

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



**Diseño y desarrollo de un prototipo de biosensor de bajo costo
basado en papel para su implementación en pruebas de
diagnóstico en el punto de atención**

Trabajo de graduación presentado por María Fernanda Morales García
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería




**Diseño y desarrollo de un prototipo de biosensor de bajo costo
basado en papel para su implementación en pruebas de
diagnóstico en el punto de atención**

Trabajo de graduación presentado por María Fernanda Morales García
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica

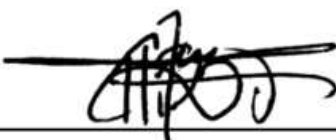
Guatemala,

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.

Aprendí acerca de los biosensores en el curso *The World of Biosensors: From Theory to Real-World Applications*. En este curso pude conocer acerca de sus principios de funcionamiento, la amplia variedad de aplicaciones que tienen alrededor del mundo, y cómo estos se han convertido en una herramienta clave para la detección de biomoléculas en entornos con recursos limitados. Entre estas biomoléculas figuran los marcadores biológicos, cuya detección por medio de biosensores de bajo costo ha contribuido ampliamente al desarrollo de los sistemas de salud y a hacer más accesibles los sistemas de detección y diagnóstico para las poblaciones.

Este proyecto surge con la intención de comenzar a establecer una plataforma en el país para el desarrollo de biosensores de bajo costo basados en papel. Con el establecimiento de esta plataforma, se pretende abrir las puertas para el diseño, desarrollo e implementación de una amplia gama de dispositivos analíticos que podrían servir como herramientas para la detección de moléculas biológicas de manera rápida, rentable, fácil de implementar e interpretar y amigables con los usuarios.

Quiero agradecer a Dios, por permitirme alcanzar este punto en mi vida. Agradezco infinitamente a mis padres, por su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi vida y por siempre motivarme a ser una mejor versión de mí. Agradezco a mis abuelos, a mi hermana y al resto de mi familia, por ser un gran apoyo y por acompañarme en todas las etapas de mi vida. Agradezco a mis amigos y compañeros de clase, que me han acompañado durante estos años de formación en la Universidad, con quienes he podido crecer tanto en el ámbito académico como personal.

Agradezco profundamente a mi asesora y supervisora PhD. Vanessa Wilma Jungbluth, por todo el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo, por compartir conmigo sus conocimientos, sus consejos y sus experiencias. Sus conocimientos y su compromiso como catedrática fueron factores clave para la realización de este trabajo.

Agradezco también a todos mis profesores, por compartir sus conocimientos conmigo y por ser factores vitales en mi crecimiento y formación profesional. A la Universidad del Valle de Guatemala, por haber sido mi casa de estudios durante estos años, en los que ha explotado mi potencial y me ha brindado una sólida plataforma de crecimiento.

Para finalizar, quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron a concluir este proyecto: al Departamento de Ingeniería Electrónica, Mecatrónica y Biomédica, al Departamento de Química y al Departamento de Bioquímica de la Universidad del Valle de Guatemala, a PhD. Luis Diego Archila y a PhD. Patrizia Lupo, por abrirme las puertas del Departamento de Bioquímica en múltiples ocasiones a lo largo de la realización de este proyecto.

Prefacio	iv
Lista de figuras	vii
Lista de cuadros	viii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	5
4. Objetivos	8
5. Alcance	9
6. Marco teórico	11
7. Metodología	31
8. Resultados	42
9. Discusión	56
10. Conclusiones	64
11. Recomendaciones	65
12. Bibliografía	67

Lista de figuras

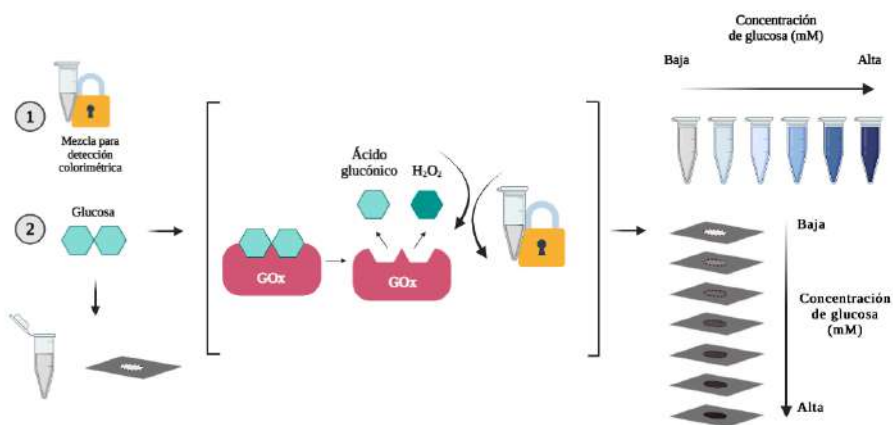
1.	<i>Mecanismo para el control y mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre por medio de la secreción glucagón e insulina</i>	12
2.	<i>Niveles de glucosa en sangre</i>	13
3.	<i>Tipos de diabetes</i>	14
4.	<i>Componentes de un biosensor</i>	16
5.	<i>Representación esquemática de los recursos necesarios para lograr un diagnóstico utilizando el procedimiento convencional comparado con la implementación de pruebas de diagnóstico en el punto de atención</i>	20
6.	<i>Línea del tiempo de la utilización del papel como sustrato en aplicaciones analíticas.</i>	22
7.	<i>Procedimiento para el patronaje con cera utilizando la técnica de inmersión en cera</i>	25
8.	<i>Procedimiento para la fabricación de un dispositivo analítico basado en papel utilizando la técnica de permeación con cera</i>	27
9.	<i>Conversión de glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por medio de la enzima GOx en presencia de dióxígeno</i>	30
10.	<i>Representación de las dimensiones y diseño del dispositivo</i>	32
11.	<i>(A) Esquemático de estructura armada para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de inmersión en cera en vista frontal y trasera. (B) Procedimiento para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de inmersión en cera en vista lateral</i>	33
12.	<i>Procedimiento para el ensamble de la estructura empleada para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de inmersión en cera.</i>	33
13.	<i>Partes del mecanismo para la fabricación de seis dispositivos analíticos basados en papel en una sola inmersión.</i>	34
14.	<i>Procedimiento para el ensamble del mecanismo utilizado para la elaboración de seis dispositivos analíticos basados en papel en una sola inmersión.</i>	35
15.	<i>Mecanismo armado para la fabricación de seis dispositivos analíticos basados en papel en una sola inmersión</i>	36

16.	<i>Crayón de cera de parafina elaborado para la fabricación de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de permeación con cera.</i>	37
17.	<i>Procedimiento para la fabricación de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de permeación con cera</i>	38
18.	<i>Colocación de colorante alimenticio en zona de detección para la evaluación de formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de aplicación de la muestra en los prototipos fabricados</i>	39
19.	<i>Procedimiento del estudio de la reacción para la detección de glucosa utilizando el complejo yodo-almidón en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima GOx en solución</i>	40
20.	<i>Procedimiento del estudio de la reacción para la detección de glucosa utilizando el complejo yodo-almidón en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima Gox en papel</i>	41
21.	<i>Prototipo de dispositivo analítico basado en papel fabricado utilizando la técnica de permeación con cera a una temperatura de 120 °C y papel de filtro Whatman® grado 4 observado en el microscopio (magnificación x4)</i>	43
22.	<i>Demostración de retención de líquidos en el área de detección hidrofílica de un prototipo de dispositivo analítico basado en papel elaborado utilizando la técnica de inmersión en cera a 130 °C en papel de filtro Whatman® grado 4 (magnificación x4)</i>	43
23.	<i>Comportamiento de superficie hidrofóbica impregnada con cera de parafina a 130 °C</i>	44
24.	<i>Vista lateral de gotas de colorante alimenticio en papel de cromatografía</i>	45
25.	<i>Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas para los prototipos fabricados con el método de inmersión en cera</i>	47
26.	<i>Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas para los prototipos fabricados con el método de inmersión en cera para la elaboración de 6 prototipos en una sola inmersión</i>	48
27.	<i>Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas para los prototipos fabricados con el método de permeación con cera</i>	50
28.	<i>Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas de los prototipos finales seleccionados para cada método de fabricación</i>	51
29.	<i>Pruebas de control para evaluación de la viabilidad de la reacción (15 minutos de incubación)</i>	52
30.	<i>Observación de desarrollo de color de una de las reacciones intermedias para detección de glucosa por medio de ensayo colorimétrico utilizando enzima GOx y el complejo yodo-almidón en solución</i>	53
31.	<i>Curva de calibración para la reacción para detección de glucosa por medio de ensayo colorimétrico utilizando enzima GOx y complejo yodo-almidón en solución utilizando absorbancia A570</i>	54
32.	<i>Curva de calibración para detección de glucosa por medio de ensayo colorimétrico de enzima GOx y complejo yodo-almidón en papel con tiempo de incubación de 15 minutos utilizando valor medio en escala de grises</i>	55

Lista de cuadros

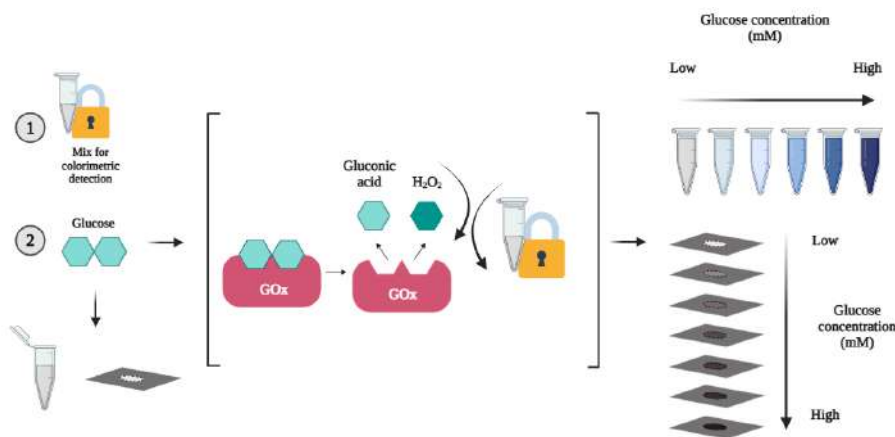
1. *Comparación de técnicas de detección colorimétrica y electroquímica para los dispositivos analíticos basados en papel* 29
2. *Promedio del área, desviación estándar e imágenes de los grupos de variaciones de prototipos fabricados con la técnica de inmersión en cera.* 46
3. *Promedio del área, desviación estándar e imágenes de los grupos de variaciones de prototipos fabricados con la técnica de permeación con cera.* 49

La utilización de biosensores como pruebas de diagnóstico en el punto de atención permite el análisis de fluidos biológicos para el monitoreo de enfermedades en las poblaciones. Estos surgen como una alternativa para las pruebas diagnósticas convencionales, pues muestran ser asequibles, portátiles, intuitivos y rápidos, dando gran significancia a su implementación en entornos de bajos recursos. El objetivo de este trabajo fue el diseño y desarrollo de un prototipo de biosensor de bajo costo basado en papel para su implementación en pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Para ello, se fabricaron variaciones prototipos utilizando las técnicas de inmersión y permeación con cera. Se compararon las áreas de detección formadas, y se seleccionó un prototipo final. Se evaluó su posible implementación como biosensor por medio de una prueba de concepto empleando un ensayo colorimétrico para la detección de glucosa utilizando la enzima glucosa oxidasa en conjunto con el complejo yodo-almidón. El prototipo final utiliza el método de inmersión en cera en papel de filtro Whatman® grado 4 con cera de parafina a 120 °C. Los resultados obtenidos confirman la viabilidad del prototipo para su implementación como un biosensor en pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Además, se logró identificar la idoneidad de este tipo de prototipos para ser utilizados en el desarrollo de pruebas de diagnóstico en el punto de atención, y reconocer el impacto que la fabricación de este tipo de dispositivos representa para el desarrollo del sistema de salud en países en vías de desarrollo.



Abstract

The use of biosensors as point-of-care diagnostic tests allows the analysis of biological fluids for disease monitoring in populations. They emerge as an alternative to conventional diagnostic tests, as they are affordable, portable, intuitive and fast, giving great significance to their implementation in low-resource environments. The objective of this work was the design and development of a low-cost paper-based biosensor prototype for its implementation in point-of-care diagnostic tests. To this end, prototype variations were fabricated using immersion and wax permeation techniques. The formed detection areas were compared, and a final prototype was selected. Its possible implementation as a biosensor was evaluated by means of a proof of concept employing a colorimetric assay for glucose detection using the enzyme glucose oxidase in conjunction with the starch-iodine complex. The final prototype uses the wax immersion method on Whatman® grade 4 filter paper with paraffin wax at 120 °C. The results obtained confirm the feasibility of the prototype for its implementation as a biosensor in point-of-care diagnostic tests. Also, it was possible to identify the suitability of this type of prototype for its use in the development of point-of-care diagnostic tests, and to recognize the impact that the manufacturing of this type of device represents for the development of the healthcare system in developing countries.



Los biosensores implementados como dispositivos de diagnóstico en el punto de atención presentan soluciones para los principales problemas relacionados con la implementación de las técnicas de diagnóstico convencionales en entornos con recursos limitados. Entre estos se mencionan los elevados costos de fabricación e implementación y la necesidad de equipos y personal con alto nivel de especialización. Los dispositivos analíticos basados en papel han demostrado ser rentables, accesibles, sencillos y fáciles de implementar en diferentes entornos, haciéndolos ideales para la detección de moléculas biológicas en entornos de escasos recursos. Se han propuesto diversas técnicas de fabricación que son reconocidas principalmente debido a su bajo costo, rapidez, robustez y adaptabilidad. Por su parte, los ensayos colorimétricos son ideales para ser integrados con estos dispositivos debido a su simplicidad, estabilidad y a su compatibilidad con sistemas de reporte de bajo costo. Debido a la prevalencia de la diabetes y a la importancia del monitoreo de los niveles de glucosa para su prevención, diagnóstico y tratamiento, se ha convertido en una enfermedad modelo para el estudio y desarrollo de dispositivos en el área de los biosensores, siendo la glucosa el analito más comúnmente investigado.

El objetivo de este trabajo fue el diseño y desarrollo de un prototipo de biosensor de bajo costo basado en papel para su implementación en pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Esto se inició con una fase de fabricación y optimización de prototipos de dispositivos analíticos basados en papel por medio de inmersión en cera y permeación con cera utilizando papel de cromatografía y papel de filtro. Luego, se comparó la formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de aplicación de la muestra en los prototipos fabricados. Esto para seleccionar un prototipo final que fue evaluado para su posible utilización como biosensor. Dicha evaluación se hizo mediante una prueba de concepto para la detección de glucosa por medio de una reacción colorimétrica que combinaba la función de la enzima glucosa oxidasa con el muy conocido complejo yodo-almidón. La capacidad de la reacción para la detección de glucosa fue evaluada en solución, para luego ser implementada utilizando como plataforma el prototipo para dispositivo analítico basado en papel.

En el capítulo 2 y 3 se presentan los antecedentes más relevantes relacionados con los biosensores, su implementación como pruebas de diagnóstico en el punto de atención y los factores que han sido clave para el desarrollo de los dispositivos analíticos basados en papel. Luego, en el capítulo 4 se presenta el objetivo general y los objetivos específicos de este proyecto, seguidos por el establecimiento de su alcance en el capítulo 5. Posteriormente, se presentan las bases teóricas que sustentan este trabajo (capítulo 6). En el capítulo 7 se presenta la metodología, a partir de la cual se obtuvieron los resultados del presente trabajo (capítulo 8). La discusión de los resultados puede encontrarse en el capítulo 9. Para finalizar, en los capítulos 10 y 11 se exponen las conclusiones y recomendaciones obtenidas a partir de este trabajo.

Los biosensores o sensores biológicos son dispositivos que se han desarrollado rápidamente en los últimos años. Estos juegan un papel clave para proveer herramientas de análisis biológico con una gran variedad de aplicaciones. Entre estas se puede mencionar el descubrimiento de drogas, la detección de contaminantes en el ambiente y el monitoreo de marcadores que funcionan como indicadores de enfermedades en fluidos corporales como la sangre, saliva, sudor y orina [1].

En las últimas décadas se han logrado avances significativos en el campo de los biosensores. A partir de estos ahora existe una gran variedad de moléculas que pueden ser detectadas y de elementos biológicos que permiten su captura, cuyas combinaciones resultan en una amplia gama de aplicaciones para los biosensores. Además, también se han desarrollado una gran variedad de técnicas que permiten la conversión de las señales generadas por la captura de las moléculas de interés a señales medibles e incluso observables a simple vista, de manera que sean fácilmente interpretadas por sus operadores [1].

El desarrollo del primer biosensor “verdadero” se le atribuye a Leland C. Clark, quien desarrolló un biosensor para la detección de oxígeno en 1956. Su dispositivo es conocido hoy en día como el electrodo de Clark [1]. El descubrimiento de Clark permitió ampliar el rango de analitos que podían medirse, y en 1962 propuso la utilización de enzimas en combinación con los biosensores [2].

En el campo de las ciencias médicas, nuevas aplicaciones para los biosensores surgen día con día [3]. Estos se utilizan ampliamente para diagnosticar enfermedades infecciosas y para monitorear enfermedades. Entre las que se puede mencionar la diabetes mellitus, que se caracteriza porque requiere de un control riguroso en los niveles de concentración de glucosa en la sangre [3].

A pesar de la amplia disponibilidad de exámenes y pruebas diagnósticas en los sistemas de salud y comunidades, el costo de su fabricación es una de las mayores preocupaciones e impedimentos para su implementación en todo el mundo, incluidos aquellos países que se encuentran en vías de desarrollo [4]. Además de esto, los instrumentos utilizados no son portátiles, requieren de personal especializado para su manipulación e interpretación, condiciones especiales para el entorno en el que son manipuladas y de procedimientos extensos para obtener resultados [5]. Siendo estos también impedimentos para su implementación en entornos de escasos recursos.

Es así como comienza la exploración de los biosensores para ser utilizados como pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Este tipo de dispositivos hace posible la ejecución de exámenes clínicos cerca de los pacientes, facilitando la toma de decisiones respecto a la atención sanitaria al utilizar la información que brindan a través de la detección de biomarcadores importantes [6]. Gracias a algunas adaptaciones que se han hecho a los biosensores tradicionales, estos ahora tienen la posibilidad de ser utilizados como dispositivos miniaturizados para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades en el punto de atención. Al compararlos con otras técnicas e instrumentos bioanalíticos, estos muestran ser más asequibles, portátiles, amigables con el usuario, rápidos, entre otras características [5].

Actualmente, hay millones de personas en el mundo que padecen diabetes y que necesitan medir su nivel de glucosa a diario, además de la gran cantidad de personas que necesita de este tipo de análisis para ser diagnosticado con diabetes. A raíz de esto, la glucosa se ha vuelto el analito más comúnmente evaluado [7] y ninguna prueba diagnóstica es más común que la de glucosa [8]. Teniendo un mercado tan amplio, la diabetes es una enfermedad modelo para el desarrollo de nuevos conceptos y técnicas en el área de los biosensores y de los dispositivos para pruebas de diagnóstico en el punto de atención [7].

El diagnóstico es el primer paso para tratar una enfermedad [9], y el análisis de fluidos biológicos es necesario para el monitoreo de la salud en las poblaciones [10]. Sin embargo, el principal obstáculo para el monitoreo y control de enfermedades aún sigue siendo el poder entregar sistemas de detección o pruebas de diagnóstico que sean simples, asequibles, amigables con el usuario. Además, que tengan la capacidad de detectar biomarcadores de manera sencilla y analizarlos en entornos de escasos recursos [11].

Actualmente existen diferentes métodos que se emplean para llevar a cabo los ensayos biológicos. Estos ensayos permiten la detección de biomarcadores en fluidos corporales, entregando resultados válidos y sensibles. No obstante, estos métodos tradicionales consisten en largos procedimientos que necesitan grandes cantidades de reactivos y muestras, además de personal capacitado para llevar a cabo los ensayos e interpretar los resultados [11].

Un diagnóstico más rápido es una de las necesidades más importantes de los sistemas de salud alrededor del mundo. Para lograrlo, es necesario contar con dispositivos que permitan la detección y diagnóstico de enfermedades en etapas tempranas [12]. La necesidad de diagnósticos en el punto de atención para los países en vías de desarrollo se ve enfatizada por la falta de infraestructura, la escasez de personal capacitado y el aumento de las infecciones asociadas a la atención sanitaria [13].

A raíz de las necesidades anteriormente mencionadas, los dispositivos para pruebas de diagnóstico en el punto de atención han surgido como una fuerte herramienta de diagnóstico. Estos han mostrado gran relevancia en países donde los sistemas de atención sanitaria no tienen las capacidades para proveer los servicios adecuados a toda la población [14]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, un dispositivo utilizado para realizar una prueba de diagnóstico en el punto de atención debe ser asequible, sensible, específico, amigable con el usuario, rápido/robusto, libre de equipo y entregable (ASSURED, por sus siglas en inglés) [14].

Los materiales utilizados tradicionalmente para la elaboración de dispositivos de diagnóstico en el punto de atención son silicon, vidrio y materiales poliméricos, como polidimetilsiloxano (PDMS) [15]. Aunque dichos materiales sean mucho más simples al compararlos con el equipo tradicional de laboratorio, aún representan un costo que impide su utilización en entornos con recursos limitados. Esto debido a la necesidad de técnicas y equipos especializados para su fabricación [15].

Un dispositivo basado en papel ofrece la oportunidad de reducir los costos de los ensayos biológicos [13]. Entre los beneficios de la utilización de papel como una plataforma para los sensores biológicos se puede mencionar que es un material disponible en todo el mundo, rentable, biocompatible, flexible, hidrofílico y que permite el movimiento de fluidos sin utilización de bombas externas [9]. La utilización del papel en técnicas químicas y analíticas ha sido bastante notable a través de la historia, lo que demuestra su viabilidad para el aprovechamiento de los principios de técnicas analíticas existentes en la fabricación de dispositivos analíticos [16]. Por otro lado, es un material bastante utilizado para la realización de ensayos colorimétricos debido a que genera un contraste notorio con sustratos coloreados, los cuales se obtienen generalmente a partir de ese tipo de ensayos [16]. En cuanto a la seguridad sanitaria, el papel provee una solución para el descarte de los dispositivos luego de ser utilizados, ya que es posible incinerarlos de manera fácil y rápida [16]. Finalmente, se debe mencionar que existe una amplia gama de técnicas de fabricación que pueden ser utilizadas para producir dispositivos con este material, incluyendo técnicas de bajo costo que pueden ser utilizadas en entornos con recursos limitados [16].

Por su parte, la cera de parafina es reconocida por ser inerte al entrar en contacto con reactivos químicos y también por su compatibilidad con una gran variedad de técnicas de fabricación para la formación de patrones, debido a ello es uno de los materiales preferidos para la formación de zonas hidrofóbicas en papel [13]. Además, es un material utilizado en todo el mundo gracias a que es económico y no es tóxico para el usuario [17]. Las técnicas de fabricación basadas en patronaje con cera para dispositivos analíticos basados en papel se caracterizan por no utilizar reactivos químicos, solventes, ni polímeros que podrían ser capaces de alterar las propiedades del área hidrofílica del papel utilizado como plataforma para los dispositivos [17]. Por otro lado, la propagación e impregnación de la cera en el papel puede ser controlada por diversos factores como la temperatura, la presión, el tiempo de exposición y el tamaño de los poros del papel, lo que resulta en una gran variedad de técnicas de fabricación disponibles que utilizan el patronaje con cera para elaborar dispositivos analíticos basados en papel [17].

Los dispositivos analíticos basados en papel pueden ser fabricados utilizando diferentes técnicas. La utilización de la técnica de modelado con cera o patronaje con cera no requiere de ningún solvente orgánico ni equipo complejo, puede ser controlada de manera fácil, es barata, robusta, rápida y adaptable para la producción en masa [18]. Debido a esto, dicha técnica se ha convertido en una alternativa muy prometedora para el desarrollo de tecnología en países en vías de desarrollo [17].

Por otro lado, los ensayos colorimétricos son considerados como la técnica de detección más adecuada para integrar con dispositivos analíticos basados en papel. Esto debido a su simplicidad y compatibilidad con sistemas de reporte de bajo costo como escáneres y teléfonos inteligentes [19]. Este tipo de detección también tiene como ventajas el ofrecer una lectura visual, una operación sencilla y por tener gran estabilidad [20]. Debido a que el cambio de color que se obtiene como resultado de los ensayos colorimétricos puede ser detectado a simple vista, estos muestran gran potencial para ser aplicados en pruebas sin necesidad de equipo especializado, haciéndolas más accesibles en entornos de bajos recursos y en países en vías de desarrollo [20].

La diabetes mellitus es la enfermedad crónica más común en el mundo y se ha convertido en una enfermedad modelo para el estudio de técnicas relacionadas con biosensores y pruebas de diagnóstico [7]. El metabolismo de la glucosa es un factor clave para el funcionamiento de los procesos celulares dentro del cuerpo humano y para el diagnóstico y control de la diabetes, debido a esto los ensayos para la detección de los niveles de glucosa en el cuerpo humano son uno de los tipos de pruebas más comúnmente empleados en laboratorios y hospitales alrededor del mundo [8, 9]. Aunque se han logrado avances significativos en el campo del diagnóstico, tratamiento y prevención de la diabetes, aún existe una gran cantidad de personas en el mundo que tienen diabetes y no han sido diagnosticadas, o que tienen riesgo de padecer dicha condición [21]. A raíz de esto, en los últimos años la prevención, diagnóstico y tratamiento de la diabetes se han convertido en temas de gran relevancia, logrando así el desarrollo de nuevas técnicas y tecnologías con estos fines, como es el caso de los sensores biológicos [21].

Desde que la primera propuesta para un dispositivo analítico basado en papel fue presentada, este tipo de biosensores ha atraído la atención de numerosos investigadores, y se han desarrollado diferentes métodos de fabricación y técnicas de detección que han sido aplicados para el diagnóstico de glucosa [20]. Con el desarrollo de estas tecnologías se espera el surgimiento de una gran variedad de dispositivos analíticos portátiles basados en papel para el análisis de glucosa. Dichos dispositivos tendrían la capacidad de evitar procesos complicados y costosos para su fabricación, haciéndolos más sostenibles y a su vez asequibles para toda la población.

1. Objetivo general

Diseñar y desarrollar un prototipo de biosensor de bajo costo basado en papel para su implementación en pruebas de diagnóstico en el punto de atención.

2. Objetivos específicos

- Fabricar y optimizar prototipos por medio de inmersión en cera y permeación con cera utilizando papel de cromatografía y papel de filtro.
- Comparar la formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de aplicación de la muestra en los prototipos fabricados.
- Evaluar el prototipo final para su posible implementación como biosensor.

El presente trabajo de investigación se realiza con el objetivo de diseñar y desarrollar un prototipo de biosensor de bajo costo basado en papel para su implementación en pruebas de diagnóstico en el punto de atención. La primera parte se centra en la fabricación y optimización de prototipos utilizando tres técnicas de fabricación de patronaje con cera: inmersión en cera, una propuesta propia de variación para la técnica de inmersión en cera donde se elaboran 6 dispositivos en una sola inmersión, y permeación con cera. Estas técnicas fueron seleccionadas a raíz de su facilidad de implementación y a que no se requerían herramientas o equipos especializados, haciendo posible su implementación en la Universidad. No se espera que los dispositivos creados con estas técnicas alcancen la resolución de las técnicas más avanzadas que emplean tecnología de punta. No obstante, se espera que los resultados sean lo suficientemente cercanos a los deseados para lograr la mayor uniformidad y reproducibilidad posible en los prototipos.

Una vez fabricados los prototipos, se comparó la formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de aplicación de la muestra para seleccionar un prototipo final. Estas comparaciones se realizaron al colocar gotas de colorante alimenticio y luego evaluar la capacidad de los prototipos para contenerlo dentro de la zona de detección. El prototipo final fue utilizado para evaluar su posible implementación como biosensor. Para dicha evaluación, se implementó una prueba de concepto para la detección de glucosa por medio de una reacción colorimétrica empleando la enzima glucosa oxidasa (GOx) y el complejo yodo-almidón. Para todas las pruebas de detección de glucosa se utilizaron soluciones con concentraciones conocidas de glucosa, no se utilizaron muestras obtenidas de seres humanos. La reacción en papel fue evaluada con concentraciones de glucosa de 0 a 10 mM, para las que se estudió el resultado colorimétrico a simple vista y por medio del valor medio en escala de grises.

Los resultados de la implementación de la prueba de concepto en este dispositivo indicarán la viabilidad de la utilización de la reacción para la detección y diferenciación de diferentes concentraciones de glucosa. Sin embargo, este es un punto de partida para continuar con el estudio y optimización de la reacción planteada. Esto con el objetivo de estudiar más a fondo factores clave como la sensibilidad, selectividad y estabilidad de la reacción y

del dispositivo para su posible implementación como una prueba de diagnóstico en el punto de atención a futuro.

1. Glucosa

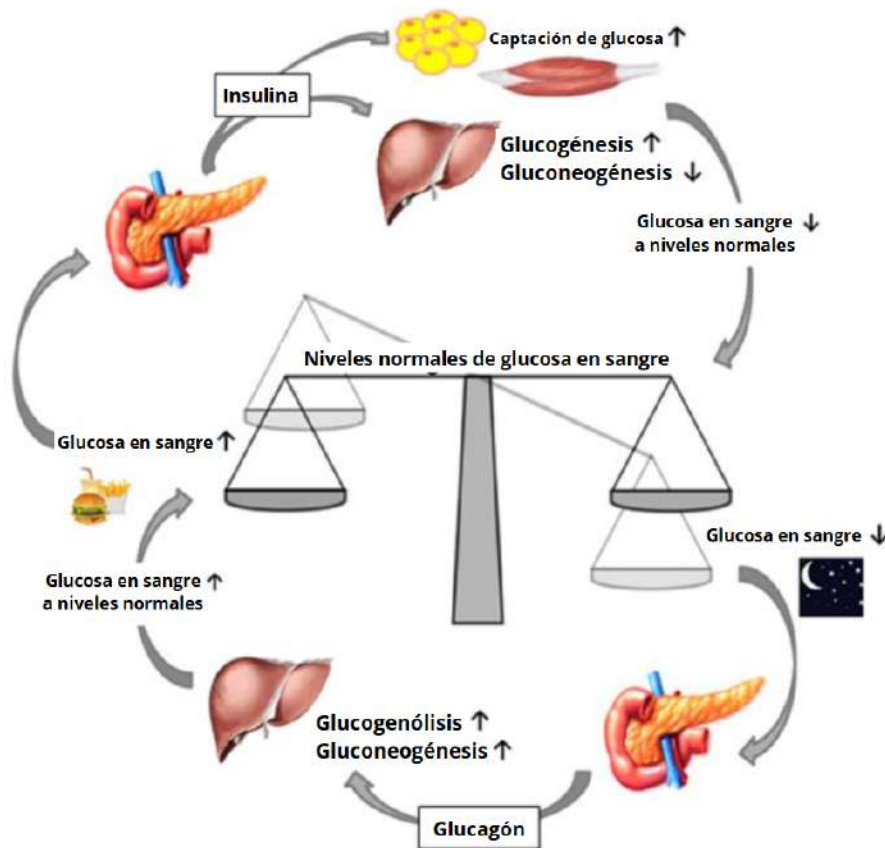
La glucosa es el principal tipo de azúcar que se encuentra en el cuerpo humano, y su principal fuente de energía [22]. Esta pertenece a la familia de los carbohidratos, siendo una de sus formas más simples con una estructura de 6 carbonos [23]. Los carbohidratos son fuentes de energía indispensables y están presentes en todo organismo vivo, ya que juegan papeles importantes para alimentar todos los procesos celulares que requieren energía [23]. La glucosa se obtiene a partir de los alimentos que consumimos, y entra al cuerpo en forma de galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa o almidón. Además, puede ser producida por medio de gluconeogénesis a partir de grasas y proteínas [23].

Esta azúcar es transportada por medio de la sangre hacia los tejidos que requieren energía dentro del cuerpo. Esto por medio de diferentes reacciones bioquímicas que se dan dentro de la célula, la glucosa produce energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés), el cual sirve como combustible para los procesos celulares [23]. Debido a esto, la glucosa es una molécula esencial para el correcto funcionamiento de cualquier organismo.

En personas sanas, el control en los niveles de glucosa se obtiene a partir de trabajo sincronizado de varios sistemas y órganos. Esto resulta en un sistema de regulación complejo que es controlado por medio de hormonas y neuropéptidos liberados por el cerebro, el páncreas, el hígado, intestino y por los tejidos musculares y adiposos, entre otros. El páncreas es un órgano crucial para la regulación de los niveles de glucosa dentro del cuerpo por medio de la producción de hormonas, siendo la insulina y el glucagón las más relevantes [24].

En la Figura 1 se muestra el mecanismo utilizado por el páncreas para el control y mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre. La insulina es la hormona responsable de disminuir los niveles de glucosa en la sangre, esta es producida cuando los niveles de glucosa son altos. Se encarga de permitir que los tejidos dependientes de insulina puedan captar glucosa para llevar a cabo sus funciones metabólicas, y promueve la glucogénesis (transformación de glucosa en glucógeno). Por otro lado, el glucagón es el opositor de la insulina y se encarga de elevar los niveles de glucosa en sangre al promover la glucogenólisis (conversión de glucógeno en glucosa) y gluconeogénesis (síntesis biológica de glucosa) [24].

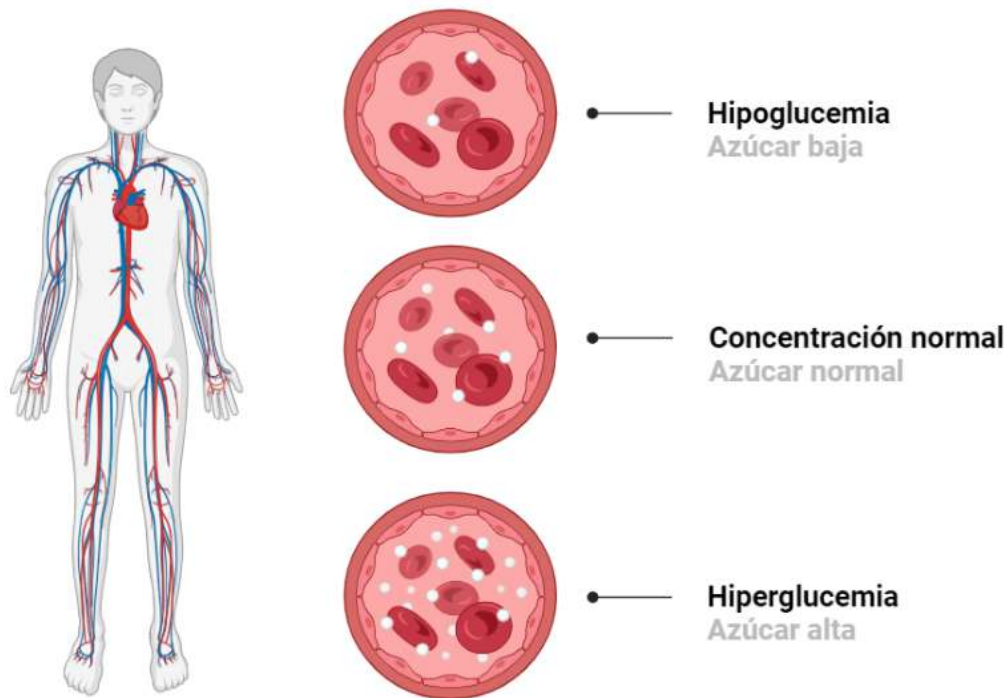
Figura 1. Mecanismo para el control y mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre por medio de la secreción glucagón e insulina



Nota. Adaptado de [24].

Como se describió anteriormente, el metabolismo de la glucosa está intrínsecamente regulado dentro del cuerpo para satisfacer las necesidades energéticas a nivel celular y prevenir hiperglucemia (niveles de glucosa en sangre demasiado altos) o hipoglucemia (niveles de glucosa en sangre demasiado bajos) [23]. En la Figura 2 se puede observar una representación de los niveles de glucosa en sangre mencionados en comparación con el nivel normal de glucosa en el cuerpo humano. La alteración y desregulación de los niveles de glucosa y su homeostasis dentro del cuerpo pueden dar lugar a una gran variedad de trastornos metabólicos que representan grandes retos para los sistemas de salud en la actualidad, entre estos se puede mencionar la diabetes mellitus [23].

Figura 2. Niveles de glucosa en sangre



Nota. Figura creada con BioRender.com. Adaptado de [25].

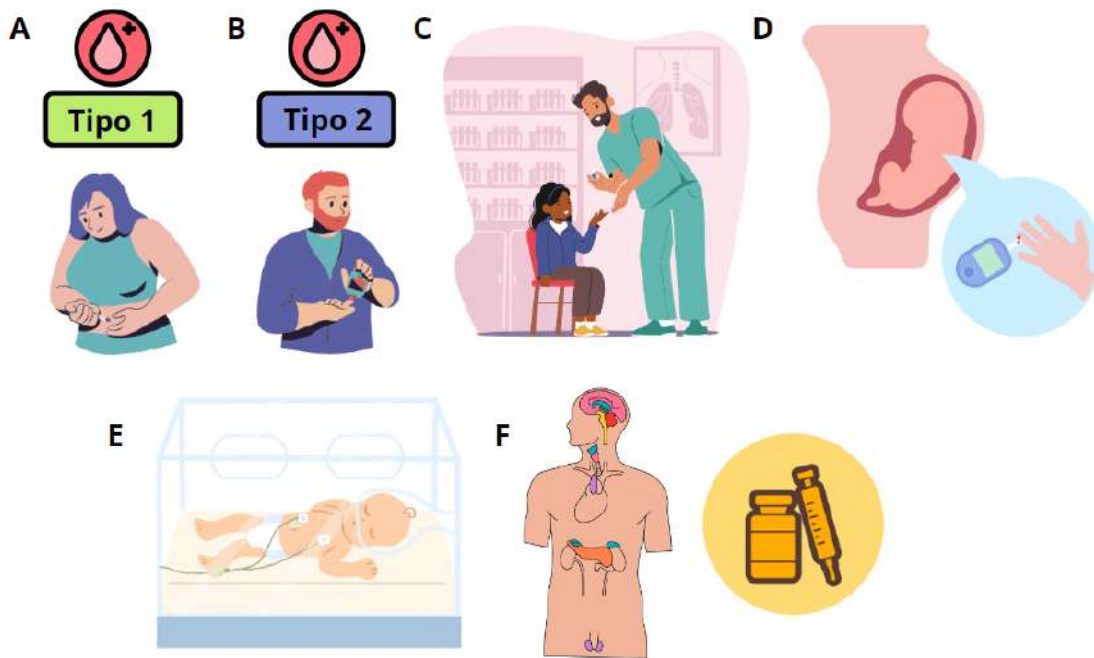
2. Diabetes

La diabetes mellitus es un desorden metabólico causado por el desequilibrio en los niveles de glucosa en la sangre, resultando en niveles demasiado altos que se encuentran fuera del rango normal para el correcto funcionamiento del cuerpo humano (80-120 mg/dL) [7, 23]. La diabetes mellitus se clasifica en diferentes tipos, cada uno con diferentes fisiopatologías y tratamientos. La diabetes tipo 1 y 2 son los dos más prevalentes en el mundo, aunque también se puede mencionar la diabetes tipo MODY (por las siglas en inglés para diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes), la diabetes gestacional, la diabetes neonatal y la diabetes originada por causas secundarias (ver Figura 3) [23].

La diabetes tipo 1 se origina de la destrucción de las células β del páncreas por parte del propio sistema inmune, esto provoca una deficiencia en la producción de insulina que reduce la captación de glucosa por parte de los tejidos, aumentando los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia) y causando desórdenes metabólicos [23]. La diabetes tipo 2 se conoce también como “de resistencia a la insulina”, en este tipo de diabetes las células no responden a la insulina, por lo que los tejidos no pueden captar la glucosa de manera eficiente, aumentando los niveles de glucosa en sangre [23]. La diabetes tipo MODY, es el tipo de diabetes monogénica más conocido. Es causado por mutaciones en un gen, las cuales afectan la producción y secreción de insulina y aparece comúnmente antes de los 25 años

[26]. Por su parte, la diabetes gestacional se refiere al aumento en los niveles de azúcar en sangre durante el embarazo. Normalmente se controla con buenos hábitos alimenticios y ejercicio, sin embargo, en algunos casos es necesaria la insulina. De no ser controlada, puede tener repercusiones en la salud tanto de la madre como del feto [27]. La diabetes neonatal se detecta en los primeros seis meses de vida, puede ser permanente o transitoria. Para este tipo de diabetes se han podido identificar por lo menos 20 causas genéticas [28]. Finalmente, existe una gran variedad de factores que pueden atribuirse a diabetes originada por causas secundarias. Entre estos las principales son enfermedades pancreáticas, y el uso prolongado de esteroides, inmunosupresores y diuréticos [29].

Figura 3. *Tipos de diabetes*



Nota: (A) Diabetes tipo 1. (B) Diabetes tipo 2. (C) Diabetes tipo MODY (por las siglas en inglés para diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes). (D) Diabetes gestacional. (E) Diabetes neonatal. (F) Diabetes originada por causas secundarias (como trastornos en el sistema endocrino, el uso de esteroides, etcétera). Adaptado de [23].

Si los niveles de glucosa en sangre de los pacientes con diabetes no son regulados para mantenerse en niveles adecuados para el correcto funcionamiento del cuerpo, la enfermedad puede adquirir altos niveles de morbilidad y mortalidad [23]. La diabetes puede impactar de manera negativa a diferentes sistemas dentro del cuerpo humano, y sus complicaciones pueden darse a diferentes niveles dependiendo del avance de la enfermedad y su control [30]. Entre las principales complicaciones que pueden surgir se puede mencionar el daño al sistema nervioso, daño al sistema renal, daños oculares que pueden resultar en ceguera, enfermedades cardiovasculares, infartos y enfermedades vasculares periféricas [30].

La diabetes es una enfermedad crónica que tiene prevalencia a nivel mundial, y se debe a la variedad de tipos que existen, la diversidad de causas que pueden originarla y los diferentes grupos de pacientes que pueden padecer de la enfermedad. El examen de los niveles de azúcar en la sangre es esencial para el control y prevención de complicaciones que se originan de esta enfermedad [31]. Además, sirve para evaluar la efectividad de tratamientos para el manejo de los niveles de glucosa y para la toma de decisiones importantes y ajustes en medicación que puede causar hipoglucemia como la insulina [32]. También es una herramienta para el cuidado personalizado de pacientes con diabetes, ya que permite determinar patrones de respuesta a diferentes estímulos como comidas y medicamentos [33]. Debido a esto, la medición precisa de los niveles de glucosa en sangre se ha vuelto una necesidad vital para los pacientes con diabetes.

3. Biosensores

3.1. Definición

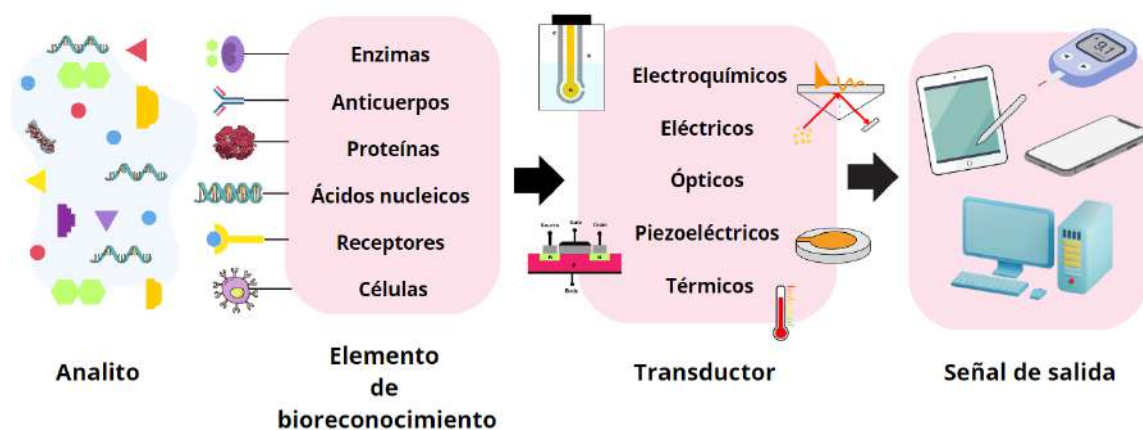
El *Compendio de Terminología Química de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada*, define un biosensor como un dispositivo que identifica compuestos químicos por medio de señales eléctricas, técnicas u ópticas que se producen como resultado de reacciones bioquímicas activadas por enzimas, sistemas inmunológicos, tejidos, orgánulos o células completas [34]. Se puede definir también como un dispositivo integrado que permite la medición de parámetros biológicos o químicos por medio de la generación de señales que son proporcionales a la concentración de la molécula de interés para el análisis, conocida como analito [1].

Los biosensores pueden presentarse en diferentes tamaños y formas [35], los cuales varían dependiendo de su aplicación, el entorno en el que se planea que sean utilizados, la persona que opera el dispositivo, entre otros factores. La versatilidad de este tipo de dispositivos ha permitido que sus áreas de aplicación se amplíen. Actualmente se utilizan biosensores para el monitoreo de enfermedades, estudio de drogas, seguridad alimentaria, detección de contaminantes en el ambiente, detección de microorganismos causadores de enfermedades, entre otros [3].

La selección de materiales, técnicas de fabricación y técnicas de transducción para estos dispositivos requieren de equipos multidisciplinarios con conocimientos de química, biología e ingeniería [3]. Estos son representados como la unión de diferentes componentes que resultan en un dispositivo final integrado capaz de detectar y medir un analito. Existen 4 componentes principales en un biosensor, estos son el analito, el receptor biológico, el transductor y la señal de salida (ver Figura 4) [1].

El analito es la molécula o sustancia que se desea detectar [1]. El receptor biológico es una molécula que reconoce al analito de manera específica [1]. Existen diferentes tipos de receptores biológicos que son utilizados dependiendo de la aplicación y el analito que se desea detectar, entre estos se pueden mencionar anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas, entre otros. Los transductores se encargan de convertir una forma de energía en otra [35]. En el caso de los biosensores, la interacción entre el elemento de bioreconocimiento y el analito genera una señal que puede presentarse en forma de luz, calor, cambios en pH, carga, corriente o masa [1]. Estas señales son proporcionales a la cantidad de analito presente en las muestras, por lo que su conversión es necesaria para poder medirlas. Las señales de salida pueden mostrarse de diferentes formas, las más comunes son por medio de una computadora o impresora, y esto puede realizarse a través de valores numéricos, gráficas, cuadros o imágenes [35].

Figura 4. Componentes de un biosensor



Nota. Adaptado de [1, 36].

3.2. Clasificación de los biosensores

Normalmente, los biosensores pueden clasificarse dependiendo del tipo de transductor que utilizan, lo que resulta en cinco grupos: electroquímicos, eléctricos, ópticos, piezoeléctricos y térmicos [35].

El principio para el funcionamiento de los biosensores electroquímicos se basa en reacciones químicas entre el analito y un elemento de bioreconocimiento que resultan en la producción o consumo de iones, principalmente por medio de reacciones de oxidación-reducción [37]. Estas ocurren dentro de una solución, que permite detectar cambios en sus propiedades eléctricas, como pueden ser la corriente, el potencial eléctrico, impedancia y capacitancia [35, 37]. Dentro de este grupo se pueden encontrar los biosensores potenciométricos, amperométricos, impedimétricos, conductimétricos y voltamétricos [35]. Este tipo de biosensor se caracteriza por su alta sensibilidad, selectividad y capacidad de detección [35].

Los biosensores electrónicos utilizan elementos de bioreconocimiento combinados con transistores de efecto campo (FET, por sus siglas en inglés) [35]. Los FETs están compuestos por tres terminales (fuente, drenaje y puerta), que regulan la corriente que fluye a través de este utilizando un campo eléctrico [38]. Para su funcionamiento, el elemento de bioreconocimiento se inmoviliza en la puerta, la cual controla la corriente que fluye entre la fuente y el drenaje, de manera que cuando el analito se une al elemento de bioreconocimiento, la corriente que fluye cambia [38]. Estos cambios en corriente pueden ser medidos y son proporcionales a la cantidad de analito presente en la muestra.

Los biosensores ópticos funcionan por medio de cambios en la luz, entre estos se pueden mencionar cambios en su absorción, transmisión, reflexión, refracción, fase, amplitud, frecuencia y polarización [35]. Por lo que, en el caso de este tipo de biosensores, la señal de salida que debe pasar por un proceso de transducción para su medición es la luz. Los biosensores ópticos pueden ser diseñados de diferentes formas, lo que resulta en una gran variedad de alternativas dentro de este grupo como son los basados en fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), colorimétricos, entre otros [35].

Los biosensores piezoeléctricos funcionan a partir del efecto piezoeléctrico. Este es un fenómeno físico que caracteriza a un material que es capaz de producir voltaje cuando es sometido a estrés mecánico, lo cual también funciona en sentido opuesto, pues al aplicar un voltaje a este tipo de materiales se puede provocar estrés mecánico y oscilaciones dentro del material [39]. Este tipo de biosensores funciona al inmovilizar el elemento de bioreconocimiento en un material piezoeléctrico, siendo los cristales de cuarzo uno de los materiales elegidos por excelencia [37]. Por medio de la aplicación de voltajes, estos cristales vibran a frecuencias específicas, las cuales varían al aumentar la masa del cristal por medio de la unión del analito al elemento de bioreconocimiento [37]. Dichos cambios en la frecuencia de oscilación pueden ser medidos y utilizados para determinar la cantidad de analito que se es captado por el elemento de bioreconocimiento.

Por último, los biosensores térmicos consisten en la inmovilización de elementos de bioreconocimiento en sensores de temperatura. De esta manera, el calor producido o absorbido por la reacción que ocurre cuando el analito es detectado por el elemento de bioreconocimiento puede ser medido [37]. Este tipo de biosensor es utilizado de manera limitada en comparación con los otros, ya que requiere de largos procedimientos experimentales y es poco específico [35].

3.3. Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos permiten el reconocimiento de una gran variedad de moléculas utilizando un elemento de bioreconocimiento conjuntamente con un sistema de transducción óptico [36]. A partir de ello, se produce una señal óptica que es proporcional a la concentración de analito en una muestra [40]. Los principales ejemplos de biosensores ópticos que existen actualmente son la resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), dispersión de Raman potenciada en superficie, colorimétricos, y basados en fotoluminiscencia [41].

La detección óptica de analitos se puede llevar a cabo con ensayos que utilizan etiquetas para marcar el analito de manera que la señal óptica se genere por medio de colorimetría, fluorescencia o luminiscencia a través dicha etiqueta, o sin la utilización de etiquetas, donde la interacción del analito directamente con el elemento de bioreconocimiento genera una señal que es captada por el transductor [40]. Existe gran cantidad de variaciones para la fabricación de biosensores ópticos. Dichas variaciones dependen del analito a detectar y el mecanismo de detección, lo que ha resultado en que los biosensores ópticos sean el tipo de biosensor más utilizado y reportado hasta hoy en día [36]. Por otra parte, los biosensores ópticos han sido adoptados como soluciones para la fabricación de biosensores fáciles de implementar, rápidos para brindar resultados y que no requieren de equipo especializado para su interpretación y análisis [41].

Este tipo de biosensor se caracteriza por su especificidad, sensibilidad, portabilidad y rentabilidad [40]. Además, es ampliamente utilizado debido a que permite la detección y medición de analitos presentes en muestras, sin interferencias eléctricas o magnéticas que pueden ser provocadas al utilizar otros tipos de técnicas de transducción [42]. Otra ventaja de los biosensores ópticos es su facilidad de implementación, característica que ha hecho que sean preferidos entre los diferentes tipos de biosensores. Entre los biosensores ópticos, los colorimétricos han sido preferidos por su rapidez, selectividad y bajo costo en comparación con otros biosensores de este tipo [41].

3.4. Biosensores colorimétricos

Los biosensores colorimétricos se clasifican como un tipo de biosensor óptico. Son utilizados para la detección de analitos y muestran como resultado un cambio de color que puede ser detectado de manera visual a simple vista [43] o utilizando simples detectores ópticos portátiles para mediciones cuantitativas rápidas y asequibles [44]. Las aplicaciones de los biosensores colorimétricos se han extendido desde la detección de marcadores biológicos en el área de la atención sanitaria, hasta la detección de compuestos químicos, contaminantes orgánicos, iones de metales pesados y otras biomoléculas [45].

Este tipo de biosensores se destaca por ser simples, rápidos y por tener alta sensibilidad y selectividad [43]. Usualmente, la detección del analito se logra hacer en un solo paso y al no utilizar instrumentación especializada son bastante amigables con usuarios que no poseen alto conocimiento técnico en el área [43]. Esto ha hecho posible su implementación de manera rentable y accesible en entornos de bajos recursos cumpliendo con los criterios ASSURED (por las siglas en inglés para asequible, sensible, específico, amigable con el usuario, rápido/robusto, libre de equipo y entregable) para pruebas de diagnóstico en el punto de atención de la Organización Mundial de la Salud [41, 44].

Sin embargo, para que este tipo de biosensores puedan ser utilizados como reemplazo de las técnicas y métodos de diagnóstico convencionales, aún existen desafíos importantes como la baja sensibilidad, la complejidad y el volumen requerido de muestra en comparación con las técnicas convencionales. Al existir una gran variedad de técnicas para la detección colorimétrica, también es importante tomar en cuenta que no todas exhiben el mismo nivel de sensibilidad, especificidad y selectividad. Esto debido a que las diferentes estrategias para la detección de las biomoléculas objetivo pueden presentar variaciones que hacen únicas las características y propiedades de cada dispositivo [43].

La generación de color en estos ensayos puede lograrse utilizando una gran variedad de estrategias, entre estas se pueden mencionar reacciones enzimáticas, indicadores redox, formación de nanopartículas, indicadores ácido-base y reacciones complexométricas, entre otras [4, 19]. Una vez generado el color, se debe hacer una lectura del resultado del ensayo. Usualmente se obtiene un resultado de tipo positivo/negativo, donde un cambio de color en el dispositivo que realiza la prueba indica la presencia del analito en la muestra y puede ser observado a simple vista [4]. Sin embargo, también es posible la obtención de mediciones cuantitativas utilizando curvas de calibración donde la intensidad del color es proporcional a la concentración de analito en la muestra [4, 46].

Aunque los sensores colorimétricos aún presentan algunos retos para ser capaces de reemplazar a las técnicas de diagnóstico convencionales, son bastante prometedores para su implementación en entornos de escasos recursos principalmente debido a su practicidad, rapidez, bajo costo, tamaño reducido y su portabilidad [43]. Es así como han llegado a ser ampliamente propuestos para su implementación en pruebas de diagnóstico en el punto de atención, ya que permiten resolver los principales problemas que surgen en la implementación de técnicas de diagnóstico convencionales en estos entornos. Entre los que se puede mencionar el uso de equipos especializados, tecnología de punta, mano de obra especializada, su alto costo y que requieren de tiempos considerables debido a su complejidad [41].

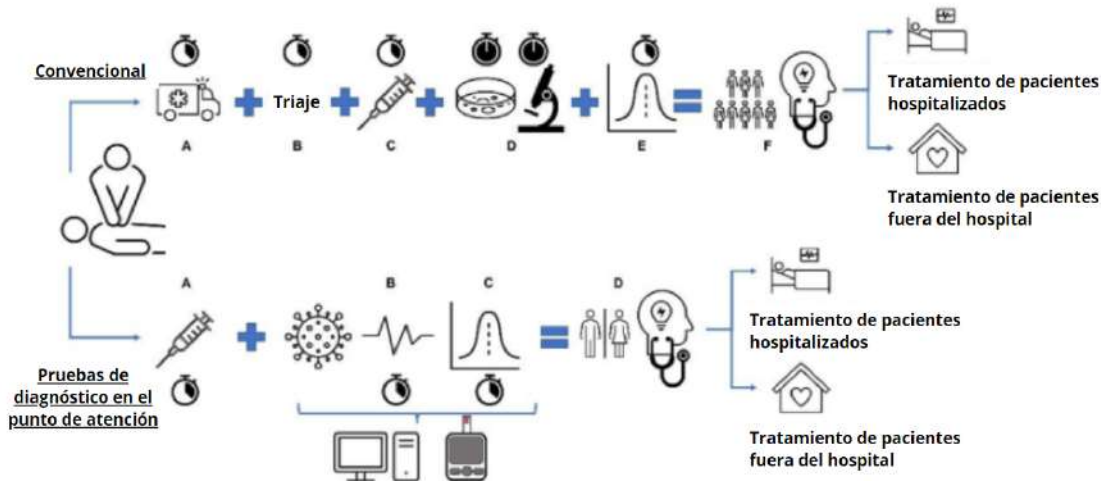
4. Dispositivos de diagnóstico en el punto de atención

Los dispositivos de diagnóstico en el punto de atención (PoC, por sus siglas en inglés), son dispositivos que permiten la realización de exámenes clínicos cerca del paciente y brindan información para la toma de decisiones en el contexto de la asistencia sanitaria [6]. Estos surgen debido a que dentro de los sistemas de salud, existe una necesidad de crear herramientas de diagnóstico que permitan la detección de biomarcadores clínicos en etapas tempranas de las enfermedades, no solo para poder diagnosticar a los pacientes, sino también para predecir enfermedades en fases iniciales [47]. Esto de manera que se pueda dar un mejor seguimiento y mejor atención sanitaria a los pacientes evitando complicaciones, y disminuyendo la cantidad de casos que se diagnostican en etapas avanzadas, donde los tratamientos son más costosos y complejos.

Este tipo de dispositivos se presentan como soluciones para las limitaciones de los exámenes clínicos tradicionales. Adaptando los ensayos para que puedan realizarse de manera rápida, sencilla y asequible en el punto de atención del paciente. Gracias al desarrollo de plataformas de lectura amigables con el usuario y fáciles de interpretar, el nivel de conocimiento y especialización del personal que los utiliza pueden ser más bajos que los que se necesitan para realizar los exámenes tradicionales en un laboratorio biológico [6]. En términos económicos, la reducción en los costos de este tipo de dispositivos no solo se ve reflejada en los costos de fabricación del dispositivo, sino también en la disminución de costos relacionados a la ejecución de las pruebas en el punto de atención, como puede ser el personal, instalaciones y equipo necesarios [6].

Uno de los aspectos más distintivos de los dispositivos de diagnóstico en el punto de atención es la reducción en el tiempo para obtener un diagnóstico, aportando gran valor no solo para el personal de salud, sino también para los pacientes [6, 48]. En la Figura 5 se muestra un esquema comparando el procedimiento y recursos necesarios para realizar un diagnóstico de manera convencional contrastado con la utilización de pruebas de diagnóstico en el punto de atención para el mismo propósito. Esta evidencia las ventajas de la utilización de este tipo de dispositivos en la reducción de tiempo, personal, costos y tecnología requeridos para obtener un diagnóstico. En la línea superior se muestra la línea de acción convencional, que consiste en el traslado al hospital (A), triaje (B), recolección de la muestra (C), procesamiento de muestras en el laboratorio (D), y obtención de resultados (E) que posteriormente son utilizados para el diagnóstico y para determinar el tratamiento (F). En la línea inferior, el procedimiento utilizando pruebas de diagnóstico comienza con la recolección de la muestra (A), el análisis por medio de estos dispositivos (B) para obtener un resultado (C) de manera más rápida, y luego el diagnóstico y determinación del tratamiento (D) [6].

Figura 5. Representación esquemática de los recursos necesarios para lograr un diagnóstico utilizando el procedimiento convencional comparado con la implementación de pruebas de diagnóstico en el punto de atención



Nota. Adaptado de [6].

Desde su introducción en los sistemas de salud, los dispositivos de diagnóstico en el punto de atención han llamado la atención de investigadores en todo el mundo. Actualmente, sus aplicaciones se han diversificado de manera notable, incluyendo el diagnóstico y detección de diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer [47]. La importancia de la detección de biomarcadores específicos para el monitoreo de la salud fue destacada con la pandemia de COVID-19, donde fue de gran ayuda para el diagnóstico, monitoreo global de la enfermedad y prevención de contagios. Los biosensores colorimétricos jugaron un papel importante, siendo ampliamente utilizados para la fabricación de pruebas rápidas que permitían su lectura a simple vista en el sitio de atención por parte de los usuarios finales [44, 47].

Los dos tipos más comunes de biosensores utilizados para pruebas de diagnóstico en el punto de atención son los electrodos elaborados con impresión serigráfica y ensayos microfluídicos basados en papel [47]. Siendo este un campo en continuo crecimiento, día a día se presentan tecnologías emergentes para la siguiente generación de pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Entre estas destacan las tecnologías basadas en teléfonos celulares, las basadas en papel y las plataformas de laboratorio en un chip [49].

5. Dispositivos analíticos basados en papel

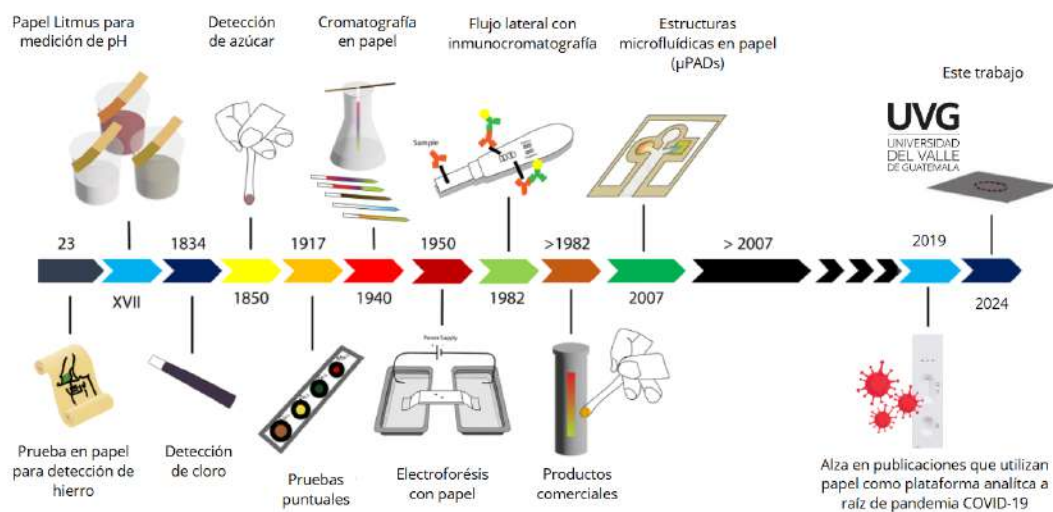
5.1. Papel como una plataforma para biosensores

La utilización de papel como plataforma para dispositivos analíticos ha tenido un desarrollo y crecimiento significativo en la última década [4]. Esto desde la publicación de Martinez et al. [10], más conocido como el reporte del laboratorio del profesor Whiteside, en 2007. En este se reportó la fabricación de un dispositivo basado en la elaboración de patrones con fotorresistente SU-8 2010 en papel filtro, con lo que se logró crear canales y zonas de detección que fueron utilizadas para la detección de glucosa y una proteína por medio de ensayos colorimétricos [10].

El desarrollo de este tipo de dispositivos ha sido impulsado por la gran viabilidad que representa su fabricación, desde la utilización de un material que puede ser adquirido en cualquier lugar, hasta la posibilidad de utilizar una gran variedad de técnicas de fabricación que han demostrado ser simples y rentables en comparación con la fabricación de dispositivos elaborados a base de vidrio u otros polímeros [4, 50]. Entre sus características más relevantes se mencionan las técnicas de fabricación simples, su bajo costo y su compatibilidad biológica [4]. A raíz de esto, este tipo de dispositivos ha sido utilizado para el desarrollo de pruebas de diagnóstico en el punto de atención, ya que cumplen con los criterios ASSURED de la Organización Mundial de la Salud [51]. Logrando disminuir los costos de los ensayos y también su implementación en entornos con recursos limitados, empleando equipo y personal con menor nivel de especialización que las pruebas de laboratorio convencionales [51].

A través de la historia, se ha visto un gran desarrollo en el uso del papel en aplicaciones analíticas (ver Figura 6) [4]. Iniciando en la antigüedad con pruebas para la detección de hierro, y un poco después con el papel Litmus para la medición de pH. También se resalta el desarrollo de la cromatografía en papel en el siglo XIX, la cual ha sido aplicada en diferentes áreas como la medicina y la bioquímica para la separación de moléculas pequeñas, aminoácidos, proteínas, anticuerpos, entre otros [52]. En los últimos años ha crecido el interés en el papel como una plataforma para la detección de moléculas biológicas con el surgimiento de los dispositivos analíticos basados en papel para la detección de una amplia gama de moléculas biológicas. Este tipo de dispositivos mostró un alza significativa en las publicaciones relacionadas a su utilización como plataforma analítica en el año 2019 a raíz de la pandemia de COVID-19, demostrando grandes avances y contribuciones que se han hecho en el campo a través de los años [4].

Figura 6. Línea del tiempo de la utilización del papel como sustrato en aplicaciones analíticas.



Nota. Adaptado de [4].

La elección del papel para la fabricación de este tipo de plataformas por parte de una gran cantidad de investigadores no solo se basa en sus precedentes en el campo de la química analítica. Su disponibilidad a nivel mundial, su bajo costo y su facilidad de almacenar y transportar son otros factores que han permitido su amplia aceptación en este campo. Sus propiedades también influyen en gran medida, entre estas se puede mencionar su luminosidad, biocompatibilidad, flexibilidad, y estructura porosa que permite el almacenamiento y flujo de muestras biológicas a través y dentro de estos dispositivos por fuerzas capilares [4, 9, 16].

El desarrollo de los dispositivos analíticos basados en papel se basa en tres aspectos: la selección del papel, la selección de la técnica de fabricación y la selección de la estrategia de detección [51]. En cuanto a la selección del tipo de papel, estos poseen diferentes propiedades y características. Entre estas se puede mencionar su composición, tamaño de los poros, área superficial, porosidad y grosor [4]. El papel de filtro y el papel de cromatografía han sido los dos tipos de papel más utilizados para la fabricación de dispositivos analíticos basados en papel. Sin embargo, también se ha explorado la utilización de otros tipos de papel comerciales y otros no convencionales que son modificados para mostrar las características necesarias para aplicaciones específicas [13]. En cuanto a las técnicas de fabricación existe una gran variedad para los dispositivos analíticos basados en papel. Esto se debe principalmente a la amplia gama de aplicaciones que han surgido para este tipo de dispositivos. Lo que ha hecho necesario el desarrollo de técnicas cada vez más flexibles, asequibles y simples de ejecutar [51]. Finalmente, las técnicas de detección utilizadas varían dependiendo de la aplicación final, el nivel de especialización del usuario y el entorno en el que se utilizará. Un aspecto que resalta es la simplicidad que presentan algunos de estos dispositivos al no utilizar equipos ni instrumentos especializados para su lectura. Entre todas las técnicas disponibles, la colorimetría es la técnica analítica más utilizada en estos dispositivos [4, 19].

5.2. Métodos de fabricación para dispositivos analíticos basados en papel

En las últimas décadas, el crecimiento del campo de desarrollo de dispositivos analíticos basados en papel ha resultado en la existencia de una gran variedad de técnicas de fabricación. Dichas técnicas tienen como objetivo la definición de áreas o canales hidrofílicos en el papel rodeados por barreras hidrofóbicas. Estas se dividen en dos categorías: la elaboración de patrones de barreras hidrofóbicas en la superficie del papel, y el modelaje o corte del papel para la definición de canales y áreas de detección [18, 50, 53-55].

En cuanto a los materiales empleados para la creación de áreas hidrofóbicas en la superficie del papel, se pueden mencionar los materiales fotorresistentes como SU-8, reportada por Martínez et al. en 2007 para la elaboración del primer dispositivo analítico basado en papel que se ha publicado [10]. Sin embargo, dicha técnica requiere de solventes orgánicos, materiales fotorresistentes costosos y equipo especializado [56]. Debido a esto, en los últimos años se ha ampliado la variedad de materiales utilizados para la fabricación de este tipo de dispositivos, entre los que se puede mencionar el polidimetilsiloxano (PDMS), cera, tinta indeleble, tinta curable con luz UV, entre otros [54].

Las técnicas de fabricación existentes también pueden ser clasificadas según el tipo de unión de los materiales hidrofóbicos al papel. Entre estas existen las técnicas de fabricación que bloquean de manera física los poros del papel, las que depositan los materiales hidrofóbicos en la superficie del papel, y las que realizan modificaciones químicas en el papel utilizando agentes que reaccionan con la celulosa, que es el componente principal del papel [53]. Hasta ahora, se ha reportado una amplia gama de técnicas de fabricación que han sido utilizadas para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel. Entre estas se puede mencionar la impresión con cera, impresión con inyección de tinta, fotolitografía, impresión flexográfica, tratamiento con plasma, tratamiento con láser, grabado húmedo, serigrafía, patronaje con cera, estampado, grabado en relieve, además de algunas variaciones de estas técnicas [18, 54, 57].

5.3. Métodos de fabricación de patronaje con cera para dispositivos analíticos basados en papel

Actualmente, existe una amplia variedad de materiales de soporte, métodos de fabricación, métodos de detección y una aún más amplia gama de aplicaciones para los dispositivos analíticos basados en papel [50]. Sin embargo, algunas técnicas de fabricación requieren de personal capacitado, equipos y laboratorios especializados que suponen gastos significativos para su ejecución [56]. A raíz de esto, se ha dado lugar al desarrollo de técnicas de fabricación que utilizan materiales mucho más asequibles y que se encuentran disponibles en todo el mundo, siendo la cera uno de los más estudiados y utilizados hoy en día [50].

La cera es un material hidrofóbico, insoluble en agua, con baja viscosidad cuando es derretido y maleable a temperatura ambiente [58]. La utilización de este material para la fabricación de dispositivos analíticos basados en papel ha demostrado tener costos más reducidos y mayor simplicidad al compararse con otras técnicas de patronaje en papel como el uso de materiales fotorresistentes y PDMS [58]. Una de las principales ventajas de la cera es que puede ser aplicada utilizando diferentes técnicas y es fácil de fundir con calor de manera que impregna el papel creando barreras hidrofóbicas en su superficie [55].

El primer reporte que existe en relación con las técnicas de patronaje con cera se atribuye a Muller y Clegg en el año 1949, que consistió en la creación de un patrón con parafina en papel de filtro [52]. El patrón fue creado al presionar un troquel calentado sobre una hoja de papel de filtro apilada con una hoja de papel parafinado, de manera que al derretir la parafina esta se transfería al papel de filtro dejando el patrón del troquel [52]. Con la transferencia de la parafina al papel se logró la creación de barreras hidrofóbicas para la contención de muestras en el papel. La formación de dichas barreras se convirtió en el fundamento principal para el desarrollo de la gran variedad de técnicas de fabricación de patronaje con cera que existen hoy en día [50].

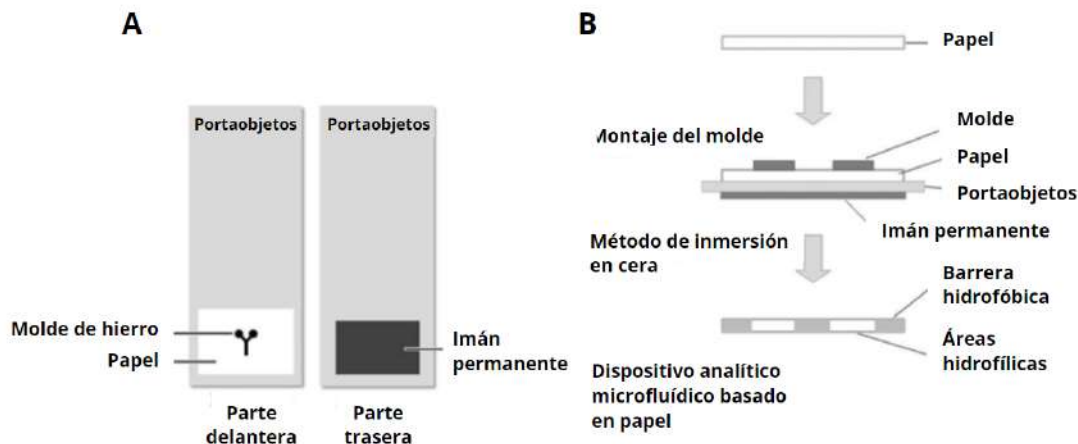
Gracias a la simplicidad del proceso, este método es reconocido por ser rápido, asequible, robusto, fácil de controlar y adaptable para la producción en masa de este tipo de dispositivos [18, 57, 58]. Dichas características hacen evidente el potencial que ofrece esta técnica para la fabricación de pruebas de diagnóstico en el punto de atención, ya que cumplen fácilmente con los criterios ASSURED de la Organización Mundial de la Salud [18, 58]. El proceso de fabricación utilizando técnicas de patronaje con cera puede llegar a ser tan simple al punto que puede ser realizado en casa utilizando un crayón de cera, y también puede ser utilizado para la producción en masa de dispositivos basados en papel al utilizar impresoras de cera especializadas [58]. En los últimos años se han establecido técnicas de patronaje con cera que requieren de equipo menos especializado haciéndolas más accesibles y fáciles de implementar en entornos con recursos limitados [18], entre estas se pueden mencionar la permeación con cera [58] y la inmersión en cera [17].

5.4. Inmersión en cera

El método de inmersión en cera está clasificado dentro de las técnicas de fabricación de patronaje con cera para dispositivos analíticos basados en papel. Este se basa en la inmersión de papel en recipientes con cera fundida, y la utilización de un molde de hierro para proteger las áreas del papel que servirán como zonas de detección [17, 18, 59]. De esta manera, al sumergir el papel en la cera fundida, esta penetra la membrana de las áreas que no están protegidas por los moldes de hierro [17, 59]. Como resultado final, se obtiene un patrón con áreas hidrofílicas delimitadas por barreras hidrofóbicas, haciendo que el dispositivo final sea capaz de retener fluidos en las zonas hidrofílicas, por lo que estas áreas pueden ser utilizadas para dar lugar a reacciones que permiten la detección de analitos en una muestra [17].

En la Figura 7 se detalla el procedimiento para el ensamblaje del sistema utilizado para la ejecución de la técnica de inmersión en cera. Para ello, el papel se coloca sobre una lámina de vidrio (portaobjetos) y el molde de hierro es colocado por encima del papel, este es sostenido por medio de la fuerza magnética del imán permanente que es colocado por detrás de la lámina de vidrio. Una vez armado el sistema, este es sumergido en cera derretida [17].

Figura 7. Procedimiento para el patronaje con cera utilizando la técnica de inmersión en cera



Nota. (A) Vista superior y (B) vista lateral. Adaptado de [17].

Esta técnica utiliza materiales y equipo de bajo costo y que están disponibles alrededor del mundo, entre estos se puede mencionar la cera, un plato caliente, un molde de hierro y un imán permanente [17, 60]. Gracias a esto, el método resulta ser de bajo costo y también es amigable con el medio ambiente debido a que la mayor parte de los materiales son utilizados para la elaboración de más de un dispositivo, como es el caso de los moldes de hierro, los imanes permanentes y los portaobjetos [17]. Estas características otorgan gran relevancia a esta técnica para su implementación en entornos con recursos limitados para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel.

El procedimiento para su ejecución es reconocido por ser rápido y simple. Este se encuentra conformado por un solo paso, mientras que otras técnicas de fabricación de patronaje con cera requieren de la impresión de la cera y posteriormente de su calentamiento [17, 61]. En comparación con otros métodos de fabricación de dispositivos analíticos basados en papel como la fotolitografía, este método también demuestra ser más rápido, ya que generalmente requiere de menos de un minuto para su ejecución [17].

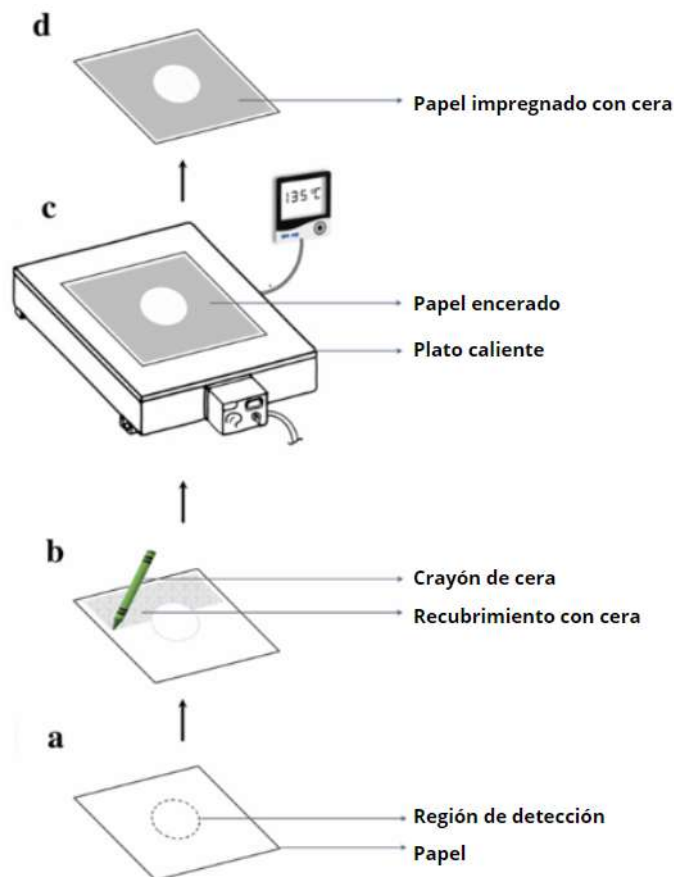
Finalmente, se debe resaltar que otra de sus ventajas es que no utiliza ningún solvente o compuesto químico. Gracias a ello, el área de detección hidrofílica no es expuesta a este tipo de compuestos y sus propiedades y composición no son alteradas [17, 61]. Los dispositivos fabricados con este tipo de técnicas son utilizados comúnmente para la elaboración de ensayos colorimétricos que permiten detectar una gran variedad de marcadores biológicos, entre los que se puede mencionar la glucosa y algunas proteínas [17].

5.5. Permeación con cera

La utilización del método de permeación con cera para la fabricación de dispositivos analíticos basados en papel fue reportada por Lu et al. en 2009 [58]. En esta publicación se reportaron varios avances para la fabricación de este tipo de dispositivos. Entre estos se mencionaba una técnica que consistía en la elaboración de patrones utilizando un crayón de cera en una hoja de papel, para luego calentarlo, logrando así la formación de barreras hidrofóbicas en la superficie del papel [18, 58].

En la Figura 8 se detalla el procedimiento para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de permeación con cera [62]. Primero, se debe marcar el patrón deseado para la zona de detección. Luego se utiliza un crayón de cera para cubrir los dos lados del papel en las áreas fuera de dicha zona. Posteriormente, el dispositivo se calienta utilizando un plato caliente o un horno para obtener como resultado una región hidrofílica rodeada por barreras hidrofóbicas [58, 62].

Figura 8. Procedimiento para la fabricación de un dispositivo analítico basado en papel utilizando la técnica de permeación con cera



Nota. Adaptado de [62].

El funcionamiento de este método, al igual que el de otros métodos de fabricación de patronaje con cera para dispositivos analíticos basados en papel, se basan en los principios de permeación con cera. Donde al momento de calentar la cera, esta se funde e impregna todo el grosor del papel [62]. La cera forma una barrera hidrofóbica en el papel, permitiendo la retención de muestras dentro de las zonas delimitadas por las barreras de cera [58].

El proceso es bastante simple y rápido, ya que solo requiere dos pasos, los cuales son depositar la cera y luego calentarla [58]. El proceso generalmente toma de 5 a 10 minutos [58]. Al igual que otras técnicas de patronaje con cera, esta puede ser ejecutada fuera de un cuarto limpio, en entornos con bajos recursos e incluso en casa, haciéndola bastante prometedora para la fabricación de dispositivos para pruebas diagnósticas en el punto de atención [58]. Los materiales utilizados para la ejecución de esta técnica son fáciles de adquirir en cualquier lugar alrededor del mundo y no son costosos, entre estos menciona un crayón de cera y equipo para calentamiento que puede ser un plato caliente o un horno [58].

Al comparar los resultados finales para los dispositivos analíticos basados en papel elaborados con esta técnica con los fabricados con otras técnicas como es la fotolitografía, se puede observar que la resolución de los patrones no es tan alta [57]. Sin embargo, varios investigadores han concordado en que son lo suficientemente adecuados para la mayoría de las aplicaciones pensadas para este tipo de dispositivos [57]. Esta limitación se debe principalmente a que cuando la cera impregna el papel el proceso ocurre tanto vertical como horizontalmente, la impregnación vertical atraviesa todo el grosor del papel, pero al mismo tiempo la horizontal altera la forma y definición de las barreras creadas con la cera [57].

Los dispositivos analíticos basados en papel elaborados utilizando esta técnica se han utilizado para la realización de pruebas biológicas. Esto se ha logrado al agregar diferentes reactivos en el área de detección, de manera que cuando se coloca una muestra es posible detectar la presencia de alguna molécula biológica [58]. Gracias a su versatilidad, estos dispositivos han sido utilizados en una gran variedad de aplicaciones, entre estas se puede mencionar la detección de marcadores biológicos en el campo de la salud como la glucosa y algunas proteínas [58], y la detección de almidón en la leche en el campo de la seguridad alimentaria [62].

6. Biosensores basados en papel para detección de glucosa

Debido a que la diabetes es una enfermedad de gran prevalencia en todo el mundo, se ha dado lugar al desarrollo de una gran variedad de tecnologías para la medición de los niveles de glucosa, entre los que se pueden mencionar los dispositivos analíticos basados en papel [20, 63]. La importancia de estos dispositivos radica en que la determinación de los niveles de glucosa es clave para poder tratar y regular los niveles de glucosa en pacientes con diabetes, y así disminuir las complicaciones, permitiendo que los pacientes tengan una mejor calidad de vida [63]. Con la implementación del papel como plataforma para la elaboración de biosensores de glucosa, se espera lograr el desarrollo de dispositivos de medición portátiles, no invasivos, estables, precisos, y de bajo costo. Esto de manera que sean más asequibles para los pacientes con diabetes en entornos con recursos limitados en comparación con los sistemas de medición convencionales para glucosa existentes actualmente [20].

El papel ha sido presentado como material para la fabricación de biosensores de glucosa gracias a que permite reducir los costos y simplificar los procesos de fabricación para estos dispositivos. Esto ha impulsado el crecimiento del campo del desarrollo de los dispositivos basados en papel en los últimos años [64]. Al comparar estos dispositivos con los sensores de glucosa elaborados a base de cerámica y polímeros, estos poseen grandes ventajas debido a la flexibilidad, adaptabilidad, y a la capacidad de poder modificar el papel para que en ciertas regiones sea hidrofóbico en lugar de hidrofílico [64].

Los dispositivos analíticos basados en papel han sido combinados con una amplia gama de técnicas de detección, siendo la detección colorimétrica y electroquímica las más sobresalientes [20]. Aunque los ensayos electroquímicos son conocidos por tener una mayor precisión [20], la detección colorimétrica es la más utilizada debido a que hace más fácil la interpretación de los resultados sin la necesidad de utilizar dispositivos sofisticados para la medición de la señal de salida, ya que se pueden observar a simple vista [43]. En el Cuadro 1 se hace una comparación de las técnicas de detección colorimétrica y electroquímica en dispositivos analíticos basados en papel. Dichas técnicas se han vuelto esenciales en la implementación de pruebas de diagnóstico para la medición de niveles de glucosa que deben ser rápidas y provechosas para los sistemas de salud en todo el mundo, resaltando el alto potencial para su implementación en países en vías de desarrollo [20].

Cuadro 1. Comparación de técnicas de detección colorimétrica y electroquímica para los dispositivos analíticos basados en papel

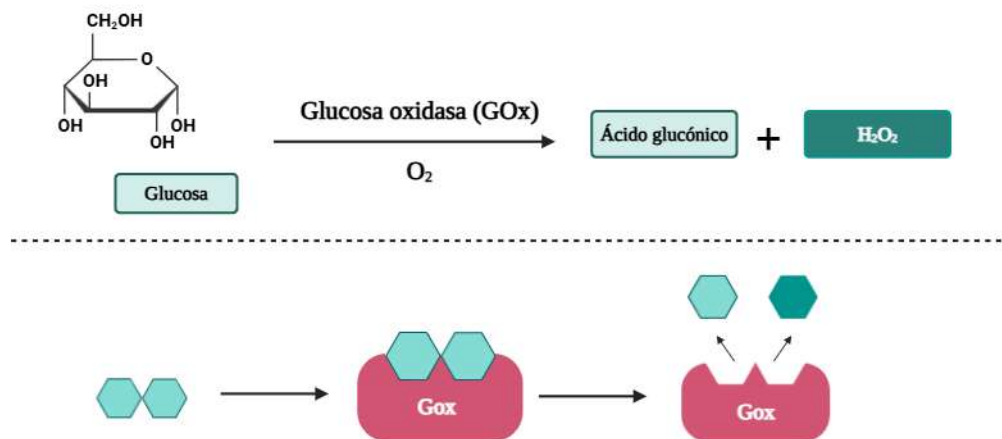
Técnica de detección	Ventajas	Desventajas
Detección colorimétrica	<ul style="list-style-type: none"> -Más comúnmente utilizada en combinación con dispositivos analíticos basados en papel. -Lectura de resultados a simple vista. -Bajo costo de fabricación. -Simplicidad. -Estabilidad. -No requiere de personal especializado para su utilización. -Portabilidad -Rapidez para obtener resultados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor sensibilidad en comparación con detección electroquímica. - Necesidad de implementación de técnicas para mejorar la uniformidad del color.
Detección electroquímica	<ul style="list-style-type: none"> - Alta sensibilidad. - Alta selectividad. - Rapidez para obtener resultados. - Fácil modificación de electrodos utilizando químicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se requiere de herramientas para la medición electroquímica de los resultados. - Bajo costo, pero aún más elevado que la detección colorimétrica. - Requiere de un nivel más técnico de conocimientos para su utilización.

Nota. Adaptado de [20, 43].

Las enzimas son catalizadores biológicos que se encargan de producir una reacción química que en la mayor parte de los casos consiste en la transformación de un sustrato específico en otros productos, esto sin ser consumida durante la reacción y sin ser parte de los productos [64]. Una de sus propiedades más importantes es la especificidad para reaccionar únicamente ante sustancias determinadas para cada enzima, conocidas como sustratos [64, 65]. Debido a esto, las enzimas son ampliamente utilizadas en los biosensores y permiten la detección de una gran variedad de analitos, entre los que se pueden mencionar la glucosa, el lactato y el ácido úrico [66].

En el caso de la detección de la glucosa, la enzima glucosa oxidasa (GOx) es la elegida por excelencia y la más utilizada en el ámbito clínico [63, 65]. La GOx se caracteriza por su especificidad para unirse a moléculas de glucosa para convertirlas en ácido glucónico y liberar peróxido de hidrógeno en presencia de dioxígeno (ver Figura 9) [9, 67]. Además, es preferida al ser fácil de obtener, no es costosa, y es bastante estable, por lo que soporta niveles extremos de pH y temperatura que la mayoría de las demás enzimas no son capaces de soportar [63].

Figura 9. Conversión de glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por medio de la enzima GOx en presencia de dioxígeno



Nota. Figura creada con BioRender.com. Adaptado de [67].

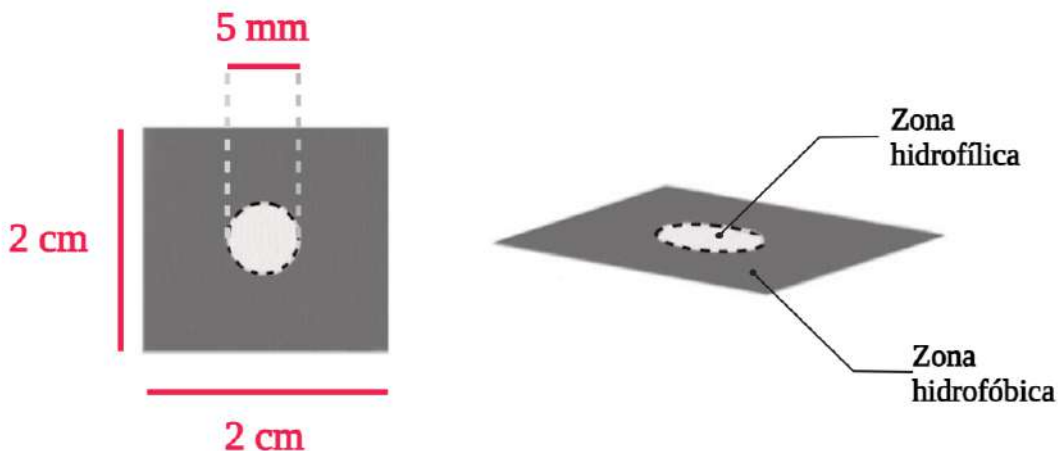
Los productos obtenidos a partir de la reacción no tienen color, por lo que se hace necesario agregar agentes o moléculas capaces de mostrar un cambio de color que permita la interpretación colorimétrica de los resultados, para esto son utilizados los indicadores redox e indicadores de pH [19]. Gracias a la generación de color a partir de la reacción se puede determinar si el analito está presente o no en la muestra a simple vista. También se puede cuantificar la salida al comparar la intensidad del color obtenido con diferentes muestras con la intensidad de concentraciones conocidas de glucosa utilizando curvas de calibración [9, 19].

1. Fabricación y optimización de prototipos

1.1. Fabricar prototipos utilizando la técnica de inmersión en cera en diferentes tipos de papel

El proceso de fabricación de dispositivos con la técnica de inmersión en cera se realizó utilizando tres tipos diferentes de papel: círculos cualitativos de 70 mm de diámetro de papel de filtro Whatman® grado 1 (Sigma-Aldrich, Massachusetts, Estados Unidos), círculos cualitativos de 70 mm de diámetro de papel de filtro Whatman® grado 4 (Sigma-Aldrich®, Massachusetts, Estados Unidos) y papel de cromatografía (proporcionado por el Departamento de Bioquímica de la Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Guatemala). También se utilizó cera de parafina (Green Depot, Guatemala, Guatemala) a tres diferentes temperaturas (120 °C, 125 °C y 130 °C). Para estos se propusieron dimensiones de 2 cm x 2 cm para el prototipo completo, con una zona de detección hidrofílica en forma circular con un diámetro de 5 mm. En la Figura 10 se puede observar el diseño y dimensiones de los dispositivos a fabricar en el presente trabajo.

Figura 10. Representación de las dimensiones y diseño del dispositivo

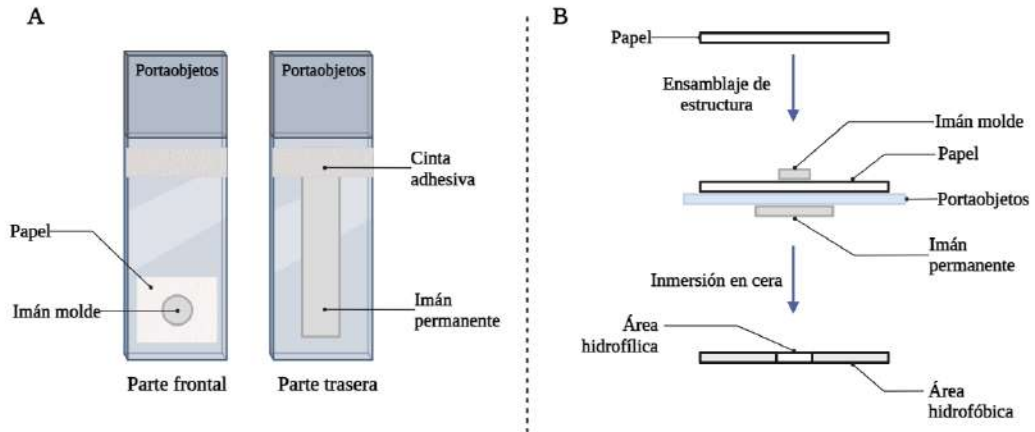


Nota. Figura creada con BioRender.com.

Como primer paso para la fabricación de dispositivos se derritió la cera de parafina colocándola dentro de un beaker de 400 mL (DWK Life Sciences, Wertheim, Alemania) sobre el plato cerámico de un calentador magnético con calefacción y placa calefactora de vitrocerámica IKA (C-MAG HS 7, Wilmington, Estados Unidos). Para monitorear la temperatura alcanzada por la cera durante el calentamiento se utilizó un termómetro de mercurio de inmersión total con rango de temperatura de 0 °C a 150 °C (VWR, Pensilvania, Estados Unidos).

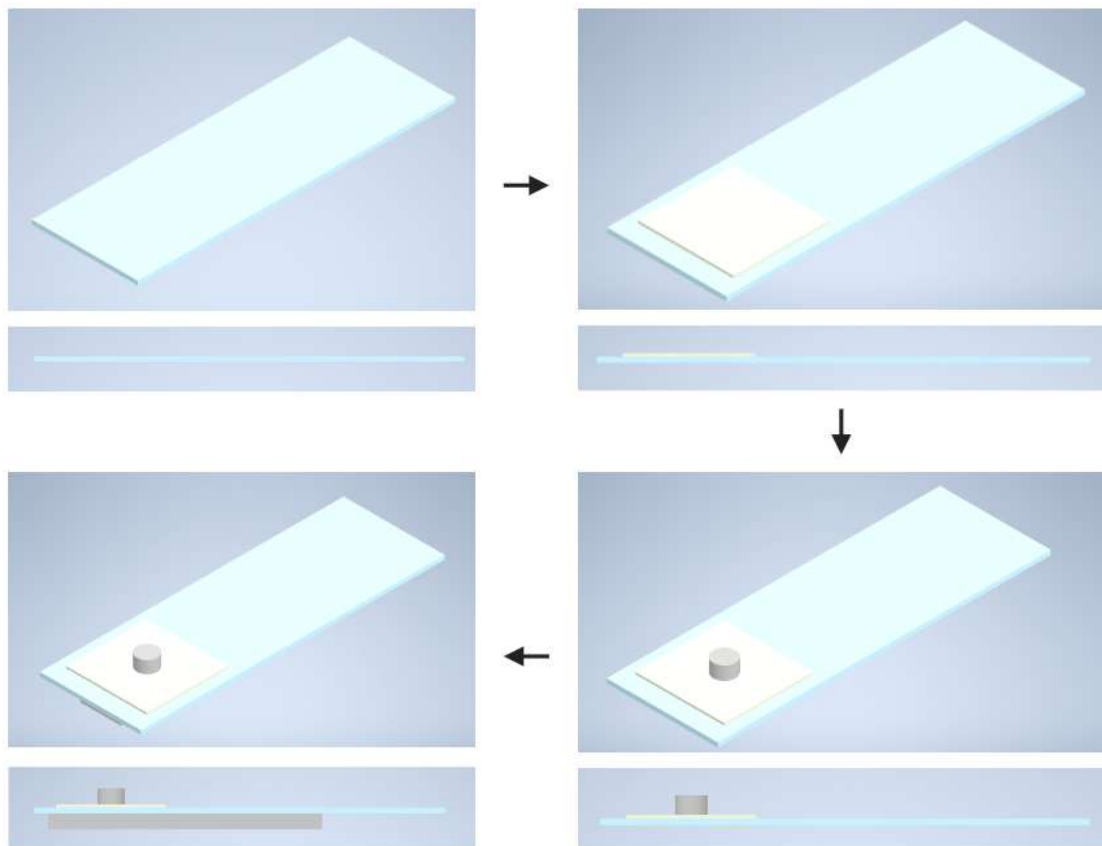
El papel se cortó en piezas de 2 cm x 2 cm. Una vez cortadas, las piezas de papel se colocaron sobre un portaobjetos Premiere de 25 mm x 75 mm (C&A Scientific, Virginia, Estados Unidos) que sirvió como soporte para la estructura. Luego, se colocó un imán circular de 5 mm de diámetro con un grosor de 3 mm (Grtard, China) sobre el papel y se ubicó el imán permanente en forma de barra con dimensiones de 50 mm x 10mm x 3 mm (Wukong, China) por la parte de atrás del portaobjetos para asegurarlo. Finalmente, se utilizó un trozo de cinta adhesiva para asegurar el imán permanente al portaobjetos. En la Figura 11A se puede observar el esquemático de la estructura armada en vista frontal y trasera, mientras que en la Figura 11B se observa la estructura en vista lateral y el resultado que se obtiene luego de sumergirla en cera. En la Figura 12 se puede observar el procedimiento a seguir para el ensamble de la estructura.

Figura 11. (A) Esquemático de estructura armada para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de inmersión en cera en vista frontal y trasera. (B) Procedimiento para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de inmersión en cera en vista lateral



Nota. Figura creada con BioRender.com. Adaptado de [17].

Figura 12. Procedimiento para el ensamble de la estructura empleada para la elaboración de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de inmersión en cera.



Una vez armada la estructura, esta se sumergió por 1 segundo en el beaker que contenía la cera derretida, para luego dejarla secar a temperatura ambiente. Cuando la estructura completa se enfrió, se procedió a retirar la cinta adhesiva y el imán permanente, luego se retiró el imán circular y finalmente el dispositivo resultante fue despegado del portaobjetos.

1.2. Diseñar y fabricar herramientas necesarias para ejecutar las técnicas de fabricación

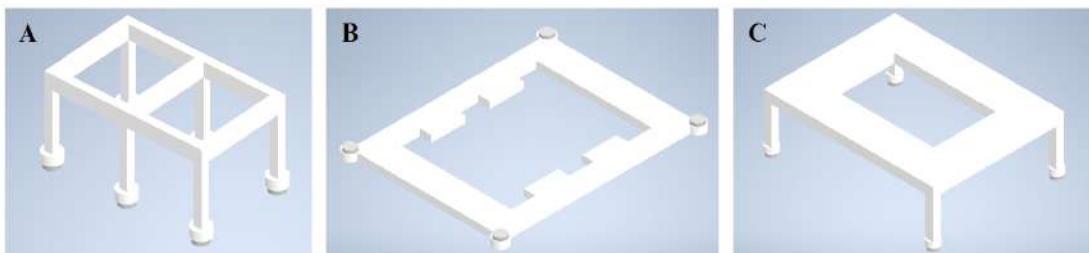
Para la técnica de inmersión en cera se propuso una variación para la fabricación de los dispositivos. Esta consistió en la fabricación de un mecanismo que permitió la elaboración de seis prototipos, con la misma forma y dimensiones que los obtenidos con la técnica original, en una sola inmersión. Para el diseño del mecanismo se utilizó Inventor Autodesk Professional 2023 (Autodesk, California, Estados Unidos) y este fue impreso en 3D con ácido poliláctico (PLA) (PLA+, E Sun, Shenzhen, China) utilizando la impresora 3D Prusa (i3 MK3S+, Prusa research, Praga, República Checa).

El mecanismo consiste en las siguientes partes:

- Un soporte para los 6 imanes molde circulares (Figura 13A).
- Una pieza para mantener separados los imanes permanentes rectangulares (Figura 13B).
- Una pieza que permite fijar el soporte de los imanes molde circulares al separador de los imanes permanentes mientras se realiza la inmersión (Figura 13C).

Una vez impreso, se fijaron los imanes molde circulares a su soporte y se utilizaron imanes circulares para fijar el soporte de los imanes molde con el separador de los imanes permanentes (ver Figura 13). Para la colocación de los imanes circulares se aseguró que las polaridades tuvieran la misma orientación. En cuanto a los imanes del separador y la pieza de fijación, las polaridades de los imanes en una pieza debían ser opuestas a las de la otra para que existiera atracción magnética y las piezas pudieran mantenerse aseguradas.

Figura 13. *Partes del mecanismo para la fabricación de seis dispositivos analíticos basados en papel en una sola inmersión.*



Para la fabricación de los dispositivos utilizando esta variación se comenzó colocando los imanes permanentes en su separador, prestando especial atención a la orientación de los imanes para que su polaridad fuera opuesta a la de los imanes molde circulares. Luego, se colocaron dos portaobjetos con orientación horizontal sobre los imanes permanentes. Sobre los portaobjetos se colocaron los 6 cuadros de 2 cm x 2 cm del tipo de papel a utilizar. Finalmente, se colocó el soporte con los imanes molde en la pieza de fijación para asegurarlos con el separador de los imanes permanentes (ver flujo de trabajo en Figura 14 y mecanismo armado con vista isométrica en Figura 15A y vista lateral en Figura 15B).

Figura 14. Procedimiento para el ensamble del mecanismo utilizado para la elaboración de seis dispositivos analíticos basados en papel en una sola inmersión.

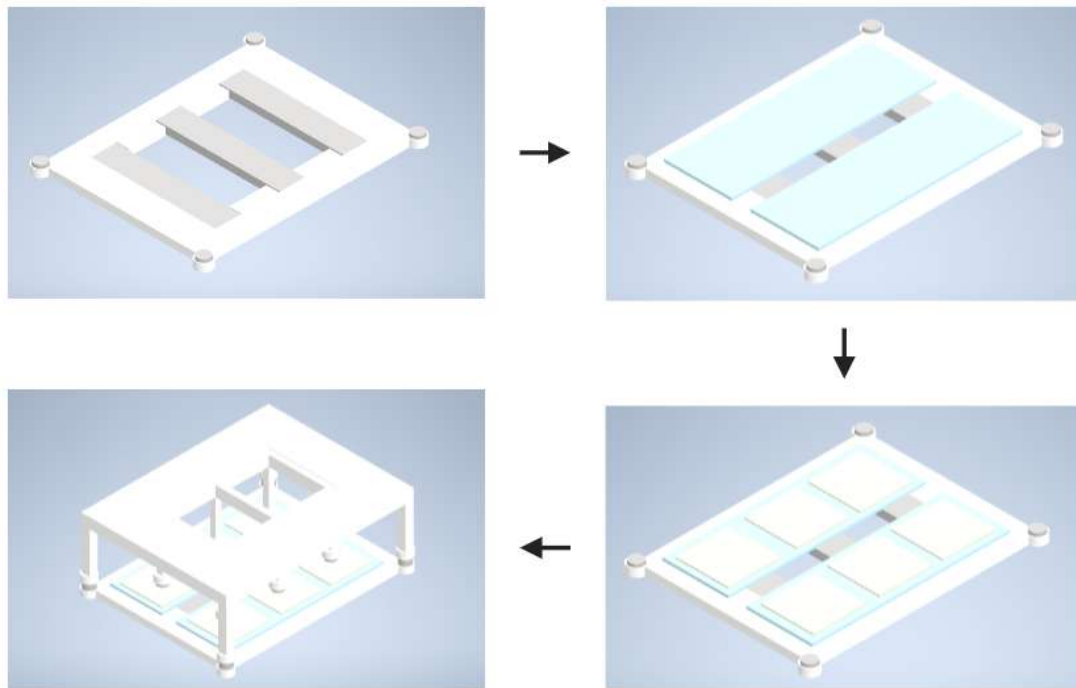
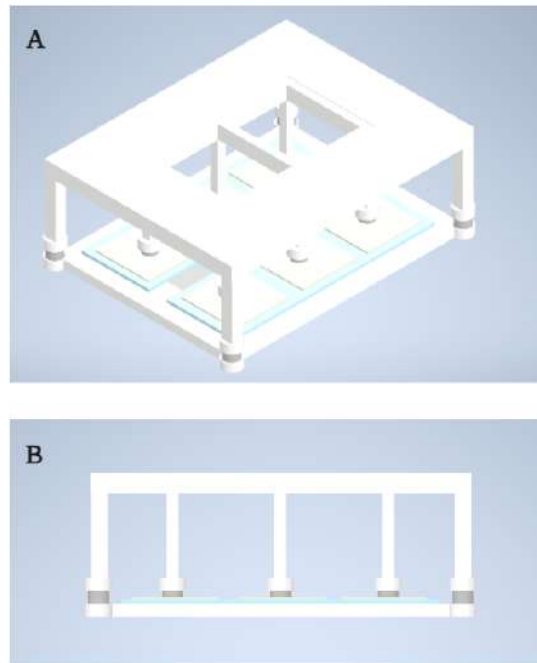


Figura 15. *Mecanismo armado para la fabricación de seis dispositivos analíticos basados en papel en una sola inmersión*



Nota. (A) Vista isométrica y (B) vista lateral.

Una vez armado, el mecanismo fue sumergido en cera de parafina derretida utilizando los tres diferentes tipos de papel a las mismas tres temperaturas utilizadas con el método original. La cera de parafina se calentó a una temperatura de 5°C por encima de la temperatura de inmersión. Al alcanzar dicha temperatura el recipiente con la cera se retiró del calentador magnético y se colocó en una superficie cerámica, donde se monitoreó su enfriamiento con la ayuda del termómetro. Al alcanzar la temperatura deseada, el mecanismo se sumergió en la cera de parafina durante 1 segundo. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente para finalmente poder desmontarlo.

1.3. Fabricar prototipos utilizando la técnica de permeación con cera en diferentes tipos de papel

Para la fabricación de prototipos con esta técnica se utilizaron los tres tipos diferentes de papel. La cera de parafina se derritió en el beaker utilizando el calentador magnético, para luego colocarla en un molde en forma de crayón (diseño obtenido de [68]) fabricado por medio de impresión 3D con PLA. Luego de que se enfriara, el crayón de cera de parafina fue retirado del molde (ver Figura 16).

Figura 16. *Crayón de cera de parafina elaborado para la fabricación de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de permeación con cera.*



Para los dispositivos fabricados con esta técnica se propuso el mismo diseño que para los fabricados con la técnica de inmersión en cera. Para su elaboración se comenzó utilizando un lápiz para marcar el papel con el diseño de la zona de detección, la cual correspondía a un círculo con diámetro de 5 mm. Luego, se utilizó el crayón elaborado con cera de parafina para cubrir con cera el área fuera del círculo marcado en el papel. Una vez cubierta toda el área que se encontraba fuera de la marca, el dispositivo se colocó sobre el calentador magnético a temperaturas de 120°C y 60°C por 5 segundos. Luego, los prototipos se retiraron del calentador y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (ver procedimiento en Figura 17).

Figura 17. Procedimiento para la fabricación de dispositivos analíticos basados en papel utilizando la técnica de permeación con cera



Nota. Figura creada con BioRender.com. Adaptada de [62].

2. Comparación de la formación de áreas hidrofóbicas

2.1. Comparar la formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de aplicación de la muestra en los prototipos fabricados para la selección del prototipo final

Para la evaluación de la precisión con que se formó el área hidrofóbica en las variaciones de temperatura, tipo de papel y técnicas de fabricación para los prototipos fabricados, se utilizó colorante alimenticio (Castilla, Guatemala, Guatemala). Este permitió evaluar la capacidad del área hidrofóbica para contener muestras dentro del área de detección de los dispositivos. Para ello se depositó 1 μ L de colorante alimenticio en la zona de detección de los dispositivos fabricados con papel de filtro grado 1 y grado 4, y 2 μ L para los fabricados con papel de cromatografía utilizando una pipeta (Eppendorf Research®), Eppendorf, Alemania). Se utilizó el microscopio Optika (SZ-STL1, Ponteranica, Italia) (magnificación X1) y el microscopio Motic (AE31E, Speed Fair Co., Ltd, Hong Kong) (magnificación x4) para obtener imágenes de los dispositivos. El flujo de trabajo para este procedimiento se ilustra en la Figura 18.

Figura 18. Colocación de colorante alimenticio en zona de detección para la evaluación de formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de aplicación de la muestra en los prototipos fabricados



Nota. Figura creada con BioRender.com.

Se utilizó el software ImageJ (versión 1.54g, National Institutes of Health, Maryland, Estado Unidos) para obtener una medición del área impregnada por el colorante en las diferentes variaciones de prototipos. Luego, se hizo una comparación de las mediciones obtenidas. Para cada variación de los prototipos se obtuvo el promedio y desviación estándar del área de detección para tres repeticiones independientes. Finalmente, se compararon los promedios y desviaciones estándar para elegir el prototipo final, buscando un grupo de prototipos que lograra tener un promedio de áreas lo más cercano al área de detección deseada (círculo de 5 mm de diámetro), y con la menor desviación estándar posible para asegurar la reproducibilidad para la fabricación de los dispositivos.

3. Evaluación del prototipo final para su posible implementación como biosensor

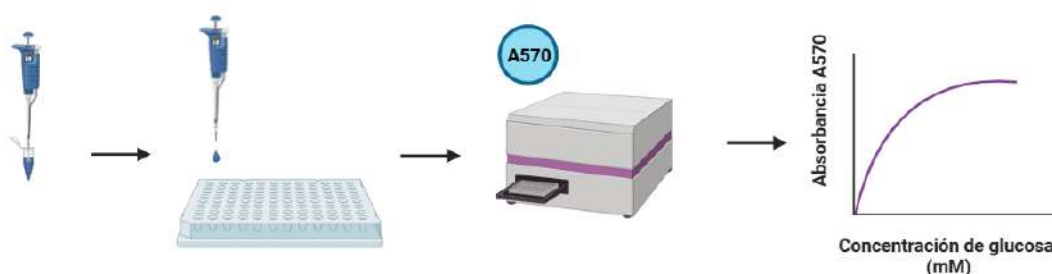
Para evaluar la posible utilización de los prototipos de dispositivos analíticos basados en papel como biosensores primero se llevó a cabo una confirmación de la efectividad de la reacción en solución. Todos los reactivos fueron diluidos en agua destilada, a excepción de la GOx, que fue diluida utilizando salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (Merck, Darmstadt, Alemania).

El estudio en solución se realizó empleando tubos Eppendorf de 1.5 mL (Eppendorf Research®), Eppendorf, Alemania), donde se evaluaron los cambios en los resultados colorimétricos de la reacción a partir de la manipulación de la concentración de los diferentes reactivos y tiempos de incubación. Para la reacción final, se utilizó glucosa D-(+)-Glucosa (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) en diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 mM). Estas se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos junto con 2.42 U/mL de la enzima GOx de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). Luego, se agregó 14.5 mM de yoduro de potasio (KI) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) y 3.23 mg/mL de almidón de papa (Especias Superb, Guatemala, Guatemala). Una vez introducidos todos los reactivos, se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Para demostrar la viabilidad de la reacción colorimétrica inducida por el tratamiento de glucosa con la enzima GOx, KI y almidón se realizó una serie de pruebas de control. Se utilizaron 4 mezclas diferentes: (1) 5 mM de glucosa, 2.42 U/mL de GOx, y 14.5 mM de KI (2) 5 mM de glucosa, 2.42 U/mL de GOx y 3.23 mg/mL de almidón (3) 14.5 mM de KI y 3.23 mg/mL de almidón (4) 5 mM de glucosa, 2.42 U/mL de GOx, 14.5 mM de KI y 3.23 mg/mL de almidón. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos, para cada una se elaboraron triplicados y se estudió la formación de color.

Para evaluar la capacidad de la reacción final para detectar diferentes concentraciones de glucosa, se realizó una serie de pruebas, variando la concentración de glucosa en las soluciones (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 mM). Posteriormente, se colocaron triplicados para cada concentración de glucosa estudiada en un plato de 96 pozos. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando el lector de microplacas Biotek (ELx800, Vermont, Estados Unidos). Las lecturas obtenidas para la absorbancia de las reacciones para la detección de diferentes concentraciones de glucosa fueron graficadas como función de la concentración de glucosa para crear la curva de calibración y evaluar la capacidad de la reacción para la detección colorimétrica de glucosa. El flujo de trabajo para este procedimiento se ilustra en la Figura 19.

Figura 19. Procedimiento del estudio de la reacción para la detección de glucosa utilizando el complejo yodo-almidón en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima GOx en solución

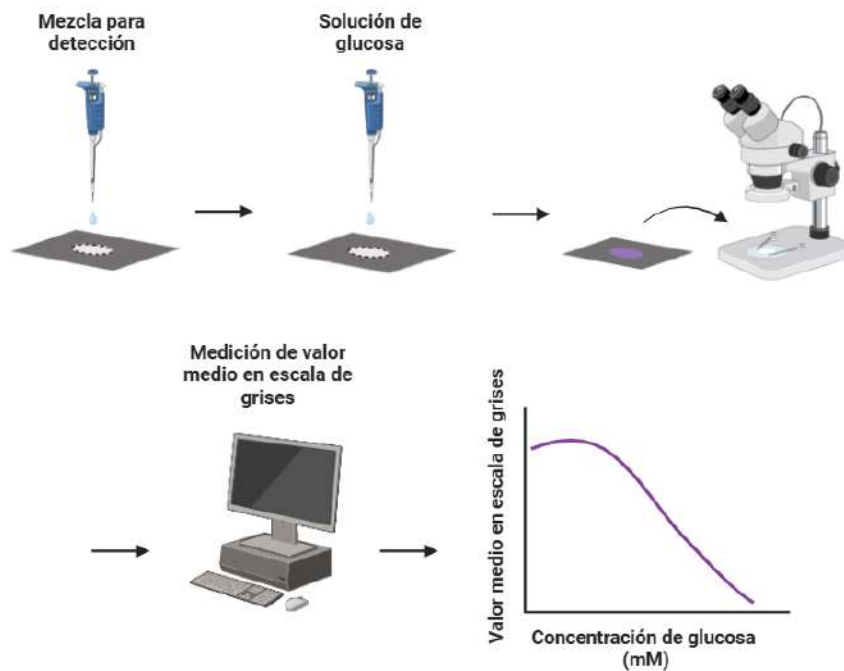


Nota. Figura creada con BioRender.com.

Una vez confirmado el funcionamiento de la reacción para la detección de diferentes concentraciones de glucosa en solución, se procedió a estudiar el comportamiento de la reacción en el prototipo final de papel. Para ello, se funcionalizó la superficie del área de detección depositando 7.5 μ L de una mezcla de 2.42 U/mL de la enzima GOx, 14.5 mM de KI y 3.23 mg/mL de almidón. Esta se dejó secar a temperatura ambiente por 90 segundos. Posteriormente, 2.5 μ L de las soluciones de glucosa en agua destilada (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mM) fueron colocados en el área de detección y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos.

Para el análisis de los resultados colorimétricos en el papel se tomó una imagen de la zona de detección de los prototipos utilizando el microscopio (magnificación x1). Estas fueron analizadas utilizando el software ImageJ para obtener el valor promedio en escala de grises del color obtenido en la zona de detección como resultado de la reacción. Al igual que con las pruebas realizadas para la evaluación de la reacción en solución, se realizó una curva de calibración, graficando el valor promedio en escala de grises del área coloreada en función de las diferentes concentraciones de glucosa. El flujo de trabajo para este procedimiento se ilustra en la Figura 20.

Figura 20. Procedimiento del estudio de la reacción para la detección de glucosa utilizando el complejo yodo-almidón en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima Gox en papel



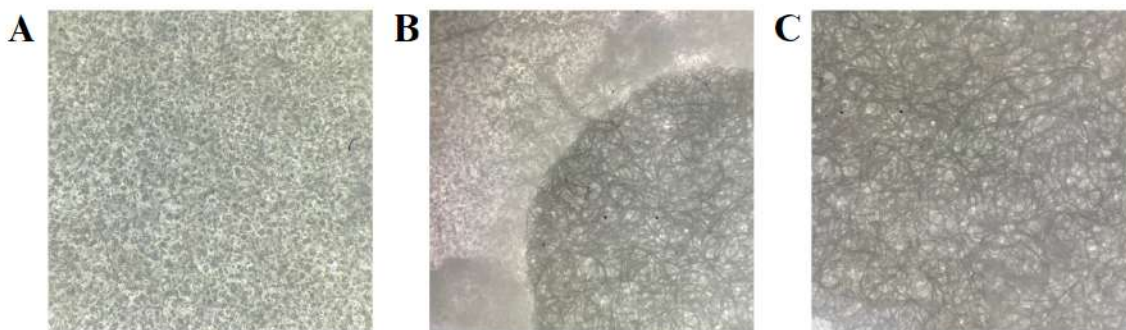
Nota. Figura creada con BioRender.com.

1. Fabricación y optimización de prototipos para comparación de la formación de áreas hidrofóbicas

1.1. Comprobación de formación de área hidrofóbica y área hidrofílica por medio de observación en el microscopio

Al observar los prototipos para dispositivos analíticos basados en papel en el microscopio (magnificación x4) se pudo comprobar la formación de dos áreas con diferentes características. Se pueden observar las diferentes áreas resultantes del tratamiento de papel de filtro Whatman® grado 4 con la técnica de inmersión en cera utilizando una temperatura de 120 °C (Figura 21). La Figura 21A muestra el área hidrofóbica del dispositivo que se forma como resultado de la impregnación del papel con cera de parafina. En la Figura 21B, se observa una parte de la frontera definida entre el área hidrofóbica y el área hidrofílica. Finalmente, en la Figura 21C, se muestra el área hidrofílica que no fue expuesta a cera de parafina durante la fabricación de los prototipos.

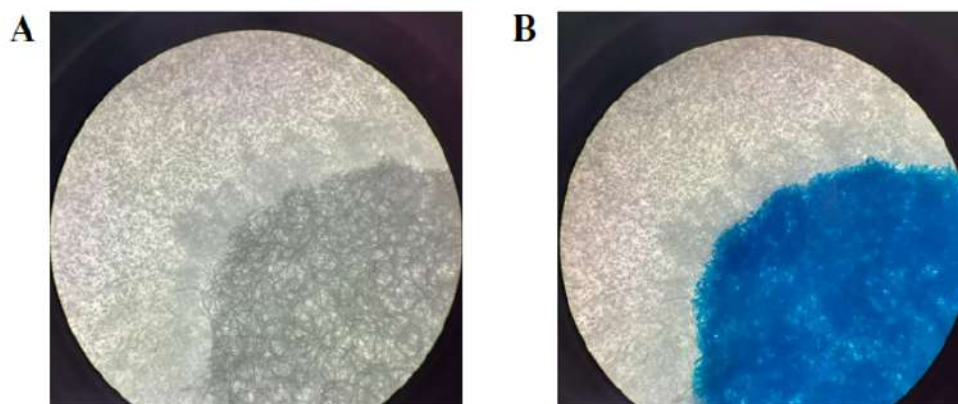
Figura 21. Prototipo de dispositivo analítico basado en papel fabricado utilizando la técnica de permeación con cera a una temperatura de 120 °C y papel de filtro Whatman® grado 4 observado en el microscopio (magnificación x4)



Nota. (A) área hidrofóbica (B) frontera entre área hidrofóbica y área hidrofílica (C) área hidrofílica.

Para evaluar el funcionamiento de la zona hidrofóbica para confinar una muestra dentro del área de detección de los prototipos se hicieron pruebas colocando colorante alimenticio en las zonas de detección. Se logró demostrar el confinamiento del colorante en el área de detección de un prototipo elaborado utilizando la técnica de inmersión en cera a 130 °C en papel de filtro Whatman® grado 4 (Figura 22). La Figura 22A muestra el prototipo antes de colocar una gota de colorante alimenticio de 1 μ L, y la Figura 22B muestra el prototipo conteniendo la muestra líquida dentro de la zona de detección formada a partir del tratamiento del papel con cera de parafina.

Figura 22. Demostración de retención de líquidos en el área de detección hidrofílica de un prototipo de dispositivo analítico basado en papel elaborado utilizando la técnica de inmersión en cera a 130 °C en papel de filtro Whatman® grado 4 (magnificación x4)

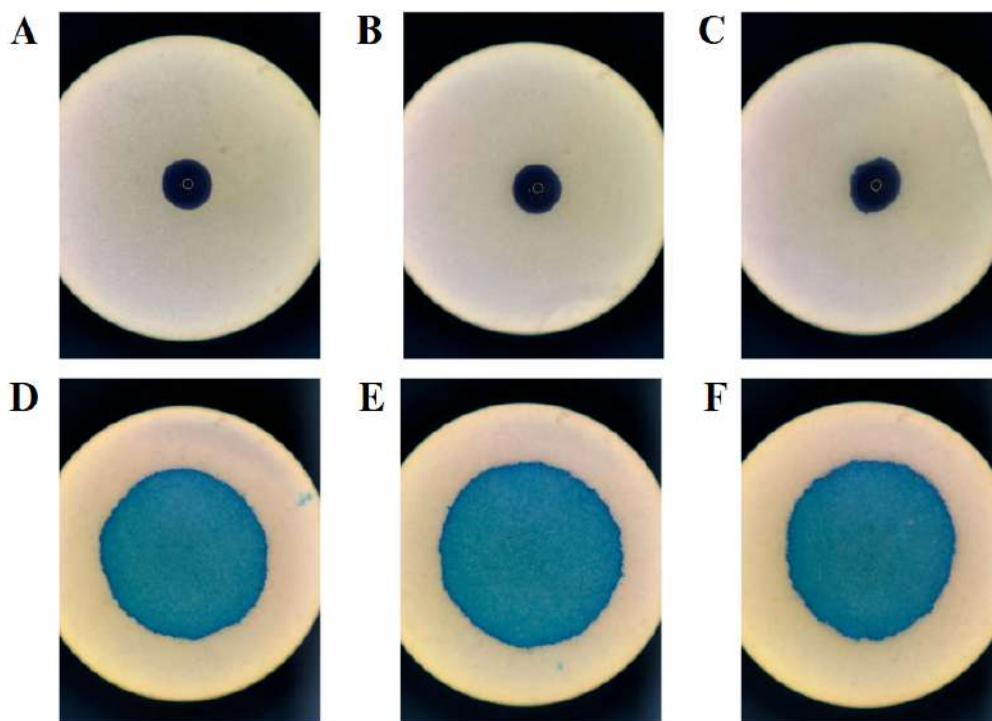


Nota. (A) prototipo original y (B) prototipo con colorante en la zona de detección.

1.2. Comparación de comportamiento de área hidrofóbica y área hidrofílica en los diferentes tipos de papel

Se estudió y comparó el comportamiento de las superficies hidrofóbicas creadas al impregnar los diferentes tipos de papel con cera de parafina a 130 °C y sus superficies hidrofílicas originales. Se colocaron gotas de 1 μL de colorante alimenticio en el papel de filtro Whatman® grado 1 y 4, y 2 μL en el papel de cromatografía. Se pudo observar que para las superficies hidrofóbicas (ver Figura 23 A, B y C) la gota depositada en la superficie del papel se mantiene en el mismo espacio que ocupaba al ser depositada. Por otro lado, en el caso de las superficies hidrofílicas originales (ver Figura 23 D, E y F), se observa que las gotas depositadas logran impregnar el papel y se desplazan de manera radial hacia afuera a partir del punto donde fueron depositadas. Teniendo un mayor desplazamiento en el caso de papel de filtro grado 4 (Figura 23E).

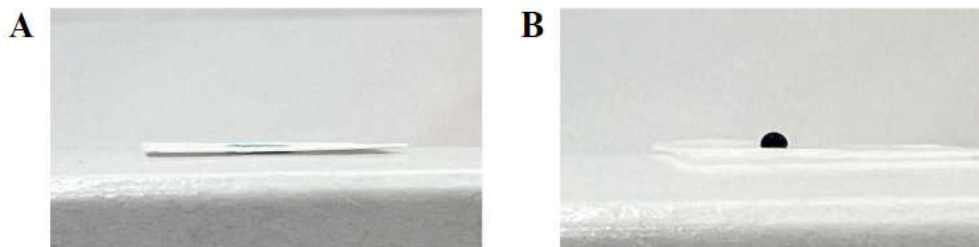
Figura 23. *Comportamiento de superficie hidrofóbica impregnada con cera de parafina a 130 °C*



Nota. (A) papel de filtro Whatman® grado 1 (B) papel de filtro Whatman® grado 4 y (C) papel de cromatografía, y de superficie hidrofílica original en (D) papel de filtro Whatman® grado 1 (E) papel de filtro Whatman® grado 4 y (F) papel de cromatografía (magnificación x1).

También se estudió la vista lateral del papel de cromatografía utilizado para evaluar el comportamiento de la superficie hidrofóbica impregnada con cera de parafina a 130 °C (ver Figura 24A) y su superficie hidrofílica original (ver Figura 24B). Se puede observar que la superficie original del papel absorbe toda la gota de colorante alimenticio de manera inmediata cuando esta se coloca. Por otro lado, el papel impregnado con cera de parafina muestra ser hidrofóbico al mantener la gota de colorante en su superficie.

Figura 24. *Vista lateral de gotas de colorante alimenticio en papel de cromatografía*



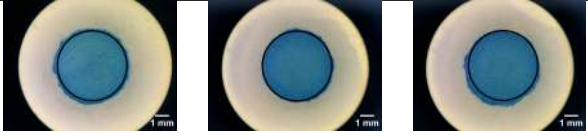
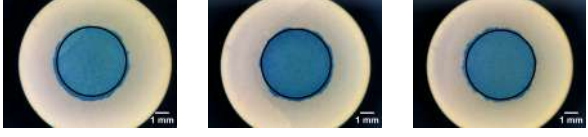
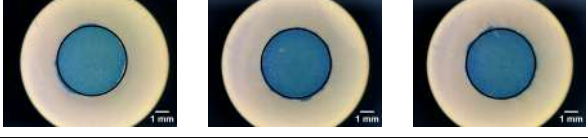
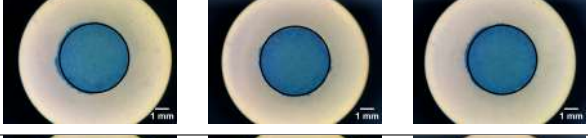
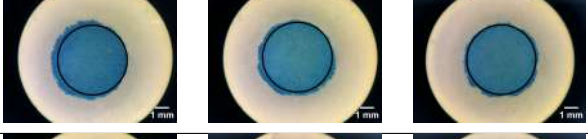
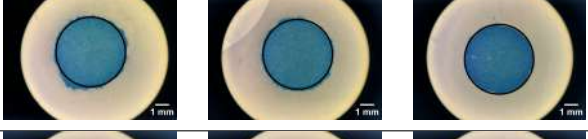
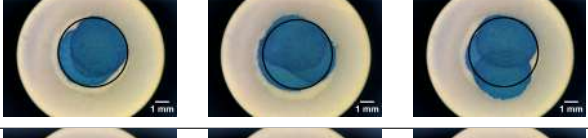
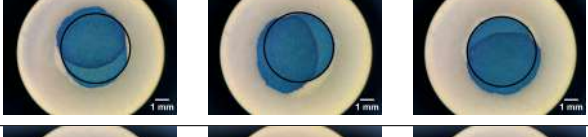
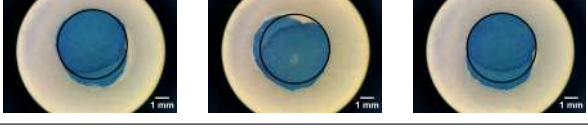
Nota. (A) superficie hidrofílica sin tratamiento de patronaje con cera y (B) superficie hidrofóbica impregnada con cera de parafina a 130 °C.

2. Comparación del área de la zona de detección en las diferentes variaciones de prototipo por técnica de fabricación

2.1. Inmersión en cera

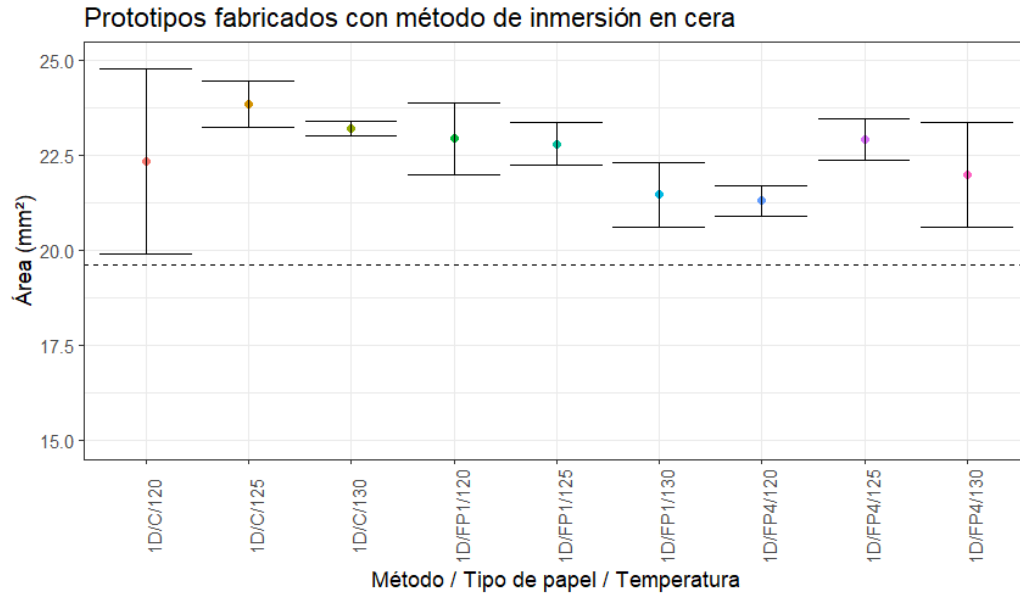
El método de inmersión en cera se utilizó para fabricar prototipos con el papel de filtro Whatman® grado 1 y grado 4, y con papel de cromatografía. Se realizaron tres repeticiones de cada variación, resultando en los 27 prototipos (ver Cuadro 2). Para los prototipos elaborados con papel de filtro grado 1 se observó una buena definición del área circular, bastante similar al tamaño y forma del área diseñada. En los prototipos realizados con cera a menor temperatura se observa que el colorante se propaga fuera del área de detección deseada, pero al aumentar la temperatura se observa una menor propagación hacia afuera de las áreas de detección. En el caso del papel de filtro grado 4, se observa una mayor propagación fuera del área de detección a medida que se aumenta la temperatura. Los prototipos elaborados con papel de cromatografía mostraron menos consistencia en la forma obtenida para la zona de detección. Para cada variación de los prototipos se calculó el promedio y la desviación estándar de la zona de detección hidrofílica delimitada por el área hidrofóbica creada por la impregnación de la cera de parafina en el papel (ver Cuadro 2). Este método de fabricación obtuvo medias bastante cercanas al área objetivo y la menor desviación estándar para sus variaciones en comparación con la variación propuesta para la fabricación de 6 dispositivos en una inmersión y el método de permeación con cera.

Cuadro 2. Promedio del área, desviación estándar e imágenes de los grupos de variaciones de prototipos fabricados con la técnica de inmersión en cera.

Método / Tipo de papel / Temperatura	Imágenes	Área (mm ²)	Desviación estándar (mm ²)
1D/FP1/120		22.948	0.952
1D/FP1/125		22.808	0.560
1D/FP1/130		21.470	0.853
1D/FP4/120		21.313	0.399
1D/FP4/125		22.929	0.539
1D/FP4/130		21.984	1.381
1D/C/120		22.354	2.432
1D/C/125		23.866	0.612
1D/C/130		23.207	0.187

Para escoger el prototipo final para la técnica de inmersión en cera se comparó el promedio y desviación estándar de las diferentes variaciones de tipo de papel y temperatura (ver Figura 25). A partir del análisis de los resultados obtenidos para los grupos de prototipos fabricados con esta técnica, se determinó que el prototipo final para el método de inmersión en cera era la variación que utilizó papel de filtro Whatman® grado 4 con cera de parafina a 120 °C (1D/FP4/120).

Figura 25. Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas para los prototipos fabricados con el método de inmersión en cera

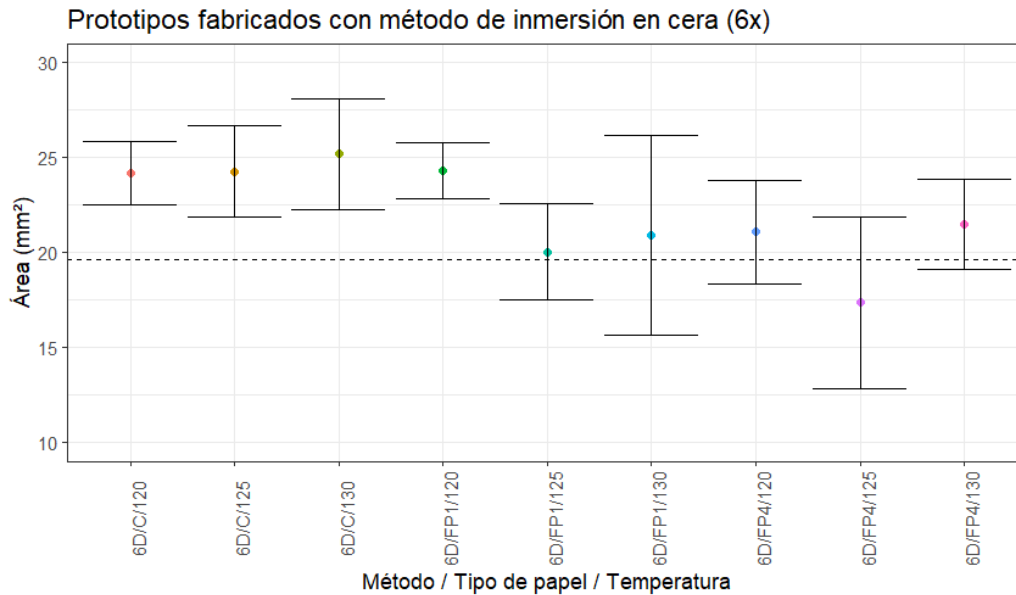


Nota. Cada punto representa la media, mientras que las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones para cada variación de tipo de papel y temperatura.

2.2. Inmersión en cera x6

La técnica de inmersión en cera para elaborar 6 prototipos en una sola inmersión se evaluó de igual forma que la técnica de inmersión en cera. En la Figura 26, se presenta el promedio y la desviación estándar de las áreas de detección formadas en las variaciones de prototipos fabricados. A partir de estos resultados, y utilizando el mismo criterio de selección que se utilizó con la técnica de inmersión en cera, se determinó que el prototipo final para esta técnica de fabricación es el que utiliza papel de filtro Whatman® grado 1 con cera a una temperatura de 125 °C (6D/FP1/125).

Figura 26. *Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas para los prototipos fabricados con el método de inmersión en cera para la elaboración de 6 prototipos en una sola inmersión*

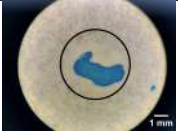

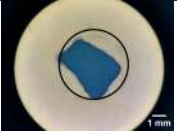
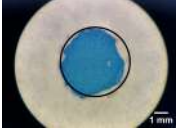
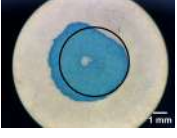
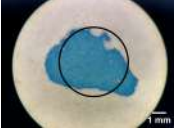
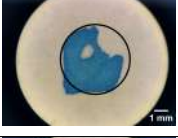
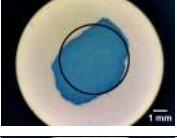
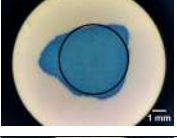
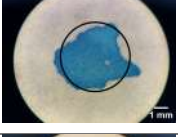
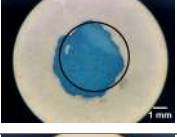
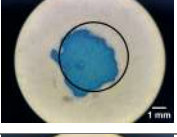
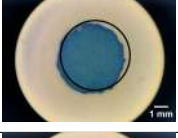
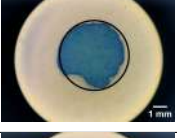
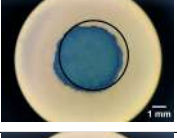
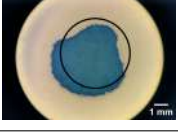
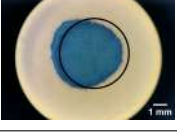
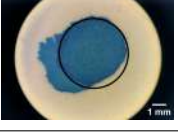


Nota. Cada punto representa la media, mientras que las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones para cada variación de tipo de papel y temperatura.

2.3. Permeación con cera

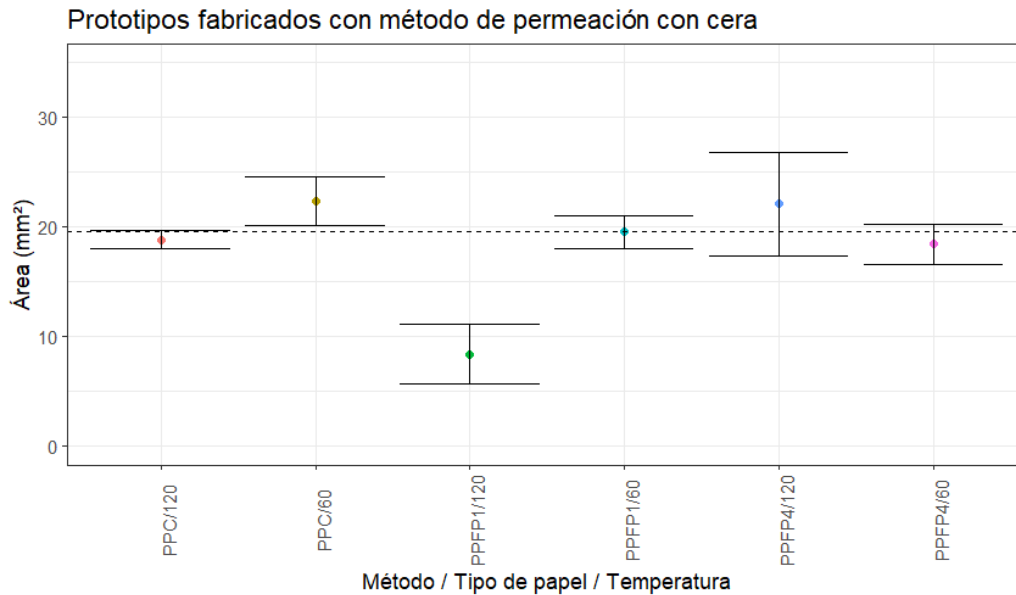
Para evaluar la forma de la zona de detección hidrofílica resultante en los prototipos fabricados con la técnica de permeación con cera se utilizó la misma metodología y criterios que con los otros dos métodos, con la diferencia de que se utilizaron temperaturas de 60 y 120 °C, resultando en 18 prototipos (ver Cuadro 3). Para esta técnica se pudo observar que el control sobre la forma final de las zonas hidrofílicas es muy limitado, obteniendo formas muy variadas donde la mayoría no coincidía con el área que se intentaba obtener para los prototipos. Para todos los tipos de papel, se observó que a mayor temperatura se obtenían áreas de detección con un tamaño más reducido, mientras que a menor temperatura las áreas tienen un mayor tamaño.

Cuadro 3. Promedio del área, desviación estándar e imágenes de los grupos de variaciones de prototipos fabricados con la técnica de permeación con cera.

Método / Tipo de papel / Temperatura	Imágenes			Área (mm ²)	Desviación estándar (mm ²)
PPFP1/120				8.390	2.695
PPFP1/60				19.524	1.548
PPFP4/120				22.096	4.751
PPFP4/60				18.414	1.790
PPC/120				18.842	0.843
PPC/60				22.324	2.225

Al comparar el promedio de las áreas y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas para los prototipos fabricados con el método de permeación con cera (Figura 27), el valor obtenido para el grupo de la variación que utilizó papel de filtro Whatman® grado 1 y temperatura de 60 °C (PPFP1/60) muestra una coincidencia casi exacta con el valor deseado de 19.625 mm². Sin embargo, como se puede observar en el Cuadro 3, aunque este grupo de dispositivos muestra la media más cercana al valor objetivo, la forma resultante de las zonas hidrofílicas no se asimila al círculo que se esperaba obtener. Lo que resultó en el descarte de dicho grupo. A partir de ello se seleccionó la variante que utilizó papel de cromatografía y una temperatura de 120 °C (PPC/120) como prototipo final para esta técnica de fabricación.

Figura 27. Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas para los prototipos fabricados con el método de permeación con cera



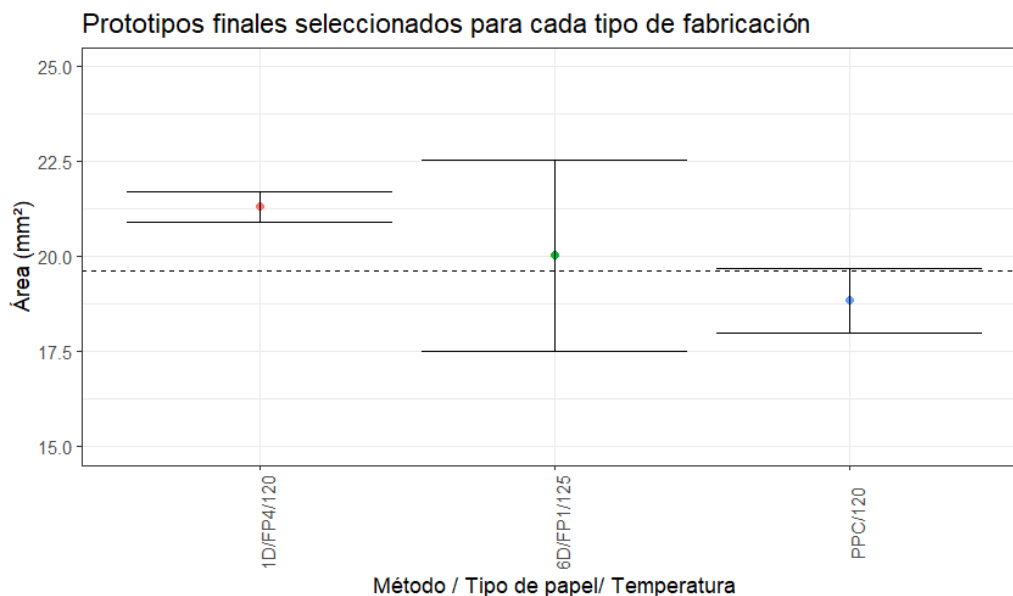
Nota. Cada punto representa la media, mientras que las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones para cada variación de tipo de papel y temperatura.

3. Seleccionar el prototipo final

3.1. Comparación del área de la zona de detección de los prototipos finales para cada tipo de fabricación

Finalmente, se hizo una comparación entre los prototipos finales seleccionados para cada método de fabricación. En la Figura 28, se presenta la media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas de los prototipos finales seleccionados para cada método de fabricación. Como se puede observar, el grupo que posee la media más cercana al valor objetivo es 6D/FP1/125. Sin embargo, este método muestra una desviación estándar más alta que los otros dos, indicando menor reproducibilidad. Al comparar el grupo PPC/120 con 1D/FP4/120, se observó que la media de PPC/120 se encontraba más cercana al valor objetivo. Sin embargo, se optó por un método de fabricación con una menor desviación estándar. Como prototipo final se eligió la variación del método de inmersión en cera que utiliza papel de filtro Whatman® grado 4 con cera de parafina a 120 °C (1D/FP4/120).

Figura 28. Media y desviación estándar del área de detección delimitada por áreas hidrofóbicas de los prototipos finales seleccionados para cada método de fabricación



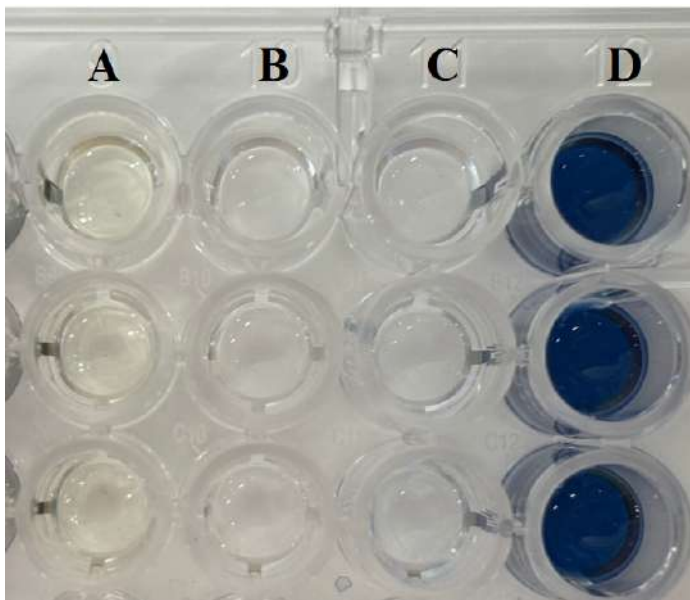
Nota. Cada punto representa la media, mientras que las barras de error indican la desviación estándar de tres repeticiones para cada variación de tipo de papel y temperatura.

4. Evaluación del prototipo final para su posible implementación como biosensor

Con el objetivo de evaluar el prototipo de dispositivo analítico basado en papel para su posible implementación como biosensor, se evaluó la capacidad de la reacción en solución para la detección de glucosa que utilizaba el complejo yodo-almidón en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOx).

Para evaluar la efectividad de la reacción para la detección de glucosa se realizó una serie de controles. Para el caso de la mezcla de glucosa 5 mM, GOx 2.42 U/mL, y KI 14.5 mM se percibió la formación de un ligero color amarillo (ver Figura 29A). En la mezcla de glucosa 5 mM, GOx 2.42 U/mL, KI 14.5 mM y almidón 3.23 mg/mL se observa la formación de un color azul intenso (ver Figura 29D). Para la mezcla de glucosa 5 mM, GOx 2.42 U/mL y almidón 3.23 mg/mL y la mezcla 14.5 mM KI y 3.23 mg/mL almidón, no se observaron cambios a simple vista (ver Figura 29 B y C).

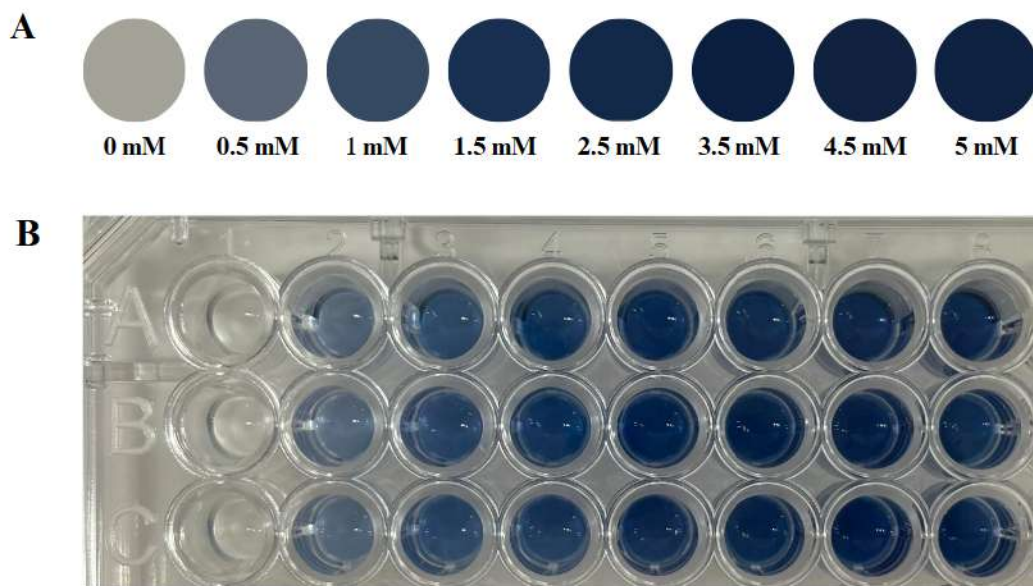
Figura 29. Pruebas de control para evaluación de la viabilidad de la reacción (15 minutos de incubación)



Nota. (A) glucosa + Gox + KI (B) glucosa + Gox + almidón (C) KI + almidón (D) glucosa + Gox + KI + almidón.

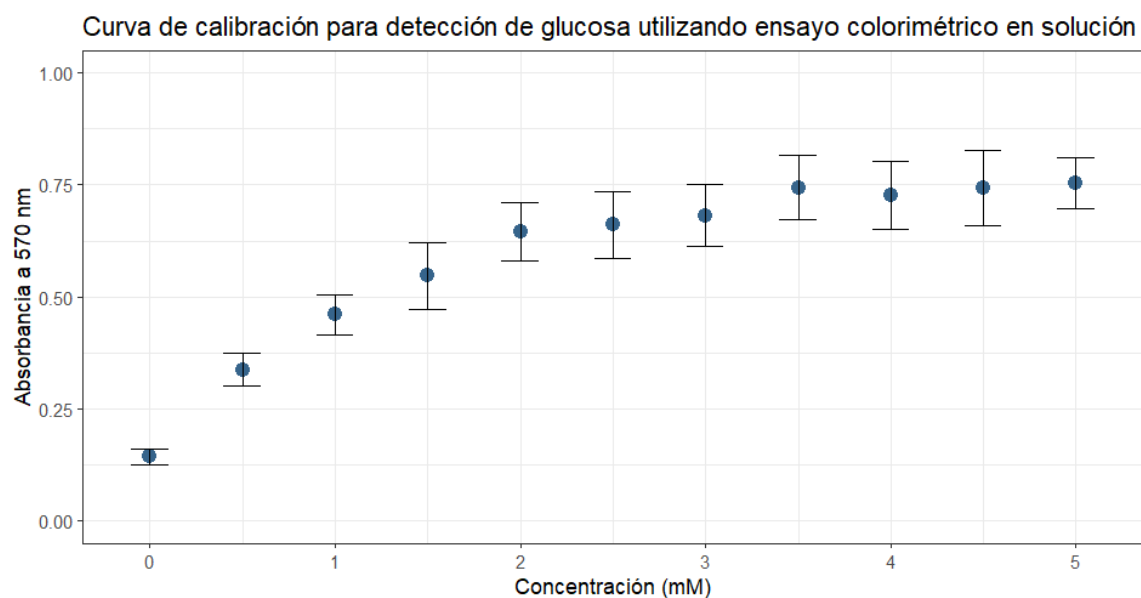
La reacción fue estudiada en tubos Eppendorf de 1.5 mL, donde se evaluaron los cambios a partir de la manipulación de la concentración de los diferentes reactivos y tiempos de incubación. Para estas pruebas se evaluó la formación de color y se midió la absorbancia a 570 nm. En la Figura 30 se observan los resultados obtenidos con una de las reacciones intermedias que fueron estudiadas para la determinación de los parámetros de la reacción final. En esta se observa claramente que la intensidad del color azul aumenta a medida que se eleva la concentración de glucosa de las muestras. Sin embargo, a medida que se va aumentando la concentración (de 3.5 mM en adelante) se hace difícil percibir los cambios en la intensidad del color, es decir, se observa una saturación en la reacción.

Figura 30. Observación de desarrollo de color de una de las reacciones intermedias para detección de glucosa por medio de ensayo colorimétrico utilizando enzima GOx y el complejo yodo-almidón en solución



Para el estudio de la reacción final en solución se utilizó un gradiente de concentraciones de glucosa de 0 a 5 mM (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 mM). Se obtuvo la curva de calibración para la detección de glucosa por medio del ensayo colorimétrico en solución, donde cada punto representa el promedio y desviación estándar de al menos tres mediciones independientes (ver Figura 31). A partir de esta se puede observar que la absorbancia a 570 nm aumenta a medida que se eleva la concentración de glucosa en las muestras. Además, se pudo detectar una saturación en la absorbancia para concentraciones de glucosa por encima de 3 mM, la cual no permitiría la diferenciación de concentraciones superiores a dicho valor.

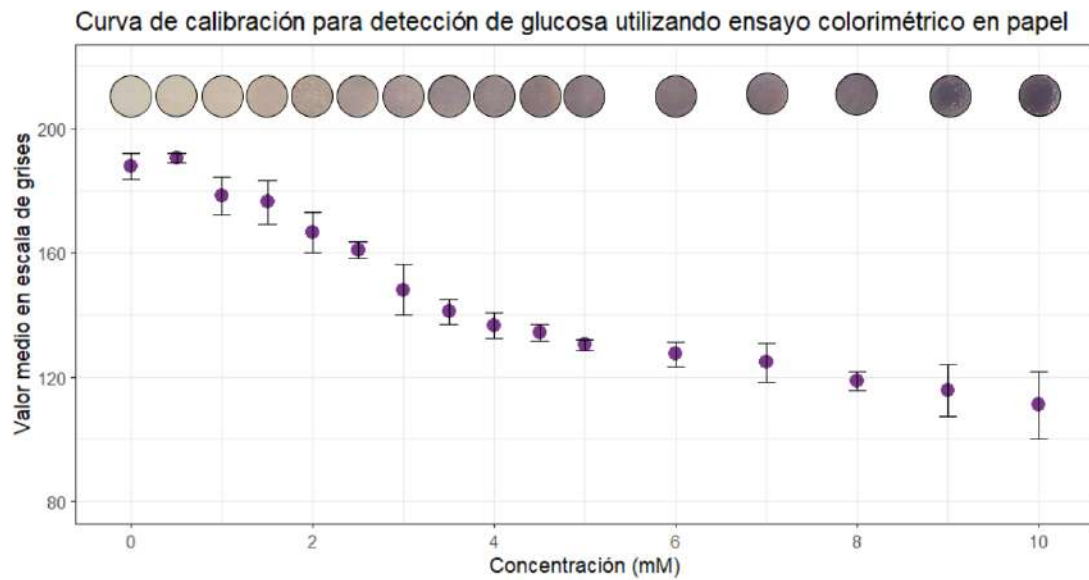
Figura 31. Curva de calibración para la reacción para detección de glucosa por medio de ensayo colorimétrico utilizando enzima GOx y complejo yodo-almidón en solución utilizando absorbancia A570



Nota. Cada punto representa el promedio, mientras que las barras de error indican la desviación estándar de al menos tres mediciones independientes.

A partir de los resultados obtenidos del estudio de la reacción en solución, se procedió a la detección de diferentes concentraciones de glucosa en papel (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mM). Se pudo observar la formación de color en el área de detección de los dispositivos para las diferentes concentraciones estudiadas, y se logró percibir a simple vista el cambio en la intensidad del color a medida que se aumentaba la concentración de glucosa en las muestras (ver Figura 32). Utilizando el software ImageJ se obtuvo el valor medio en escala de grises para las mismas áreas de detección. Al graficar dichos valores en función de la concentración de glucosa, se pudo observar claramente que existía una relación entre el valor medio de escala de grises y la concentración de glucosa en las muestras. Donde a medida que aumenta la concentración de glucosa, disminuye el valor medio en escala de grises. A diferencia de la reacción en solución, en papel no se observa una saturación en concentraciones superiores a 3 mM, sino que se observa un cambio un poco más gradual que para las concentraciones menores a 3mM, pero que aún es perceptible en contraste con las reacciones en solución (ver Figura 32).

Figura 32. Curva de calibración para detección de glucosa por medio de ensayo colorimétrico de enzima GOx y complejo yodo-almidón en papel con tiempo de incubación de 15 minutos utilizando valor medio en escala de grises



Nota. Cada punto representa el promedio, mientras que las barras de error indican la desviación estándar de al menos tres mediciones independientes. También se presenta el resultado colorimétrico para la detección de las diferentes soluciones.

1. Fabricación y optimización de prototipos para comparación de la formación de áreas hidrofóbicas

Se logró fabricar y optimizar variaciones de prototipos para dispositivos analíticos basados en papel por medio de las técnicas de inmersión en cera y permeación con cera utilizando papel de cromatografía y papel de filtro con cera de parafina a diferentes temperaturas. Luego, se hizo una comparación de la formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de aplicación de la muestra en los prototipos fabricados. A partir de ello, se confirmó la formación de dos áreas con diferentes características, una resultante de la impregnación de la cera de parafina y la otra mostrando las características originales del papel utilizado. Los resultados obtenidos de la evaluación de cada variación de los prototipos se utilizaron para seleccionar un prototipo final, el cual consistió en la variación del método de inmersión en cera que utiliza papel de filtro Whatman® grado 4 con cera de parafina a 120 °C (1D/FP4/120). Posteriormente, el prototipo final fue utilizado para evaluar su posible implementación como biosensor.

1.1. Comparación de la formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de detección en los prototipos fabricados

Al observar los prototipos para dispositivos analíticos basados en papel en el microscopio se pudo comprobar la formación de dos áreas con diferentes características. A partir de esto se puede confirmar que el tratamiento del papel con cera de parafina resultante de las técnicas de fabricación utilizadas logra alterar su superficie y con ello sus propiedades por medio de la impregnación de la cera en las membranas de celulosa. Estos resultados también confirman los hallazgos de Songjaroen et al. [17].

El área que no es impregnada por la cera durante el proceso de fabricación de los dispositivos exhibe la naturaleza hidrofílica del papel, la cual se origina de su componente principal, la celulosa [69]. Normalmente, el material consiste en una red de fibras con propiedades que afectan sus características químicas y físicas [70]. Las principales propiedades que dictan su hidrofiliidad son: la estructura de celulosa, la porosidad, la acción capilar y la energía superficial [62, 69].

La alteración de las características superficiales de papel en el área impregnada con cera se logra gracias a las moléculas de cera que tienen naturaleza hidrofóbica. Esta forma una barrera que impide que las moléculas de agua entren en contacto con las fibras de celulosa del papel. La cera cubre los poros y espacios disponibles entre las fibras de celulosa, con lo que se bloquean vías de acceso a través de las cuales el líquido podría impregnarse en el material. Como resultado, se reduce la capacidad de absorción del papel. Finalmente, las moléculas de cera tienen mayor atracción entre ellas que hacia las moléculas de agua, lo que crea una superficie a la que el agua no puede adherirse fácilmente [71].

La alteración de la naturaleza hidrofílica de la superficie del papel se hace necesaria para lograr la obtención de un dispositivo analítico con un área de detección hidrofílica delimitada por un área hidrofóbica capaz de contener las muestras. Esto permite que las muestras líquidas sean distribuidas a lo largo de las zonas de detección por medio de la acción capilar del papel hasta que sean detenidas por las áreas hidrofóbicas. Al tener zonas de detección de tamaños específicos se permite el confinamiento de los reactivos y el control de sus concentraciones para que las muestras reaccionen de la manera esperada. De esta forma se consigue una mayor intensidad, sensibilidad y reproducibilidad en los ensayos colorimétricos. Adicionalmente, se logra minimizar el tamaño de las muestras utilizadas, resultando en dispositivos más rentables [62].

Se comprobó la formación de las áreas hidrofóbicas utilizando colorante alimenticio, ya que este tiene la capacidad de difundirse en el papel desde el centro hacia la periferia en dirección radial [72, 73]. Un comportamiento característico de los líquidos estudiado por primera vez en medios porosos por Marmur [74]. La difusión se detiene cuando el fluido encuentra una barrera, lo que confirma la capacidad del dispositivo para el confinamiento de la muestra dentro de la zona de detección [72].

Al evaluar la superficie hidrofílica del papel y la modificada con la impregnación de cera, se encontraron diferencias en el grado de desplazamiento de los líquidos a través de la estructura del papel. Estas variaciones son causadas por factores y propiedades como la estructura de las fibras, el tamaño del poro, la permeabilidad, la forma y las propiedades físicas del líquido que entra en contacto [73]. Los tres tipos de papel utilizados exhiben diferentes características. El papel de filtro grado 1 presenta una retención de partículas de más de 11 μm , con un grosor de 180 μm y porosidad de 10 segundos. Por su parte, el papel de filtro de grado 4 presenta una retención de partículas de más de 25 μm , un grosor de 210 μm y una porosidad de 3.7 segundos [73].

Los resultados de la evaluación del comportamiento de la superficie hidrofílica original en los tres tipos de papel muestran un mayor desplazamiento radial para el colorante alimenticio en el papel de filtro de grado 4 en comparación con el papel de filtro grado 1. Siendo la porosidad una medida del grado en el que una superficie permite que un gas o líquido la penetre, un papel con menor porosidad hace más difícil el desplazamiento de un líquido en la superficie del papel [73]. En este caso, el papel de grado 4 presenta una menor porosidad.

Los tipos de papel utilizados también muestran diferentes grosores. Este es otro parámetro importante para los dispositivos analíticos basados en papel, ya que un material más grueso necesita de muestras de un mayor tamaño para saturar los poros de su estructura [73]. En este caso, la porosidad del papel de grado 1 es 2.7 veces más alta que el papel de grado 4, por lo que se observa un desplazamiento mayor de líquido en el papel de filtro grado 4. Por su parte, el papel de cromatografía muestra ser mucho más grueso que el papel de filtro, lo que explica que el desplazamiento de líquidos sea mucho menor para este tipo de papel. Sin embargo, al ser una donación, no se cuenta con las especificaciones del papel de cromatografía utilizado en el presente trabajo.

A partir del estudio del comportamiento de superficie hidrofóbica impregnada con cera de parafina a 130 °C cuando se colocó una gota de colorante alimenticio sobre su superficie, se encontró que las gotas no se desplazaron de manera radial a lo largo de la superficie del papel, sino que la gota se mantuvo en la superficie del papel. Con ello, se confirmó la creación de una superficie hidrofóbica resultante de la impregnación de la cera de parafina en las fibras del papel.

2. Comparación del área de la zona de detección en las diferentes variaciones de prototipo por técnica de fabricación para la selección del prototipo final

Para elegir el prototipo final para cada método de fabricación se utilizaron dos criterios principales. Primero, que el promedio del área de la zona de detección creada para las tres repeticiones de las variaciones fuera lo más cercana posible al área diseñada para la zona de detección. Segundo, que la desviación estándar de los grupos de tres repeticiones para cada variación fuera lo más pequeña posible, de manera que se pudiera aumentar la reproducibilidad de los dispositivos para su posterior evaluación con el objetivo de determinar la viabilidad de su implementación como biosensores.

En el caso de la técnica de inmersión en cera, se obtuvieron prototipos con zonas de detección bastante similares al área diseñada. Esta técnica mostró el rango de valores más reducido y cercano al valor que se deseaba obtener para las áreas de detección (círculo de 19.625 mm²). Además, mostró tener la menor variabilidad entre las repeticiones realizadas para los prototipos elaborados. El prototipo final para este método fue la variación que utilizó papel de filtro Whatman® grado 4 con cera de parafina a 120 °C (1D/FP4/120). Esto debido a que mostró la media más cercana al área diseñada (19.625 mm²) con un valor de 21.313 mm², y mostraba una menor desviación estándar (0.399 mm²) en comparación con la siguiente media más cercana que correspondía al prototipo 1D/FP1/130, con media de 21.470 mm² y desviación estándar de 0.853 mm².

El método que consistió en la variación de la técnica de inmersión en cera diseñada para elaborar 6 prototipos en una sola inmersión resultó ser el que mostraba una mayor desviación estándar para las diferentes variaciones de los prototipos. Sin embargo, se debe resaltar que esta técnica logra la fabricación de los dispositivos de una manera más rápida en comparación con la inmersión normal. Debido a ello, se resalta que es de gran importancia continuar con el estudio y optimización de esta técnica para el aumento de su reproducibilidad. Esto de manera que se logre la fabricación más rápida de este tipo de prototipos sin perder la reproducibilidad de la técnica de inmersión en cera tradicional.

Dicha característica es de gran importancia para una técnica de fabricación para dispositivos analíticos basados en papel, pues al asegurar que las barreras hidrofóbicas producen zonas de detección que tienen el mismo tamaño, la manipulación de los reactivos y muestras puede ser más controlada, lo que genera resultados más reproducibles para los ensayos realizados en dichas zonas de detección [75]. El prototipo final para esta técnica fue la variación que utilizaba papel de filtro Whatman® grado 1 con cera a una temperatura de 125 °C (6D/FP1/125). Esto se debe a que dicha variación muestra la media más cercana al área diseñada, con la menor desviación estándar en comparación a los otros puntos cercanos al valor objetivo.

Por su parte, el método de permeación con cera demostró ser el más rápido, pero al mismo tiempo el menos preciso para la definición de la forma deseada en el área de detección. Aunque algunas de las zonas de detección mostraron valores muy cercanos al deseado, la forma no se asemejaba a un círculo. Como ejemplo se puede mencionar la variación PFP1/60, la cual mostró un promedio de 19.524 mm² para las áreas de detección de los prototipos, pero con formas muy diferentes a un círculo. Debido a esto, se determinó que los prototipos elaborados con esta técnica no permitirían la reproducibilidad de los ensayos analíticos, pues la técnica no permite el control de la forma y tamaño de la zona de detección.

La necesidad de una zona de detección circular definida radica en la naturaleza del desplazamiento radial hacia afuera que presentan los líquidos al entrar en contacto con la superficie del papel, de manera que se logre distribuir las muestras más uniformemente [73]. Por otro lado, una buena reproducibilidad permite la uniformidad en las zonas de detección, lo que como se menciona anteriormente, hace posible el control en la manipulación de los reactivos y la reproducibilidad de los ensayos. La variante que utilizó papel de cromatografía y una temperatura de 120 °C (PPC/120) fue elegida como el prototipo final para esta técnica de fabricación, ya que muestra la segunda media más cercana al objetivo, y la desviación más pequeña para este método de fabricación.

Al realizar la comparación entre los prototipos finales para las tres técnicas de fabricación, se escogió la variación del método de inmersión en cera que utiliza papel de filtro Whatman® grado 4 con cera de parafina a 120 °C (1D/FP4/120). Esto se debe a que era la segunda variación con la media más cercana al valor objetivo, y tenía una desviación estándar más pequeña que el punto más cercano. Asegurando una mayor reproducibilidad para la evaluación de su utilización como biosensor. Se debe resaltar, que la variación de la técnica de inmersión en cera para la fabricación de 6 dispositivos en una sola inmersión mostró el valor más cercano a la media. Esto muestra que el método es prometedor. Sin embargo, es necesario trabajar en su optimización para poder reducir la variabilidad de los prototipos que produce, ya que esto lo haría una alternativa más rápida para la elaboración de dispositivos basados en papel.

3. Evaluación del prototipo final para su posible implementación como biosensor

Una vez seleccionado el prototipo final, se evaluó su posible implementación como biosensor para la detección de glucosa utilizando el complejo yodo-almidón descubierto por Coloin y de Claubry en 1814 [76] en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOx). El funcionamiento de la reacción radica en la capacidad de la enzima para oxidar la glucosa en presencia de dióxigeno, convirtiéndola en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno [77]. En presencia de peróxido de hidrógeno y gracias a la condición ácida que promueve el ácido glucónico, se induce la oxidación del yoduro de potasio (KI) a yodo molecular y luego a triyoduro. Este es capaz de combinarse con el almidón para formar el complejo yodo-almidón, que se caracteriza por su intenso color azul [67, 78, 79].

Se realizó una serie de controles para determinar que la formación de color en la solución con yoduro de potasio (KI) y almidón es inducida por el peróxido de hidrógeno producido por la acción de la enzima GOx al reaccionar con la glucosa. Se estudió la formación de color luego de 15 minutos de incubación, debido a que ese sería el tiempo de incubación utilizado como parámetro para la reacción. La primera mezcla contenía glucosa, GOx y KI. Para esta se pudo observar la formación de un ligero color amarillo que indica la producción de triyoduro derivada de la oxidación del KI inducida por el peróxido de hidrógeno producido por la GOx en presencia de glucosa [67]. En la segunda mezcla de control se colocó glucosa, GOx y almidón. No se observó la formación de ningún color en dicha mezcla, lo que indica que, aunque la GOx es capaz de producir peróxido de hidrógeno, este no es capaz de desarrollar color por sí mismo en presencia de almidón. La tercera mezcla contenía KI y almidón, para esta tampoco se observó la formación de color. Lo que indica que, sin peróxido de hidrógeno, el KI no es capaz de formar el complejo yodo-almidón por sí mismo en presencia de almidón. Finalmente, la cuarta mezcla contenía glucosa, GOx, KI y almidón. Para esa mezcla se observó de manera clara la formación de color azul. Los resultados confirman que la combinación de glucosa con la enzima GOx produce peróxido de hidrógeno, el cual induce la oxidación del KI a triyoduro, que en presencia de almidón forma el complejo yodo-almidón de color azul.

El estudio de la reacción en solución se hizo con el objetivo de determinar las concentraciones y tiempos de incubación que permitían una detección más sensible de diferentes concentraciones de glucosa. Las principales variables que se manipularon fueron: la concentración de GOx, la concentración de almidón y el tiempo de incubación de la GOx con la glucosa. En un inicio la reacción mostraba una tendencia a la saturación, por lo que no era sencillo diferenciar entre concentraciones de glucosa. Las variables mencionadas se manipularon con el fin de reducir la saturación de la reacción y aumentar la sensibilidad y facilidad de lectura a simple vista. Se alcanzó una reacción final capaz de detectar cambios en la concentración de glucosa, y esta fue estudiada para la detección de concentraciones entre 0 y 5 mM.

Debido a que el complejo yodo-almidón se caracteriza por tornarse de un color azul oscuro y aumentar la absorbancia a 570 nm [67], se realizó una curva de calibración con la absorbancia a 570 nm de los resultados obtenidos para diferentes concentraciones de glucosa. Con esta curva se evaluó la relación entre la concentración de glucosa y aumento en la absorbancia producido por la reacción en solución. Se pudo observar que el aumento de la absorbancia a 570 nm tenía una relación directa con la concentración de glucosa en la muestra, ya que a medida que aumentaba la concentración de glucosa, aumentaba también la absorbancia en las muestras.

Se probaron diferentes parámetros para el tiempo de incubación luego de agregar todos los reactivos, y se determinó que el tiempo ideal de incubación era de 5 minutos. Esto se debía a que, al esperar un mayor tiempo, las muestras comienzan a saturarse y ya no es posible diferenciar entre concentraciones de glucosa. Incluso con 5 minutos de incubación, aún se pudo observar una saturación en la absorbancia para las muestras con concentraciones por encima de 3 mM. Esto se puede percibir como una oportunidad para la optimización de la reacción, con el objetivo de aumentar su sensibilidad y evitar su saturación con concentraciones más altas de glucosa.

La saturación de la reacción puede deberse a la saturación de la enzima, ya que estas tienen una capacidad máxima para catalizar reacciones. Por lo que, si la cantidad de sustrato es muy alta en comparación con los sitios de reconocimiento libres en las enzimas, la reacción alcanza un punto en el que no habrá más sitios de reconocimiento disponibles para seguir detectando más sustrato. En este caso, agregar más sustrato tampoco causará una diferencia para la reacción [80].

La actividad de la GOx puede ser afectada por factores capaces de alterar la estructura de las proteínas, entre los que se pueden mencionar la temperatura y el pH [80, 81]. El pH óptimo para el funcionamiento de la GOx es de 5.5, aunque en un rango de 4-7 también exhibe actividad [82]. En este trabajo se utilizó un pH de 7, por lo que existe un margen de mejora. Una alternativa podría ser la utilización de otro tipo de buffer para la dilución de los reactivos, de manera que se pueda mantener el pH en los valores óptimos para el funcionamiento de la enzima. Por otro lado, la temperatura óptima de funcionamiento de la GOx se ha reportado entre 20 y 45 °C [77]. La optimización de la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción también podría ayudar a aumentar la sensibilidad y reducir la saturación de la reacción.

Pese a lo anterior, con la curva de calibración obtenida se logró demostrar la capacidad de la reacción para detectar diferentes concentraciones de glucosa por medio de la formación del complejo yodo-almidón en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima glucosa oxidasa. A partir de los resultados obtenidos para la evaluación en solución de la reacción, se procedió a implementarla en el dispositivo analítico basado en papel. Como primer paso, la reacción fue estudiada utilizando las mismas concentraciones de glucosa que cuando se estudió en solución, para efectos de comparación. A partir de esto, se pudo observar que los resultados no mostraban la misma saturación luego de la concentración 3 mM que se observaba en solución. Debido a ello, se procedió a ampliar el rango de concentraciones de glucosa con el objetivo de determinar la capacidad de detección de la reacción en papel.

Al ampliar el rango de concentraciones de glucosa hasta una concentración de 10 mM, se lograría que la reacción funcionase con casi todas las concentraciones clínicamente relevantes para el análisis de glucosa en pacientes. Esto basado en que, según la Organización Mundial de la Salud, el cuerpo humano trata de mantener un equilibrio en los niveles de glucosa en sangre entre 3.9 y 5.6 mM (70 a 100 mg/dL). A medida que el nivel se eleva por encima de los 7 mM (126 mg/dL) aumenta el riesgo de padecer diabetes [83].

El hecho de que la reacción no muestre saturación en papel al mismo nivel que se mostraba en solución, puede deberse a los efectos de la inmovilización de la enzima en la superficie del papel. La técnica de inmovilización utilizada en este caso es la de absorción física, esta se caracteriza por la utilización de interacciones físicas que crean enlaces débiles que pueden permitir el desprendimiento de la enzima de la matriz durante la aplicación [84]. Comparada con otros tipos de inmovilización, esta técnica resulta en una menor estabilidad para las enzimas [85]. Además de que la orientación de las enzimas no puede ser controlada, por lo que su distribución aleatoria puede hacer más difícil el acceso de los sustratos a los sitios de reconocimiento de las enzimas [86]. A partir de esto, se considera que, aunque la absorción es la técnica más rápida y comúnmente utilizada para inmovilización [85], existe una oportunidad para la optimización de la reacción en el dispositivo analítico en papel y la mejora en su desempeño al considerar otra técnica de inmovilización.

La obtención de la curva de calibración para la detección de diferentes concentraciones de glucosa por medio del ensayo colorimétrico muestra resultados que logran confirmar la viabilidad de la prueba de concepto presentada en este trabajo. Sin embargo, se debe recalcar que existe oportunidad para la optimización de la reacción, lo que podría permitir ampliar el rango de concentraciones que el dispositivo analítico y aumentar su sensibilidad.

Por medio de la implementación del prototipo como una prueba de concepto, se pudo validar la viabilidad de su utilización como un biosensor para la detección de glucosa por medio de un ensayo colorimétrico. Además, se logró comprender que este tipo de dispositivos también presenta un enorme potencial para la adopción de una gran variedad de estrategias en la detección de una amplia gama de especies biomoleculares. Dichas especies incluyen a los marcadores biológicos, los cuales son utilizados como indicadores para procesos biológicos y enfermedades. El monitoreo de estos marcadores puede hacer posible el diagnóstico y detección de enfermedades en las poblaciones, contribuyendo a la obtención de mejores tratamientos para los pacientes y la reducción de costos para los sistemas de salud [87].

Finalmente, se logró visualizar el potencial de este prototipo para el desarrollo de pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Esto debido a que muestra ser un dispositivo con una técnica de fabricación de bajo costo, que no necesita de equipo o infraestructura de alto nivel, ni de personal con alto nivel de especialización para su manipulación. Además de que este tipo de pruebas presenta la posibilidad de ser utilizadas por cualquier profesional en el área de la salud.

La capacidad de producir este tipo de dispositivos para ser implementados como pruebas de diagnóstico en el punto de atención en Guatemala, representa una gran oportunidad para el desarrollo del sistema de salud. Esto debido a que ofrecen alternativas para las pruebas de diagnóstico especializadas que requieren de gran infraestructura y recursos para su implementación. Teniendo como antecedente el contacto que gran parte de la población ha tenido con los biosensores por medio de la utilización de pruebas rápidas de COVID-19 durante la pandemia, la introducción de biosensores de bajo costo como pruebas de diagnóstico en punto de atención permitiría dar acceso a herramientas capaces de contribuir con el monitoreo de la salud en la población. Asimismo, facilitaría la detección y diagnóstico de una gran variedad de enfermedades de manera rápida, accesible y sencilla de interpretar en entornos de escasos recursos.

- Se fabricaron y optimizaron prototipos para dispositivos analíticos basados en papel utilizando las técnicas de inmersión en cera, una propuesta de variación de la técnica de inmersión en cera que permite la fabricación de 6 dispositivos en una inmersión y permeación con cera utilizando papel de cromatografía y papel de filtro.
- A través de la comparación de la formación de áreas hidrofóbicas fuera del área de detección de la muestra en los prototipos fabricados, se seleccionó un prototipo final, el cual consistió en la variación del método de inmersión en cera que utiliza papel de filtro Whatman® grado 4 con cera de parafina a 120 °C (1D/FP4/120).
- Los resultados obtenidos a partir de la implementación del prototipo de dispositivo analítico basado en papel como una prueba de concepto, confirman la viabilidad de la reacción para la detección de diferentes concentraciones de glucosa por medio de la formación del complejo yodo-almidón en conjunto con la amplificación en cascada catalizada por la enzima glucosa oxidasa.
- Existe aún un gran potencial para la optimización de la reacción, lo que podría extender el rango de concentraciones que el dispositivo es capaz de detectar y aumentar su sensibilidad.
- Se logró comprender el potencial de este tipo de dispositivos para la adopción de una gran variedad de estrategias en la detección de una amplia gama de especies biomoleculares. Estas, no solo incluyen a los marcadores biológicos que juegan un papel vital en el monitoreo de la salud en las poblaciones, sino que se pueden ampliar a una gran variedad de campos como el monitoreo de contaminantes en el ambiente, la seguridad alimentaria y el descubrimiento de drogas.
- Se identificó la idoneidad de este tipo de prototipos para ser utilizados en el desarrollo de pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Asimismo, se reconoció el impacto que la habilidad de fabricar este tipo de dispositivos representa para el avance y desarrollo del sistema de salud en países en vías de desarrollo como Guatemala.

Recomendaciones

- Se recomienda investigar alternativas para los papeles de filtro Whatman® grado 1 y grado 4 que permitan reducir aún más los costos de los dispositivos analíticos basados en papel. Esto, tomando en cuenta que sus propiedades no impliquen cambios significativos en los resultados obtenidos con el papel Whatman®.
- En cuanto a los métodos de fabricación para los dispositivos analíticos basados en papel, se recomienda la optimización de la variación del método de inmersión en cera que permite la fabricación de 6 dispositivos en una sola inmersión. Esto se debe a que muestra un gran potencial al basarse en la técnica de inmersión en cera que muestra alta reproducibilidad, y que al mismo tiempo permitiría una fabricación más rápida y eficiente de dispositivos analíticos basados en papel.
- Se recomienda continuar con la optimización de la reacción, de manera que se logre el establecimiento de un dispositivo analítico más sensible y capaz de diferenciar entre un rango más amplio de concentraciones de glucosa. Para ello se sugiere enfocarse en parámetros como la temperatura, el pH y la técnica de inmovilización de la enzima. Adicionalmente, se puede mencionar la optimización del tiempo de incubación de la enzima con la glucosa, la concentración de enzima, el volumen total utilizado para el ensayo en papel, y la utilización de almidón de grado analítico.
- Se recomienda el estudio de la estabilidad, sensibilidad y selectividad del dispositivo analítico basado en papel para la detección de glucosa. Conocer más acerca de la estabilidad de las enzimas y la reacción a través del tiempo permitiría descubrir detalles relacionados con la vida útil de los dispositivos al momento de que sean implementados como pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Por otro lado, la selectividad permitiría estudiar qué tan efectivo será el dispositivo para la detección de glucosa cuando se implemente con matrices más complejas de muestras biológicas, las cuales contienen una gran variedad de compuestos que podrían ser capaces de interferir con la detección del analito.

- El desarrollo de un dispositivo o técnica que permita hacer más portátil el método para el análisis de los resultados colorimétricos obtenidos en el dispositivo de papel, siendo los teléfonos inteligentes una muy buena opción para su implementación.
- Esta plataforma tiene la posibilidad de ser combinada con una gran variedad de elementos de bioreconocimiento, los cuales pueden permitir la detección colorimétrica de una gran variedad de biomoléculas. A raíz de esto, se recomienda estudiar la adaptación de la reacción que involucra el complejo yodo-almidón para la detección colorimétrica con analitos diferentes a la glucosa. Esto debido a que los dispositivos analíticos basados en papel resultantes podrían ser de gran utilidad en entornos de bajos recursos al ser implementados como biosensores de bajo costo.

-
- [1] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano y P. Estrela, "Introduction to biosensors," *Essays in Biochemistry*, vol. 60, n.º 1, págs. 1-8, jun. de 2016, ISSN: 0071-1365. DOI: 10.1042/EBC20150001. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986445/>.
- [2] L. C. Clark y C. Lyons, "ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, n.º 1, págs. 29-45, oct. de 1962, ISSN: 0077-8923, 1749-6632. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x. dirección: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- [3] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications – A review," *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 6, n.º 2, págs. 153-159, mayo de 2016, ISSN: 2212-4268. DOI: 10.1016/j.jobocr.2015.12.002. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862100/>.
- [4] L. A. Pradela-Filho et al., "Paper-based analytical devices for point-of-need applications," *Microchimica Acta*, vol. 190, n.º 179, mayo de 2023, ISSN: 0026-3672, 1436-5073. DOI: 10.1007/s00604-023-05764-5. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/s00604-023-05764-5>.
- [5] L. Ngashangva y S. Chattopadhyay, "Biosensors for point-of-care testing and personalized monitoring of gastrointestinal microbiota," *Frontiers in Microbiology*, vol. 14, mayo de 2023, ISSN: 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1114707. dirección: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1114707/full>.
- [6] M. J. Pioz et al., "A review of Optical Point-of-Care devices to Estimate the Technology Transfer of These Cutting-Edge Technologies," *Biosensors*, vol. 12(12), n.º 1091, nov. de 2022, ISSN: 2079-6374. DOI: 10.3390/bios12121091. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/12/1091>.
- [7] J. Wang, "Electrochemical Glucose Biosensors," *Chemical Reviews*, vol. 108, n.º 2, págs. 814-825, feb. de 2008, ISSN: 0009-2665, 1520-6890. DOI: 10.1021/cr068123a. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr068123a>.

- [8] A. Heller y B. Feldman, "Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management," *Chemical Reviews*, vol. 108, n.º 7, págs. 2482-2505, jul. de 2008, ISSN: 0009-2665, 1520-6890. DOI: 10.1021/cr068069y. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr068069y>.
- [9] V. Kishnani, S. Kumari y A. Gupta, "A Chemometric-Assisted Colorimetric-Based Inexpensive Paper Biosensor for Glucose Detection," *Biosensors*, vol. 12(11), n.º 1008, nov. de 2022, ISSN: 2079-6374. DOI: 10.3390/bios12111008. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/11/1008>.
- [10] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte y G. M. Whitesides, "Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, n.º 8, págs. 1318-1320, feb. de 2007, ISSN: 1433-7851, 1521-3773. DOI: 10.1002/anie.200603817. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200603817>.
- [11] B. Kuswandi y A. A. Ensafi, "Perspective—Paper-Based Biosensors: Trending Topic in Clinical Diagnostics Developments and Commercialization," *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 167, n.º 037509, 2020, ISSN: 0013-4651, 1945-7111. DOI: 10.1149/2.0092003JES. dirección: <https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.0092003JES>.
- [12] A. Kaushik y M. A. Mujawar, "Point of Care Sensing Devices: Better Care for Everyone," *Sensors*, vol. 18(12), n.º 4303, dic. de 2018, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s18124303. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308549/>.
- [13] A. K. Yetisen, M. S. Akram y C. R. Lowe, "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices," *Lab on a Chip*, vol. 13, n.º 12, págs. 2210-2251, mayo de 2013, ISSN: 1473-0189. DOI: 10.1039/C3LC50169H. dirección: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/lc/c3lc50169h>.
- [14] M. Naseri, Z. M. Ziora, G. P. Simon y W. Batchelor, "ASSURED-compliant point-of-care diagnostics for the detection of human viral infections," *Reviews in Medical Virology*, vol. 32, n.º e2263, mar. de 2022, ISSN: 1052-9276, 1099-1654. DOI: 10.1002/rmv.2263. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2263>.
- [15] D. R. Ballerini, X. Li y W. Shen, "Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 13, n.º 5, págs. 769-787, nov. de 2012, ISSN: 1613-4982, 1613-4990. DOI: 10.1007/s10404-012-0999-2. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s10404-012-0999-2>.
- [16] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides y E. Carrilho, "Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices," *Analytical Chemistry*, vol. 82, n.º 1, págs. 3-10, ene. de 2010, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/ac9013989. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac9013989>.
- [17] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul y W. Laiwattanapaisal, "Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping," *Talanta*, vol. 85, n.º 5, págs. 2587-2593, oct. de 2011, ISSN: 1873-3573. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.08.024.

- [18] S. Altundemir, A. K. Uguz y K. Ulgen, "A review on wax printed microfluidic paper-based devices for international health," *Biomicrofluidics*, vol. 11(4), n.º 041501, págs. 1-26, jul. de 2017, ISSN: 1932-1058. DOI: 10.1063/1.4991504. dirección: <https://pubs.aip.org/bmf/article/11/4/041501/133971/A-review-on-wax-printed-microfluidic-paper-based>.
- [19] G. G. Morbioli, T. Mazzu-Nascimento, A. M. Stockton y E. Carrilho, "Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (PADs) - A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 970, págs. 1-22, jun. de 2017, ISSN: 1873-4324. DOI: 10.1016/j.aca.2017.03.037.
- [20] S. Liu, W. Su y X. Ding, "A Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Glucose Detection," *Sensors*, vol. 16(12), n.º 2086, dic. de 2016, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s16122086. dirección: <https://www.mdpi.com/1424-8220/16/12/2086>.
- [21] L. Tang, S. J. Chang, C.-J. Chen y J.-T. Liu, "Non-Invasive Blood Glucose Monitoring Technology: A Review," *Sensors*, vol. 20(23), n.º 6925, 2020, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s20236925. dirección: <https://www.mdpi.com/1424-8220/20/23/6925>.
- [22] National Institutes of Health. "Blood Glucose." (mar. de 2024), dirección: <https://medlineplus.gov/bloodglucose.html> (visitado 03-06-2024).
- [23] P. J. Hantzidiamantis, A. O. Awosika y S. L. Lappin, "Physiology, Glucose," abr. de 2024. dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545201/>.
- [24] P. V. Röder, B. Wu, Y. Liu y W. Han, "Pancreatic regulation of glucose homeostasis," *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 48, n.º 3, e219, mar. de 2016, ISSN: 2092-6413. DOI: 10.1038/emm.2016.6. dirección: <https://www.nature.com/articles/emm20166>.
- [25] Endocrine Society, *Hypoglycemia*, ene. de 2022. dirección: <https://www.endocrine.org/patient-engagement/endocrine-library/hypoglycemia> (visitado 27-07-2024).
- [26] L. S. Hoffman, T. J. Fox, C. Anastasopoulou e I. Jialal, "Maturity Onset Diabetes in the Young," en *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532900/>.
- [27] Cleveland Clinic, *What Is Gestational Diabetes?* Ago. de 2024. dirección: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/9012-gestational-diabetes> (visitado 13-11-2024).
- [28] C. De La Cámara-Moraño, A. B. Ariza-Jiménez y L. Fernández-Ruiz, "Diabetes mellitus neonatal: dos casos, diferente presentación," *Revista Mexicana de Pediatría*, vol. 87, n.º 6, págs. 232-235, 2020, ISSN: 0035-0052. DOI: 10.35366/97686. dirección: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=97686>.
- [29] W.-R. Song, X.-H. Xu, J. Li, J. Yu e Y.-X. Li, "Secondary diabetes due to different etiologies: Four case reports," *World Journal of Clinical Cases*, vol. 12, n.º 16, págs. 2813-2821, jun. de 2024, ISSN: 2307-8960. DOI: 10.12998/wjcc.v12.i16.2813. dirección: <https://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v12/i16/2813.htm>.
- [30] A. D. Deshpande, M. Harris-Hayes y M. Schootman, "Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications," *Physical Therapy*, vol. 88, n.º 11, págs. 1254-1264, nov. de 2008, ISSN: 0031-9023. DOI: 10.2522/ptj.20080020. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870323/>.

- [31] 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, ene. de 2022, ISSN: 1838-7640. DOI: 10.7150/thno.64035. dirección: <https://www.thno.org/v12p0493.htm>.
- [32] R. Weinstock et al., "The Role of Blood Glucose Monitoring in Diabetes Management," *ADA Clinical Compendia*, vol. 2020, n.º 3, págs. 1-32, oct. de 2020, ISSN: 27716872, 27716880. DOI: 10.2337/db2020-31. dirección: <https://diabetesjournals.org/compendia/article/doi/10.2337/db2020-31/144940/The-Role-of-Blood-Glucose-Monitoring-in-Diabetes>.
- [33] S. Subramanian e I. B. Hirsch, "Personalized Diabetes Management: Moving from Algorithmic to Individualized Therapy," *Diabetes Spectrum*, vol. 27, n.º 2, págs. 87-91, mayo de 2014, ISSN: 1040-9165, 1944-7353. DOI: 10.2337/diaspect.27.2.87. dirección: <https://diabetesjournals.org/spectrum/article/27/2/87/32033/Personalized-Diabetes-Management-Moving-from>.
- [34] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), "Biosensor," *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, vol. 3.0.1, 2019. DOI: doi:10.1351/goldbook.B00663. dirección: <https://doi.org/10.1351/goldbook.B00663>.
- [35] V. Naresh y N. Lee, "A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors," *Sensors*, vol. 21(4), n.º 1109, feb. de 2021, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s21041109. dirección: <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/4/1109>.
- [36] P. Damborský, J. Švitel y J. Katrlík, "Optical biosensors," *Essays in Biochemistry*, vol. 60, n.º 1, P. Estrela, ed., págs. 91-100, jun. de 2016, ISSN: 0071-1365, 1744-1358. DOI: 10.1042/EBC20150010. dirección: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/60/1/91/78222/Optical-biosensors>.
- [37] R. Monošík, M. Stred'anský y E. Šturdík, "Biosensors - classification, characterization and new trends," *Acta Chimica Slovaca*, vol. 5, n.º 1, págs. 109-120, abr. de 2012, ISSN: 1337-978X. DOI: 10.2478/v10188-012-0017-z. dirección: <https://content.sciendo.com/doi/10.2478/v10188-012-0017-z>.
- [38] M. S. Makowski y A. Ivanisevic, "Molecular Analysis of Blood with Micro-/Nanoscale Field-Effect-Transistor Biosensors," *Small*, vol. 7(14), págs. 1863-1875, jul. de 2011, ISSN: 1613-6810, 1613-6829. DOI: 10.1002/smll.201100211. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/smll.201100211>.
- [39] M. Pohanka, "Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications," *Materials*, vol. 11(3), n.º 448, mar. de 2018, ISSN: 1996-1944. DOI: 10.3390/ma11030448. dirección: <http://www.mdpi.com/1996-1944/11/3/448>.
- [40] P. Singh, "Surface Plasmon Resonance: A Boon for Viral Diagnostics," en *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, 2017, B9780128096338122459, ISBN: 978-0-12-809633-8. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338122459>.
- [41] Y. Choi, J. H. Hwang y S. Y. Lee, "Recent Trends in Nanomaterials-Based Colorimetric Detection of Pathogenic Bacteria and Viruses," *Small Methods*, vol. 2, n.º 1700351, págs. 1-9, abr. de 2018, ISSN: 2366-9608, 2366-9608. DOI: 10.1002/smt.201700351. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/smt.201700351>.

- [42] M. Herrera-Domínguez, G. Morales-Luna, J. Mahlknecht, Q. Cheng, I. Aguilar-Hernández y N. Ornelas-Soto, "Optical Biosensors and Their Applications for the Detection of Water Pollutants," *Biosensors*, vol. 13(3), n.º 370, mar. de 2023, ISSN: 2079-6374. DOI: 10.3390/bios13030370. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-6374/13/3/370>.
- [43] A. Piriya V.S, P. Joseph, K. Daniel S.C.G., S. Lakshmanan, T. Kinoshita y S. Muthusamy, "Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 78, págs. 1231-1245, sep. de 2017, ISSN: 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.018. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117317198>.
- [44] V. X. T. Zhao, T. I. Wong, X. T. Zheng, Y. N. Tan y X. Zhou, "Colorimetric biosensors for point-of-care virus detections," *Materials Science for Energy Technologies*, vol. 3, págs. 237-249, 2020, ISSN: 2589-2991. DOI: 10.1016/j.mset.2019.10.002. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7148662/>.
- [45] Y. Wu, J. Feng, G. Hu, E. Zhang y H.-H. Yu, "Colorimetric Sensors for Chemical and Biological Sensing Applications," *Sensors*, vol. 23(5), n.º 2749, mar. de 2023, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s23052749. dirección: <https://www.mdpi.com/1424-8220/23/5/2749>.
- [46] K. Abels et al., "Quantitative Point-of-Care Colorimetric Assay Modeling Using a Handheld Colorimeter," *ACS Omega*, vol. 6, n.º 34, págs. 22439-22446, ago. de 2021, ISSN: 2470-1343, 2470-1343. DOI: 10.1021/acsomega.1c03460. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c03460>.
- [47] K. Omidfar, A. Ahmadi, L. Syedmoradi, S. M. Khoshfetrat y B. Larijani, "Point-of-care biosensors in medicine: a brief overview of our achievements in this field based on the conducted research in EMRI (endocrinology and metabolism research Institute of Tehran University of medical sciences) over the past fourteen years," *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, oct. de 2020, ISSN: 2251-6581. DOI: 10.1007/s40200-020-00668-0. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s40200-020-00668-0>.
- [48] P. B. Luppá, C. Müller, A. Schlichtiger y H. Schlebusch, "Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, n.º 6, págs. 887-898, jun. de 2011, ISSN: 01659936. DOI: 10.1016/j.trac.2011.01.019. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993611000860>.
- [49] S. K. Vashist, P. B. Luppá, L. Y. Yeo, A. Ozcan y J. H. Luong, "Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing," *Trends in Biotechnology*, vol. 33, n.º 11, págs. 692-705, nov. de 2015, ISSN: 01677799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.09.001. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001870>.
- [50] E. Noviana et al., "Microfluidic Paper-Based Analytical Devices: From Design to Applications," *Chemical Reviews*, vol. 121, n.º 19, págs. 11835-11885, oct. de 2021, ISSN: 0009-2665, 1520-6890. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01335. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.0c01335>.
- [51] G. Musile et al., "Application of Paper-Based Microfluidic Analytical Devices (μ PAD) in Forensic and Clinical Toxicology: A Review," en *Biosensors*, vol. 13(7), n.º 743, jul. de 2023, ISSN: 2079-6374. DOI: 10.3390/bios13070743. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-6374/13/7/743>.

- [52] D. L. Clegg, "Paper Chromatography," *Analytical Chemistry*, vol. 22, n.º 1, págs. 48-59, ene. de 1950, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/ac60037a014. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60037a014>.
- [53] X. Li, D. R. Ballerini y W. Shen, "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends," *Biomicrofluidics*, vol. 6(1), n.º 1, págs. 1-13, mar. de 2012, ISSN: 1932-1058. DOI: 10.1063/1.3687398. dirección: <https://pubs.aip.org/bmf/article/6/1/011301/923145/A-perspective-on-paper-based-microfluidics-Current>.
- [54] X. Jiang y Z. H. Fan, "Fabrication and Operation of Paper-Based Analytical Devices," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 9, n.º 1, págs. 203-222, jun. de 2016, ISSN: 1936-1327, 1936-1335. DOI: 10.1146/annurev-anchem-071015-041714. dirección: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-anchem-071015-041714>.
- [55] D. M. Cate, J. A. Adkins, J. Mettakoonpitak y C. S. Henry, "Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices," *Analytical Chemistry*, vol. 87, n.º 1, págs. 19-41, ene. de 2015, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/ac503968p. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac503968p>.
- [56] W. Dungehai, O. Chailapakul y C. S. Henry, "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing," *The Analyst*, vol. 136, n.º 1, págs. 77-82, ene. de 2011, ISSN: 0003-2654, 1364-5528. DOI: 10.1039/C0AN00406E. dirección: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C0AN00406E>.
- [57] E. Carrilho, A. W. Martinez y G. M. Whitesides, "Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics," *Analytical Chemistry*, vol. 81, n.º 16, págs. 7091-7095, ago. de 2009, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/ac901071p. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac901071p>.
- [58] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin y B. Lin, "Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay," *ELECTROPHORESIS*, vol. 30, n.º 9, págs. 1497-1500, mayo de 2009, ISSN: 0173-0835, 1522-2683. DOI: 10.1002/elps.200800563. dirección: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.200800563>.
- [59] M. Sher, R. Zhuang, U. Demirci y W. Asghar, "Paper-based analytical devices for clinical diagnosis: recent advances in the fabrication techniques and sensing mechanisms," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 17, n.º 4, págs. 351-366, abr. de 2017, ISSN: 1473-7159, 1744-8352. DOI: 10.1080/14737159.2017.1285228. dirección: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14737159.2017.1285228>.
- [60] T. Songjaroen, J. Noiphung, I. Hongwarittorn, K. Talalak y W. Laiwattanapaisal, "Assay time reduction and thermal stability improvement of a lowcost, wax-dipping paper-based microfluidic device," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 6, n.º 6, págs. 2895-2903, jun. de 2014, ISSN: ISSN : 0975-7384. dirección: <https://www.jocpr.com/abstract/assay-time-reduction-and-thermal-stability-improvement-of-a-lowcost-waxdipping-paperbased-microfluidic-device-4757.html>.
- [61] P. Chaikhan, Y. Udnan, R. Sananmuang, R. J. Ampiah-Bonney y W. Chuachud Chaiyasith, "A low-cost microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) with column chromatography preconcentration for the determination of paraquat in vegetable samples," *Microchemical Journal*, vol. 159, n.º 105355, págs. 1-9, dic. de 2020, ISSN:

- 0026265X. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105355. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X20309401>.
- [62] A. K. Govindarajalu, M. Ponnuchamy, B. Sivasamy, M. V. Prabhu y A. Kapoor, "A cellulosic paper-based sensor for detection of starch contamination in milk," *Bulletin of Materials Science*, vol. 42, n.º 255, págs. 1-6, dic. de 2019, ISSN: 0250-4707, 0973-7669. DOI: 10.1007/s12034-019-1958-2. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s12034-019-1958-2>.
- [63] E.-H. Yoo y S.-Y. Lee, "Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice," *Sensors*, vol. 10, n.º 5, págs. 4558-4576, mayo de 2010, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s100504558. dirección: <https://www.mdpi.com/1424-8220/10/5/4558>.
- [64] O. Amor-Gutiérrez, E. Costa-Rama y M. T. Fernández-Abedul, "Paper-Based Enzymatic Electrochemical Sensors for Glucose Determination," *Sensors*, vol. 22(16), n.º 6232, ago. de 2022, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s22166232. dirección: <https://www.mdpi.com/1424-8220/22/16/6232>.
- [65] P. Martinkova y M. Pohanka, "Biosensors for Blood Glucose and Diabetes Diagnosis: Evolution, Construction, and Current Status," *Analytical Letters*, vol. 48, n.º 16, págs. 2509-2532, nov. de 2015, ISSN: 0003-2719, 1532-236X. DOI: 10.1080/00032719.2015.1043661. dirección: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2015.1043661>.
- [66] W. Dungchai, O. Chailapakul y C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices," *Analytica Chimica Acta*, vol. 674, n.º 2, págs. 227-233, ago. de 2010, ISSN: 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.019. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010007853>.
- [67] S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal y L. Ananthanarayan, "Glucose oxidase — An overview," *Biotechnology Advances*, vol. 27, n.º 4, págs. 489-501, jul. de 2009, ISSN: 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975009000536>.
- [68] J. Vasquez, *Crayon Mold*, Modelo 3D, oct. de 2020. dirección: <https://www.thingiverse.com/thing:4611910/files> (visitado 23-08-2024).
- [69] H. T. Sahin y M. B. Arslan, "A Study on Physical and Chemical Properties of Cellulose Paper Immersed in Various Solvent Mixtures," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 9, n.º 1, págs. 78-88, ene. de 2008, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms9010078. dirección: <https://www.mdpi.com/1422-0067/9/1/78>.
- [70] S. Sudarsan, P. Shetty, R. Chinnappan y N. K. Mani, "Tuning Hydrophobicity of Paper Substrates for Effective Colorimetric detection of Glucose and Nucleic acids," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 415, n.º 26, págs. 6449-6460, nov. de 2023, ISSN: 1618-2642, 1618-2650. DOI: 10.1007/s00216-023-04921-2. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/s00216-023-04921-2>.
- [71] C. Cordt, J. Daeg, O. Elle, A. Geissler y M. Biesalski, "Innovative Paper Coatings: Regenerative Superhydrophobicity through Self-Structuring Aqueous Wax-Polymer Dispersions," *Coatings*, vol. 14(8), n.º 1028, ago. de 2024, ISSN: 2079-6412. DOI: 10.3390/coatings14081028. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-6412/14/8/1028>.
- [72] S. Keller, *Celebrating Paper: Why Paper Thrives in a Digital World*, 2019. dirección: <https://www.acs.org/education/chemmatters/past-issues/2018-2019/april-2019/why-paper-thrives-in-digital-age.html> (visitado 06-11-2024).

- [73] S. Bhattacharya, *Paper Microfluidics: Theory and Applications* (Advanced Functional Materials and Sensors Ser), eng. Singapore: Springer Singapore Pte. Limited, 2019, ISBN: 9789811504884 9789811504891.
- [74] A. Marmur, "The radial capillary," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 124, n.º 1, págs. 301-308, jul. de 1988, ISSN: 00219797. DOI: 10.1016/0021-9797(88)90351-7. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021979788903517>.
- [75] K. Aterman, "A historical note on the iodine-sulphuric acid reaction of amyloid," *Histochemistry*, vol. 49, n.º 2, págs. 131-143, 1976, ISSN: 0301-5564, 1432-119X. DOI: 10.1007/BF00495677. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/BF00495677>.
- [76] M.-M. Liu et al., "A colorimetric assay for sensitive detection of hydrogen peroxide and glucose in microfluidic paper-based analytical devices integrated with starch-iodide-gelatin system," *Talanta*, vol. 200, págs. 511-517, ago. de 2019, ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.03.089. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914019303479>.
- [77] M. Sosa Romero y P. Galvis Franco, *CHARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA (GOX) (EC 1.1.3.4.) LIBRE E INMOVILIZADA EN DOS SOPORTES (ALGINATO DE SODIO Y AGAROSA) PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO*. 2010. dirección: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/1538/2010-31P-10.pdf?sequence=1> (visitado 14-11-2024).
- [78] Y. Liu, L. Lei y Z. Zhang, "An ultrasensitive colorimetric immunoassay based on glucose oxidase catalyzed cascade formation of blue-black iodine-starch complex," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 248, págs. 195-200, sep. de 2017, ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2017.03.142. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400517305695>.
- [79] J. Nie, T. Brown e Y. Zhang, "New two dimensional liquid-phase colorimetric assay based on old iodine-starch complexation for the naked-eye quantitative detection of analytes," en *Chemical Communications*, vol. 52, n.º 47, págs. 7454-7457, 2016, ISSN: 1359-7345, 1364-548X. DOI: 10.1039/C6CC01529H. dirección: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C6CC01529H>.
- [80] C. M. Wong, K. H. Wong y X. D. Chen, "Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 78, n.º 6, págs. 927-938, abr. de 2008, ISSN: 0175-7598, 1432-0614. DOI: 10.1007/s00253-008-1407-4. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1407-4>.
- [81] Creative Commons, *Introduction to Chemistry: General, Organic, and Biological*. dic. de 2024, vol. 1.0. dirección: <https://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/s21-07-enzyme-activity.html>.
- [82] J. H. Pazur, "[18] Glucose oxidase from *Aspergillus niger*," en *Methods in Enzymology*, vol. 9, Elsevier, 1966, págs. 82-87, ISBN: 978-0-12-181809-8. DOI: 10.1016/0076-6879(66)09022-0. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687966090220> (visitado 06-11-2024).
- [83] S. Das, M. K. Dey, R. Devireddy y M. R. Gartia, "Biomarkers in Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis," *Sensors*, vol. 24(1), n.º 37, dic. de 2023, ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s24010037. dirección: <https://www.mdpi.com/1424-8220/24/1/37>.

- [84] L. Riley, *Mean fasting blood glucose*. dirección: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/2380> (visitado 06-11-2024).
- [85] T. Jesionowski, J. Zdarta y B. Krajewska, "Enzyme immobilization by adsorption: a review," *Adsorption*, vol. 20, n.º 5-6, págs. 801-821, ago. de 2014, ISSN: 0929-5607, 1572-8757. DOI: 10.1007/s10450-014-9623-y. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s10450-014-9623-y>.
- [86] M. R. Khan, "Immobilized enzymes: a comprehensive review," en, *Bulletin of the National Research Centre*, vol. 45, n.º 1, pág. 207, dic. de 2021, ISSN: 2522-8307. DOI: 10.1186/s42269-021-00649-0. dirección: <https://BNRC.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-021-00649-0>.
- [87] Y. Jiang et al., "Pros and Cons in Various Immobilization Techniques and Carriers for Enzymes," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, ene. de 2024, ISSN: 0273-2289, 1559-0291. DOI: 10.1007/s12010-023-04838-7. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/s12010-023-04838-7>.

