizar la relación concentración vs. corriente de estos datos se obtuvo una regresión lineal con un R^2 de 0.99 (Figura 21).

Figura 20: Amperometría de las concentraciones de ferricianuro potásico medidas con uno de los electrodos de grafeno inducido por láser.



Nota: Elaboración propia.

Figura 21: Curva de calibración de los puntos medidos a los 60 segundos de la amperometría de las distintas concentraciones de ferricianuro potásico, medidas con uno de los electrodos.

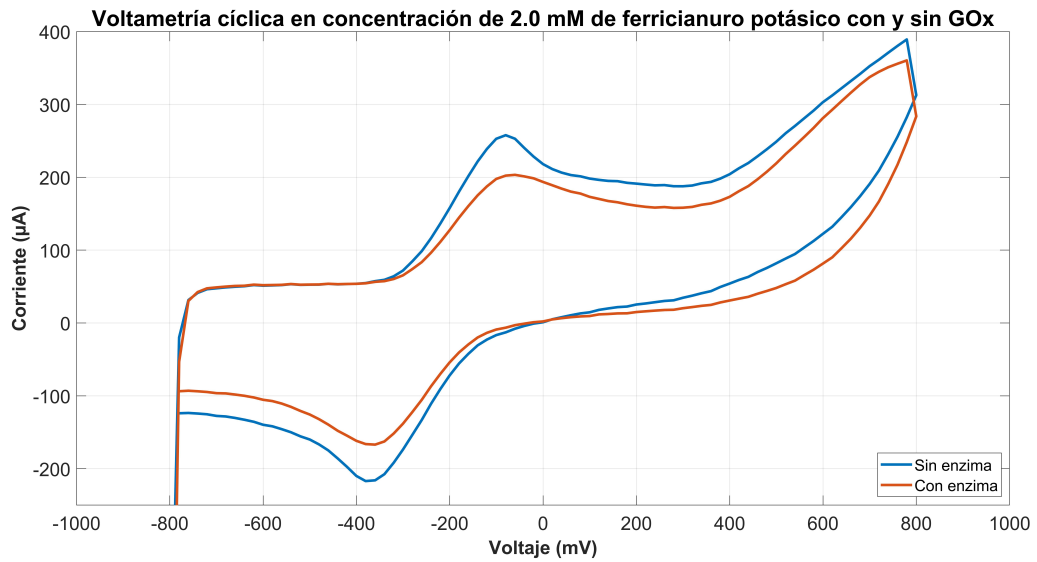


Nota: Elaboración propia. Barras de error representan la desviación estándar.

8.4. Evaluación de aplicación de biosensado

Para evaluar que los electrodos pudieran ser utilizados como un biosensor, se inmovilizaron 5 μL de la solución preparada de GOx en la superficie del electrodo de trabajo. Al tener la enzima, los electrodos se caracterizaron nuevamente por medio de la voltametría cíclica del ferricianuro potásico para poder observar el comportamiento de estos al contener GOx su superficie. Para ello, se obtuvo la gráfica de la respuesta de la voltametría cíclica en una concentración de 2.0 mM, tanto sin enzima como con enzima. El pico de oxidación en el electrodo con enzima es menor al que se obtiene al realizar la prueba sin ninguna enzima presente (Figura 22). El valor máximo del pico al realizar la prueba sin enzima es de 258 μA , mientras que al haber GOx presente, es de 203 μA .

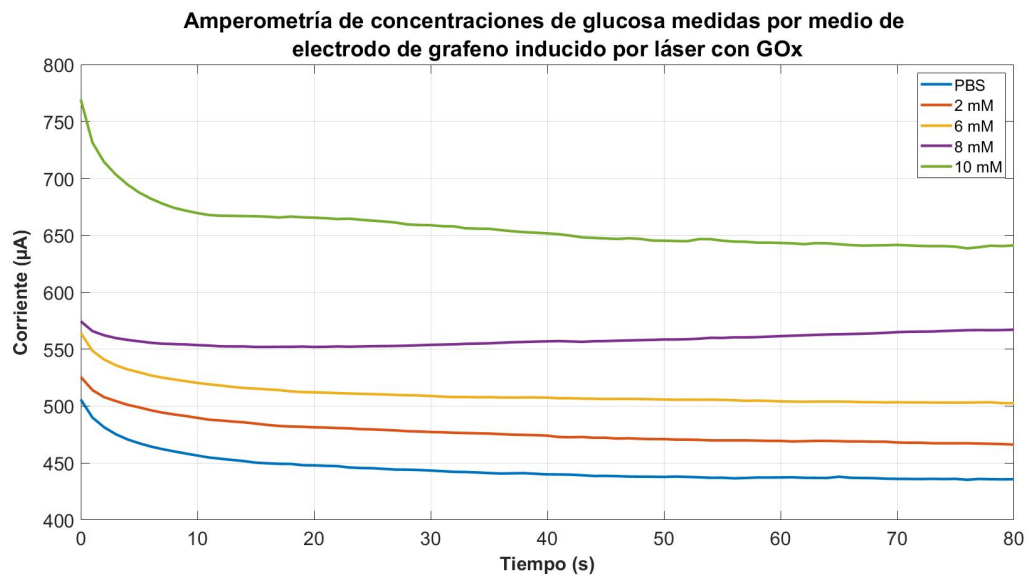
Figura 22: Curvas de respuesta de voltametría cíclica de concentración de 2.0 mM de ferricianuro potásico, realizadas con electrodo antes y después de haber inmovilizado GOx en la superficie del electrodo de trabajo.



Nota: Elaboración propia.

Al haber comprobado la presencia de la enzima sobre el electrodo de trabajo, se procedió a realizar pruebas de amperometría de las concentraciones 0, 2, 6, 8, y 10 mM de glucosa. Las curvas observadas en la figura 23 representan el promedio de cinco mediciones por concentración con uno de los electrodos. Es posible identificar que las curvas con valores de corriente más bajos representan los valores de concentración más bajos. Mientras que, al aumentar la concentración de glucosa, las curvas tienen corrientes más altas.

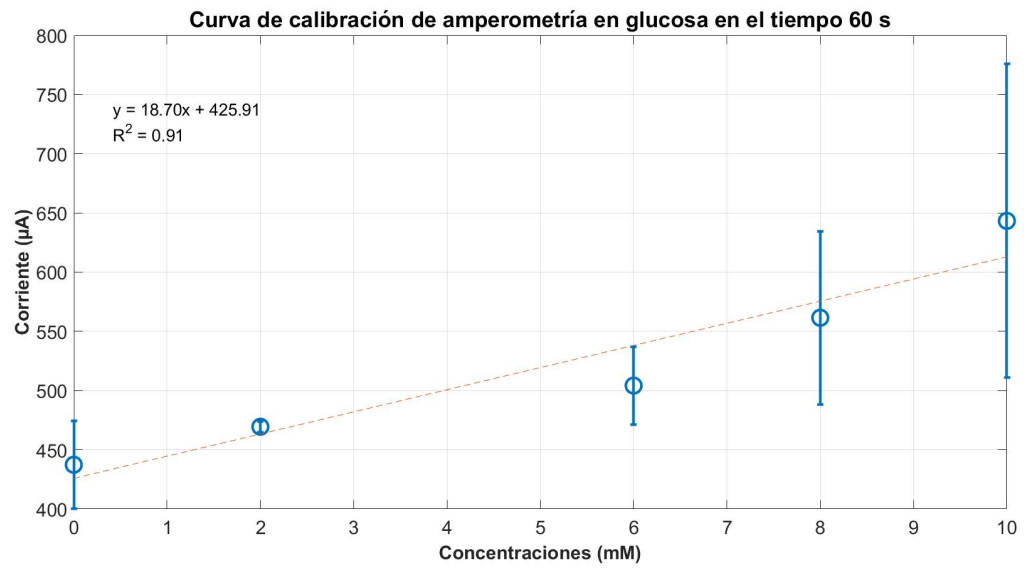
Figura 23: Amperometría de las diferentes concentraciones de glucosa medidas con uno de los electrodos de grafeno inducido por láser con GOx inmovilizada en la superficie de su electrodo de trabajo.



Nota: Elaboración propia.

A partir de las curvas de amperometría, se tomaron los valores de corriente en 60 segundos para cada una. Estos valores fueron $437.37 \mu\text{A} \pm 36.99 \mu\text{A}$, $469.45 \mu\text{A} \pm 4.56 \mu\text{A}$, $504.19 \mu\text{A} \pm 32.67 \mu\text{A}$, $561.49 \mu\text{A} \pm 73.05 \mu\text{A}$, $643.26 \mu\text{A} \pm 132.47 \mu\text{A}$. Al obtener la relación entre concentraciones y corriente de estos valores, se identifica que la regresión lineal de estos datos tuvo un R^2 de 0.91 (Figura 24).

Figura 24: Curva de calibración de puntos medidos a los 60 segundos de la amperometría de las distintas concentraciones de glucosa.



Nota: Elaboración propia. Barras de error representan la desviación estándar.

La investigación se basó en el diseño y desarrollo de un sistema de electrodos de grafeno inducido por láser para ser utilizado como un biosensor, lo cual se llevó a cabo exitosamente por medio de distintas fases. Se realizaron pruebas de voltametría cíclica con la placa EVAL-AD5941ELCZ, aplicadas a componentes electrónicos para validar el funcionamiento de esta, para luego utilizar los electrodos de grafeno inducidos por láser para su caracterización electroquímica. Para ello, el sistema de electrodos se sometió a soluciones con distintas concentraciones de ferricianuro potásico. Luego, se inmovilizó la enzima de glucosa oxidasa para poder ser utilizados como un biosensor, procedimiento que se validó nuevamente por medio de la voltametría cíclica. Al confirmar la presencia de la enzima, se efectuaron pruebas de amperometría en diferentes concentraciones de glucosa para poder identificar, electroquímicamente, la relación entre los datos de corriente obtenidos contra dichas concentraciones.

La placa EVAL-AD5941ELCZ se puso a prueba realizando mediciones de voltametría cíclica con resistencias de distintos valores. Al observar las figuras 11 a 14, junto con los datos del Cuadro 1, es posible identificar que los valores de las corrientes van en disminución conforme el valor resistivo sea mayor. Esto se debe a que, mientras el valor de estos componentes crezca, se produce más resistencia que deja fluir menos corriente a través de ellos. Es decir que la corriente es inversamente proporcional a la resistencia. Dicho comportamiento a su vez indica que la corriente es directamente proporcional al voltaje, como lo indica la ley de Ohm. Así mismo fue posible observar que el porcentaje de error fue en disminución en función del aumento de los valores de resistencia.

Al observar los datos de la prueba con la resistencia de 100Ω , con un porcentaje de error mayor al 100 %, se pudo identificar que la resistencia interna de la placa, la cual es de 100Ω , se suma con la resistencia medida debido a que ambos valores son muy bajos. Por lo tanto, la medición obtenida fue el doble a lo esperado. Así mismo, al medir los valores más altos de resistencia, el porcentaje de error fue en disminución, siendo cada vez más cercano a los valores teóricos. Esto se debe a que la resistencia interna actúa en serie con la externa, por lo que los valores de ambas se suman. Por lo que mientras más alto sea el valor de la resistencia medida, la resistencia interna será menos significativa en los resultados [58]. Por lo tanto, los valores bajos de porcentaje de error indican que la placa es capaz de mostrar resultados casi exactos a la realidad mientras la resistencia del elemento que se esté midiendo sea lo suficientemente alta.

Al haber validado el funcionamiento de la placa, se procedió a realizar el diseño y fabricación de los electrodos de grafeno inducido por láser. Para poder utilizarlos luego, se les colocó una capa de *Kapton® tape* en los canales para poder aislar esta parte de los electrodos. Esto permitió que la región activa del electrodo, donde tendrá contacto con las soluciones y el elemento de bioconocimiento, y los extremos en donde se conectan los cables de la placa estén separados. Así mismo, permitió que la solución en la que el electrodo fuese sumergido no entrara en contacto con la región que se conecta a la placa, ya que esto interferiría con la toma de datos.

Dentro del sistema de electrodos se decidió utilizar una pieza de acero inoxidable como contraelectrodo, así como un electrodo de referencia externo, debido a una serie de características con los que estos deben de cumplir idealmente para las pruebas electroquímicas. Además que, al realizar pruebas de voltametría cíclica con el contraelectrodo impreso, las gráficas obtenidas fueron poco estables, ya que las curvas de algunas concentraciones se desplazaban verticalmente, ya que no mostraban claramente la relación proporcional de las distintas concentraciones de ferricianuro potásico y la corriente de sus reacciones, comportándose de manera distinta en cada medición.

Para la selección del material del contraelectrodo se tomó en cuenta que el área de superficie del contraelectrodo debe ser significativamente más grande que la región activa del electrodo de trabajo. También, el material del contraelectrodo debe ser tanto química como electroquímicamente estable, así como con alta actividad catalítica [59]. Por lo tanto, el acero inoxidable es un material que tiene características electrocatalíticas estables, tanto en soluciones neutras como alcalinas [60]. Además de que tiene alta resistencia a la corrosión, lo cual es importante al estar constantemente sometido a líquidos. A su vez, el área de la pieza, la cual es mucho mayor a la del electrodo de trabajo, ayudó a estabilizar las reacciones ya que al tener una mayor área de superficie que el electrodo de trabajo, aumenta la corriente en el contraelectrodo. Por lo que, al ser el encargado de unir y cerrar el circuito entre los electrodos, la señal se estabiliza. Al contrario, si el área del electrodo de trabajo es mayor, el

potencial en el contraelectrodo se vuelve más negativo, distorsionando las mediciones [59]. Sí bien el contraelectrodo diseñado y fabricado de grafeno cumple con las características del material, es posible que su área no haya sido lo suficientemente grande y a su vez, el acero inoxidable sirvió como base de prueba al ser un material más controlado.

Los electrodos fabricados se sometieron a pruebas de voltametría cíclica con ferricianuro potásico para poder analizar su comportamiento electroquímico, debido a que es un sistema redox electroquímicamente reversible bien conocido. Al realizar estas pruebas en las distintas concentraciones, el R^2 mayor a 0.99 indicó una relación lineal excelente entre las concentraciones y las corrientes medidas. Además, al haber realizado el promedio de las mediciones de los cuatro electrodos independientes, obteniendo también un R^2 mayor a 0.99 con valores de desviación estándar bajos es posible decir que los resultados fueron reproducibles exitosamente. La curva de calibración de las mediciones de amperometría también indica que los electrodos cumplieron con su funcionamiento de identificación de distintas concentraciones, ya que al aumentar dicho factor, la corriente obtenida también incrementó.

Al haber evaluado el comportamiento electroquímico de los electrodos, se aplicó la enzima de GOx en el electrodo de trabajo y se realizó nuevamente la voltametría cíclica de ferricianuro potásico para confirmar la presencia de dicho elemento en el electrodo. Esto permitió comparar el comportamiento de la gráfica antes y después de haber inmovilizado la enzima (Figura 22). La voltametría cíclica resultó tener un pico de oxidación menor luego de haber aplicado la enzima en la superficie, con valor de $203 \mu\text{A}$. Lo cual es comparado con el valor de $258 \mu\text{A}$ de la voltametría del ferricianuro potásico con el electrodo que no contenía ninguna enzima. Esto se debe a que la presencia de la GOx inhibió la cinética de transferencia de electrones de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Este resultado confirma la presencia de la enzima, indicando que fue posible inmovilizarla sobre la superficie del electrodo, por lo que puede ser utilizado como un biosensor para la medición de glucosa. Sin embargo, esto no asegura que la enzima seguirá adherida luego de lavar el electrodo o que el sitio activo de esta esté disponible para la adherencia de los sustratos.

La evaluación y aplicación del biosensor se llevó a cabo por medio de las distintas mediciones de amperometría de concentraciones de glucosa establecidas. La relación entre dichas concentraciones demostró una linealidad con R^2 de 0.91. A pesar de ser un valor bastante alto, fue posible identificar que se tuvo valores elevados de desviación estándar resultantes de las numerosas pruebas realizadas con el electrodo. Así mismo, se observó que en la concentración de 8 mM de glucosa, la curva comenzó a presentar una leve elevación de su corriente en cierto punto. Esto puede deberse a que la enzima inmovilizada no es lo suficientemente estable para llevar a cabo la reacción con la glucosa por mucho tiempo, pudiendo ser algunas de las causas que se haya lavado en algún punto o que hayan tenido una orientación aleatoria que no permitiera que los sitios activos para la glucosa se encontraran fácilmente accesibles.

La inmovilización de la enzima se llevó a cabo por medio de la adsorción de esta sobre la superficie, la cual es una unión no covalente. Este tipo de uniones se asocia con inestabilidad a largo plazo debido a desintegración o fuga [61], lo cual puede indicar la razón de la inestabilidad en este caso. Para mejorar este factor, debería de usarse un método de unión covalente u orientado, ya que crea enlaces moleculares y mejoran la estabilidad del sistema [61]. Estos métodos pueden incluir el acoplamiento EDC/NHS o modificación de la superficie con polímeros como el quitosano o hidrogeles [61], [56].

Debido a la estructura del sistema de electrodos desarrollado, se tiene la limitación de no poder ser aplicado en el ámbito clínico tan fácil. No es una configuración portátil y debido a sus dimensiones y a que los electrodos no se encuentran tan cercanos entre sí, se necesita de grandes volúmenes de solución para poder realizar las mediciones. Así mismo, para aplicar las técnicas electroquímicas utilizadas se necesita de equipo especial y parámetros controlados, por ejemplo de voltaje y escalón de potencial. Sin embargo, sigue siendo un sistema funcional, el cual logró cumplir con los objetivos establecidos.

Por medio de este proyecto, se implementó un sistema de tres electrodos basado en grafeno inducido por láser como un biosensor por medio de pruebas electroquímicas. El electrodo de trabajo se fabricó del grafeno inducido por láser y se acompañó con un contraelectrodo de acero inoxidable y un electrodo de referencia de Ag/AgCL. El sistema completo logró ponerse a prueba exitosamente por medio de la voltametría cíclica y la amperometría.

La placa EVAL-AD5941ELCZ utilizada para pruebas electroquímicas fue validada mediante voltametría cíclica. Por medio de estas, se compararon los resultados experimentales con los valores de resistencia teóricos con el fin de validar los resultados que la placa es capaz de obtener. Se identificó que, mientras mayor sea el valor de resistencia medido, el porcentaje de error es menor. Esto debido a que el valor de la resistencia interna de la placa se vuelve menos significativo a medida que los datos medidos sean más diferentes. Por medio de estos resultados, se identificó que la placa es capaz de mostrar resultados acertados a la realidad, incluso más cuando la resistencia de los elementos es alta.

Se diseñó un electrodo que fue fabricado por medio de grabado láser para que, de esta manera, estuviesen formados de grafeno inducido por láser. A su vez, fue posible utilizar dichos electrodos y comprobar su funcionamiento por medio de la volumetría cíclica de distintas concentraciones de ferricianuro potásico para observar su comportamiento electroquímico. Por medio de estas fue posible identificar una relación lineal entre las concentraciones y la corriente máxima de los picos de oxidación de las curvas de la respuesta de la voltametría cíclica. Asimismo, se evidenció, por medio de la amperometría de dichas concentraciones, una relación lineal entre estas y la corriente a un tiempo específico. Esto demuestra que los electrodos fueron capaces de medir exitosamente distintas concentraciones del compuesto.

Luego de su caracterización electroquímica, se realizó la inmovilización de glucosa oxidasa en la superficie del electrodo de trabajo con el fin de ser utilizado como un biosensor para la medición de glucosa. Por medio de pruebas de amperometría de distintas concentraciones de glucosa, se logró obtener una relación directamente proporcional entre las concentraciones y la corriente medida luego de 60 segundos. Esto quiere decir que se logró hacer una diferenciación concisa entre las distintas concentraciones, siendo el electrodo capaz de realizar las mediciones propuestas y cumpliendo con su objetivo de ser aplicado como un biosensor.

Recomendaciones

Para futuros trabajos, se recomienda optimizar el diseño de los electrodos por medio de un sistema que permita que los tres sean creados completamente con grafeno inducido por láser. Para ello, el electrodo de referencia debería modificarse con una capa de plata para que pueda cumplir con su función específica y el contraelectrodo debe tener una región mayor a la del electrodo de trabajo. Esto debido a que al tener la función de cerrar el circuito y permitir el paso de la corriente entre los otros dos electrodos, un área mayor le permite optimizar el flujo de la corriente y, por lo tanto, estabilizar las señales medidas.

Se recomienda el diseño y fabricación de distintas variantes de los electrodos. Esto permitiría identificar si el área de la región activa del electrodo de trabajo es un factor determinante para mejorar los resultados en las mediciones. Asimismo, variar el área del contraelectrodo, como se mencionó, para identificar una relación entre ambos que funcione de mejor manera. Al realizar las pruebas electroquímicas, se recomienda variar los distintos parámetros (potencial, escalón de potencial y tasa de escaneo) para identificar los cambios que pueden ocurrir en las mediciones.

Para optimizar el funcionamiento de los electrodos en la aplicación de biosensado, se recomienda aplicar una técnica de unión diferente a la adsorción. Las técnicas que implican enlaces covalentes hacen que el elemento de bioreconocimiento se establezca en la superficie por medio de enlaces químicos. Además, otras técnicas, como la basada en orientación, ayudan a que los sitios activos de la enzima puedan detectar correctamente el analito específico. Esto sería de ayuda para que la GOx pueda establecerse por más tiempo en la superficie y optimizar las mediciones para resultados más reproducibles.

Con respecto a las mediciones de glucosa, se recomienda la selección de concentraciones con valores que se aproximen más entre sí para poder asegurar que es posible diferenciarlos a pesar de ser tan parecidos y tener más puntos de datos. Esto con el fin de dirigirlo a situaciones más apegadas a la realidad.

-
-
- [1] A. D. Association, “Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,” *Diabetes Care*, vol. 36, S67-S74, Supplement_1 ene. de 2013, ISSN: 0149-5992. DOI: 10.2337/DC13-S067. <https://dx.doi.org/10.2337/dc13-S067>.
 - [2] S. J. Healy y K. M. Dungan, *Monitoring glycemia in diabetes*, ene. de 2015. DOI: 10.1016/j.mcna.2014.08.017.
 - [3] S. I. Raza et al., “100 Years of Glucose Monitoring in Diabetes Management,” *Journal of Diabetes Mellitus*, vol. 11, n.º 5, págs. 221-233, nov. de 2021, ISSN: 2160-5831. DOI: 10.4236/JDM.2021.115019. <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=113170>.
 - [4] N. Reddy, N. Verma y K. Dungan, “Monitoring Technologies- Continuous Glucose Monitoring, Mobile Technology, Biomarkers of Glycemic Control,” *Endotext*, jul. de 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279046/>.
 - [5] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano y P. Estrela, “Introduction to biosensors,” *Essays in Biochemistry*, vol. 60, n.º 1, pág. 1, jun. de 2016, ISSN: 00711365. DOI: 10.1042/EBC20150001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986445/>.
 - [6] E. H. Yoo y S. Y. Lee, “Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice,” *Sensors*, vol. 10, n.º 5, pág. 4558, mayo de 2010, ISSN: 14248220. DOI: 10.3390/S100504558. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3292132/>.
 - [7] D. C. Klonoff, D. Ahn y A. Drincic, *Continuous glucose monitoring: A review of the technology and clinical use*, nov. de 2017. DOI: 10.1016/j.diabres.2017.08.005.

- [8] P. Z. Zimmet, “Diabetes and its drivers: The largest epidemic in human history?” *Clinical Diabetes and Endocrinology*, vol. 3, n.º 1, págs. 1-8, ene. de 2017, ISSN: 20558260. DOI: 10.1186/s40842-016-0039-3. <https://doi.org/10.1186/s40842-016-0039-3>.
- [9] K. L. Ong et al., “Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021,” *The Lancet*, vol. 402, n.º 10397, págs. 203-234, jul. de 2023, ISSN: 1474547X. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)01301-6. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(23\)01301-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(23)01301-6/fulltext).
- [10] I. D. Federation, “IDF Diabetes Atlas 10th edition,” 2021. 2 de abr. de 2024. www.diabetesatlas.org.
- [11] T. K. Mathew, M. Zubair y P. Tadi, “Blood Glucose Monitoring,” *Medical Devices and Systems*, págs. 66–1–66-10, abr. de 2023, ISSN: 2325-1603. DOI: 10.5005/jp/books/12651_10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555976/>.
- [12] 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 2018 16:1*, vol. 16, n.º 1, págs. 1-17, sep. de 2018, ISSN: 1477-3155. DOI: 10.1186/S12951-018-0400-Z. <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0400-z>.
- [13] A. Gulino, Z. V. Zivcova, J. Sengupta y C. M. Hussain, “Graphene-Based Electrochemical Nano-Biosensors for Detection of SARS-CoV-2,” *Inorganics 2023, Vol. 11, Page 197*, vol. 11, n.º 5, pág. 197, mayo de 2023, ISSN: 2304-6740. DOI: 10.3390/INORGANICS11050197. <https://www.mdpi.com/2304-6740/11/5/197/htm>.
- [14] V. Naresh y N. Lee, “A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors,” *Sensors 2021, Vol. 21, Page 1109*, vol. 21, n.º 4, pág. 1109, feb. de 2021, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/S21041109. <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/4/1109/htm>.
- [15] A. T. Kharroubi y H. M. Darwish, “Diabetes mellitus: The epidemic of the century,” *World Journal of Diabetes*, vol. 6, n.º 6, págs. 850-867, 25 de jun. de 2015, ISSN: 1948-9358. DOI: 10.4239/wjd.v6.i6.850. 18 de jul. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478580/>.
- [16] “Diabetes,” 25 de jul. de 2024. <https://web.p.ebscohost.com/ehost/ebookviewer/ebook/ZTAwMHh3d19fMTgwOTEwNV9fQU41?sid=4e947511-d9a6-48da-8c90-00ba5057430e@redis&vid=1&format=EB&rid=2>.
- [17] N. Mohamad Nor, N. S. Ridhuan y K. Abdul Razak, “Progress of enzymatic and non-enzymatic electrochemical glucose biosensor based on nanomaterial-modified electrode,” *Biosensors*, vol. 12, n.º 12, pág. 1136, dic. de 2022, Number: 12 Publisher: Multi-

- disciplinary Digital Publishing Institute, ISSN: 2079-6374. DOI: 10.3390/bios12121136. 8 de ago. de 2024. <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/12/1136>.
- [18] “Mean fasting blood glucose,” World Health Organization, 20 de jul. de 2024. [https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/2380](https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/indicator-metadata-registry/imr-details/2380).
- [19] L. A. DiMeglio, C. Evans-Molina y R. A. Oram, “Type 1 diabetes,” *The Lancet*, vol. 391, n.º 10138, págs. 2449-2462, jun. de 2018, ISSN: 01406736. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5. 25 de jul. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618313205>.
- [20] N. Jouvét y J. L. Estall, “The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis,” *Experimental Cell Research*, vol. 360, n.º 1, págs. 19-23, nov. de 2017, ISSN: 00144827. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.03.050. 31 de jul. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482717301805>.
- [21] S. Husain y E. Thrower, “Molecular and cellular regulation of pancreatic acinar cell function,” *Current opinion in gastroenterology*, vol. 25, n.º 5, págs. 466-471, sep. de 2009, ISSN: 0267-1379. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32832ebfac. 1 de ago. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3030806/>.
- [22] A. Ojha, U. Ojha, R. Mohammed, A. Chandrashekar y H. Ojha, “Current perspective on the role of insulin and glucagon in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus,” *Clinical Pharmacology : Advances and Applications*, vol. 11, págs. 57-65, 9 de mayo de 2019, ISSN: 1179-1438. DOI: 10.2147/CPAA.S202614. 2 de ago. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6515536/>.
- [23] G. Wilcox, “Insulin and Insulin Resistance,” *Clinical Biochemist Reviews*, vol. 26, n.º 2, págs. 19-39, mayo de 2005, ISSN: 0159-8090. 2 de ago. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/>.
- [24] A. Arora et al., “Free fatty acid receptor 1: a ray of hope in the therapy of type 2 diabetes mellitus,” *Inflammopharmacology*, vol. 29, págs. 1-15, 20 de oct. de 2021. DOI: 10.1007/s10787-021-00879-8.
- [25] M. J. Redondo et al., “The clinical consequences of heterogeneity within and between different diabetes types,” *Diabetologia*, vol. 63, n.º 10, págs. 2040-2048, 1 de oct. de 2020, ISSN: 1432-0428. DOI: 10.1007/s00125-020-05211-7. 25 de jul. de 2024. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05211-7>.
- [26] S. A. Antar et al., “Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments,” *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, vol. 168, pág. 115 734, 1 de dic. de 2023, ISSN: 0753-3322. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115734. 29 de jul. de 2024. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223015329>.

- [27] “Symptoms & causes of diabetes - NIDDK,” National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 3 de ago. de 2024. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/symptoms-causes>.
- [28] M. C. Petersen y G. I. Shulman, “Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance,” *Physiological Reviews*, vol. 98, n.º 4, págs. 2133-2223, oct. de 2018, Publisher: American Physiological Society, ISSN: 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00063.2017. 3 de ago. de 2024. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00063.2017>.
- [29] “Insulin resistance & prediabetes - NIDDK,” National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 3 de ago. de 2024. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes/prediabetes-insulin-resistance>.
- [30] S. Alam, M. K. Hasan, S. Neaz, N. Hussain, M. F. Hossain y T. Rahman, “Diabetes Mellitus: Insights from Epidemiology, Biochemistry, Risk Factors, Diagnosis, Complications and Comprehensive Management,” *Diabetology*, vol. 2, n.º 2, págs. 36-50, jun. de 2021, Number: 2 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, ISSN: 2673-4540. DOI: 10.3390/diabetology2020004. 19 de jul. de 2024. <https://www.mdpi.com/2673-4540/2/2/4>.
- [31] M. J. Davies et al., “Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD),” *Diabetes Care*, vol. 41, n.º 12, págs. 2669-2701, dic. de 2018, ISSN: 0149-5992. DOI: 10.2337/dci18-0033. 20 de jul. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6245208/>.
- [32] S. Chatterjee, K. Khunti y M. J. Davies, “Type 2 diabetes,” *The Lancet*, vol. 389, n.º 10085, págs. 2239-2251, jun. de 2017, ISSN: 01406736. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30058-2. 25 de jul. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617300582>.
- [33] “Managing diabetes - NIDDK,” National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 18 de nov. de 2024. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/managing-diabetes>.
- [34] IUPAC. “IUPAC - biosensor (B00663),” 25 de jul. de 2024. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/B00663>.
- [35] H. C. Stepman et al., “Measurements for 8 Common Analytes in Native Sera Identify Inadequate Standardization among 6 Routine Laboratory Assays,” *Clinical chemistry*, vol. 60, n.º 6, págs. 855-863, jun. de 2014, ISSN: 0009-9147. DOI: 10.1373/clinchem.2013.220376. 2 de ago. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5699466/>.

- [36] O. Parlak, V. F. Curto, E. Ojeda, L. Basabe-Desmonts, F. Benito-Lopez y A. Salleo, "Wearable biosensors and sample handling strategies," en *Wearable Bioelectronics*, Elsevier, 2020, ISBN: 978-0-08-102407-2. DOI: 10.1016/B978-0-08-102407-2.00004-7. 2 de ago. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081024072000047>.
- [37] M. A. Morales y J. M. Halpern, "Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors," *Bioconjugate chemistry*, vol. 29, n.º 10, págs. 3231-3239, 17 de oct. de 2018, ISSN: 1043-1802. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00592. 2 de ago. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6416154/>.
- [38] E. O. Polat et al., "Transducer technologies for biosensors and their wearable applications," *Biosensors*, vol. 12, n.º 6, pág. 385, jun. de 2022, Number: 6 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, ISSN: 2079-6374. DOI: 10.3390/bios12060385. 2 de ago. de 2024. <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/6/385>.
- [39] W. J. Peveler, M. Yazdani y V. M. Rotello, "Selectivity and Specificity: Pros and Cons in Sensing," *ACS Sensors*, vol. 1, n.º 11, págs. 1282-1285, 23 de nov. de 2016, Publisher: American Chemical Society. DOI: 10.1021/acssensors.6b00564. 2 de ago. de 2024. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00564>.
- [40] S. A. Pullano, M. Greco, M. G. Bianco, D. Foti, A. Brunetti y A. S. Fiorillo, "Glucose biosensors in clinical practice: principles, limits and perspectives of currently used devices," *Theranostics*, vol. 12, n.º 2, págs. 493-511, 2022, ISSN: 1838-7640. DOI: 10.7150/THNO.64035. <https://www.thno.org//creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
- [41] J. L. Hammond, N. Formisano, P. Estrela, S. Carrara y J. Tkac, "Electrochemical biosensors and nanobiosensors," *Essays in Biochemistry*, vol. 60, n.º 1, págs. 69-80, 30 de jun. de 2016, ISSN: 0071-1365. DOI: 10.1042/EBC20150008. 31 de jul. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986461/>.
- [42] K. Tian, M. Prestgard y A. Tiwari, "A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 41, págs. 100-118, ago. de 2014, ISSN: 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.013. 8 de ago. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114002057>.
- [43] M. S. Belluzo, M. É. Ribone y C. M. Lagier, "Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics," *Sensors (Basel, Switzerland)*, vol. 8, n.º 3, págs. 1366-1399, 27 de feb. de 2008, ISSN: 1424-8220. 31 de jul. de 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3663002/>.
- [44] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart y J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry," *Journal of Chemical Education*, vol. 95, n.º 2, págs. 197-206, feb. de 2018, ISSN: 19381328. DOI: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.

- [45] X. Wu, L. Hou, X. Lin y Z. Xie, “Application of novel nanomaterials for chemo- and biosensing of algal toxins in shellfish and water,” en *Novel Nanomaterials for Biomedical, Environmental and Energy Applications*, Elsevier, 2019, págs. 353-414, ISBN: 978-0-12-814497-8. DOI: 10.1016/B978-0-12-814497-8.00012-6. 3 de ago. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128144978000126>.
- [46] X. Pu et al., “Understanding and calibration of charge storage mechanism in cyclic voltammetry curves,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 60, n.º 39, págs. 21310-21318, 2021, ISSN: 1521-3773. DOI: 10.1002/anie.202104167. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.202104167>.
- [47] C. Soldano, A. Mahmood y E. Dujardin, “Production, properties and potential of graphene,” *Carbon*, vol. 48, n.º 8, págs. 2127-2150, jul. de 2010, ISSN: 00086223. DOI: 10.1016/j.carbon.2010.01.058. 3 de ago. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008622310000928>.
- [48] Z. Zhen y H. Zhu, “Structure and properties of graphene,” en *Graphene*, Elsevier, 2018, págs. 1-12, ISBN: 978-0-12-812651-6. DOI: 10.1016/B978-0-12-812651-6.00001-X. 3 de ago. de 2024. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012812651600001X>.
- [49] Y. Zhu et al., “Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications,” *Advanced Materials*, vol. 22, n.º 35, págs. 3906-3924, 15 de sep. de 2010, ISSN: 0935-9648, 1521-4095. DOI: 10.1002/adma.201001068. 5 de ago. de 2024. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201001068>.
- [50] M. d. R. Chávez-Castillo, M. A. Rodríguez-Meza y L. Meza-Montes, “Grafeno y Siliceno: una nueva vida gracias a la sutileza de los materiales bidimensionales,” *Ciencia ergo-sum*, vol. 20-2, págs. 148-152, 2013. https://www.researchgate.net/publication/312200514_Grafeno_y_Siliceno_una_nueva_vida_gracias_a_la_sutileza_de_los_materiales_bidimensionales.
- [51] Q. Cao et al., “A review of current development of graphene mechanics,” *Crystals*, vol. 8, n.º 9, pág. 357, sep. de 2018, Number: 9 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, ISSN: 2073-4352. DOI: 10.3390/cryst8090357. 8 de ago. de 2024. <https://www.mdpi.com/2073-4352/8/9/357>.
- [52] J. Du y H.-M. Cheng, “The fabrication, properties, and uses of graphene/polymer composites,” *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 213, n.º 10, págs. 1060-1077, 14 de jun. de 2012, ISSN: 1022-1352, 1521-3935. DOI: 10.1002/macp.201200029. 8 de ago. de 2024. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/macp.201200029>.
- [53] A. Razaq, F. Bibi, X. Zheng, R. Papadakis, S. H. M. Jafri y H. Li, “Review on graphene-, graphene oxide-, reduced graphene oxide-based flexible composites: From fabrication to applications,” *Materials*, vol. 15, n.º 3, pág. 1012, ene. de 2022, Number: 3 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, ISSN: 1996-1944. DOI: 10.3390/ma15031012. 8 de ago. de 2024. <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/3/1012>.

- [54] S. S. Shams, R. Zhang y J. Zhu, “Graphene synthesis: A review,” *Materials Science-Poland*, vol. 33, n.º 3, págs. 566-578, 1 de sep. de 2015, ISSN: 2083-134X. DOI: 10.1515/msp-2015-0079. 8 de ago. de 2024. <https://www.sciendo.com/article/10.1515/msp-2015-0079>.
- [55] R. Ye, D. K. James y J. M. Tour, “Laser-induced graphene: From discovery to translation,” *Advanced Materials*, vol. 31, n.º 1, pág. 1803 621, ene. de 2019, ISSN: 0935-9648, 1521-4095. DOI: 10.1002/adma.201803621. 8 de ago. de 2024. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201803621>.
- [56] K. Settu, P. T. Chiu e Y. M. Huang, “Laser-induced graphene-based enzymatic biosensor for glucose detection,” *Polymers*, vol. 13, n.º 16, ago. de 2021, ISSN: 20734360. DOI: 10.3390/polym13162795.
- [57] “Defects are perfect in laser-induced graphene,” 8 de ago. de 2024. <https://news2.rice.edu/2014/12/10/defects-are-perfect-in-laser-induced-graphene-2/>.
- [58] N. Parker. “How to measure internal resistance of a battery,” Physics Forums Insights, 17 de nov. de 2024. <https://www.physicsforums.com/insights/how-to-measure-internal-resistance-of-a-battery/>.
- [59] R. Chen et al., “Use of Platinum as the Counter Electrode to Study the Activity of Nonprecious Metal Catalysts for the Hydrogen Evolution Reaction,” *ACS Energy Letters*, vol. 2, n.º 5, págs. 1070-1075, 12 de mayo de 2017, Publisher: American Chemical Society. DOI: 10.1021/acseenergylett.7b00219. 15 de nov. de 2024. <https://doi.org/10.1021/acseenergylett.7b00219>.
- [60] H. Schäfer et al., “Surface Oxidation of Stainless Steel: Oxygen Evolution Electrocatalysts with High Catalytic Activity,” *ACS Catalysis*, vol. 5, n.º 4, págs. 2671-2680, 3 de abr. de 2015, Publisher: American Chemical Society. DOI: 10.1021/acscatal.5b00221. 15 de nov. de 2024. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00221>.
- [61] H. Seelajaroen, A. Bakandritsos, M. Otyepka, R. Zbořil y N. S. Sariciftci, “Immobilized Enzymes on Graphene as Nanobiocatalyst,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 12, n.º 1, págs. 250-259, 8 de ene. de 2020, Publisher: American Chemical Society, ISSN: 1944-8244. DOI: 10.1021/acsami.9b17777. 17 de nov. de 2024. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b17777>.