



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**CINTA PARA DETECCIÓN COLORIMÉTRICA MULTI-
SENSORIA PARA MARCADORES DE DAÑO RENAL**

T E S I S

**QUE COMO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:
JULIO CÉSAR LÓPEZ RIVAS**

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Alejandra Álvarez López

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.



La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

**Especialidad en Ingeniería en
Nanotecnología**



**“CINTA PARA DETECCIÓN COLORIMÉTRICA MULTI-
SENSORIA PARA MARCADORES DE DAÑO RENAL”**

TESIS

Que como para obtener el grado de
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

Julio César López Rivas

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Presidente

Dra. Alejandra Álvarez López

Secretario

Dr. Andrés Dector Espinoza

Vocal

Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez

Suplente

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Mayo, 2024

México

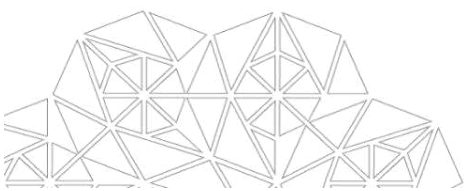


RESUMEN

Hoy en día, la búsqueda y el desarrollo de sensores y biosensores en el área médica, está tomando mucha importancia debido a la presencia de nuevas enfermedades y de los índices, cada vez mayores, en enfermedades ya conocidas. La importancia de estos recae en que suelen ser o se dirigen a ser fáciles de usar, a precios más accesibles y con mejores resultados que los métodos comunes. Existen enfermedades, como es el caso de la enfermedad renal crónica (ERC), que se catalogan como silenciosas, debido a que no suelen presentar síntomas o signos, sino hasta etapas avanzadas e irreversibles, de ahí la importancia de desarrollar biosensores seguros y confiables que permitan tanto la prevención, como el control y el seguimiento de cualquier tipo de enfermedad. Aunado a ello, el uso de la nanotecnología ha permitido desarrollar este tipo de sistemas de evaluación y control con mejores resultados en cuanto a que puede conducir a un mayor rendimiento del biosensor, lo que se incluye una mayor sensibilidad y un bajo límite de detección de varios órdenes de magnitud, mostrando una mayor actividad química, resistencia mecánica, propiedades electrocatalíticas y difusividad mejorada, todo lo anterior gracias a las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales, que a su vez los hacen bastante útiles para la inmovilización.

En este trabajo se desarrolló un biosensor colorimétrico de cuatro sistemas de reconocimiento principales (tipo A) usando enzimas para la evaluación de analitos relacionados con la ERC, y otro sistema basado en cambios de pH (tipo B). Para cada sistema de reconocimiento tipo A se usó una misma estructura general la cual fue funcionalizar nanoesferas de quitosano con una enzima específica y un agente cromogénico afín a las reacciones que se generarían entre enzima-analito, y para el sistema tipo B es lo mismo omitiendo solamente la funcionalización con una enzima. De manera general los resultados fueron satisfactorios obteniendo a partir de las curvas de calibración de las pruebas colorimétricas, coeficientes de determinación por arriba de 0.92 en el total de las pruebas, y límites de detección bastante aceptables y competentes. Además, de la prueba de interferentes se obtuvo que no hay moléculas que estén generando señales inhibitoras o potenciadoras a las señales de interés.

Palabras clave: Biosensor, nanotecnología, enzima, colorimetría, enfermedad renal crónica.



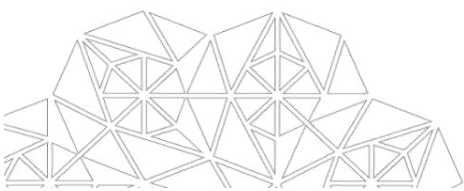


SUMMARY

Nowadays, the search for and development of sensors and biosensors in the medical area is gaining importance due to the presence of new diseases and the increasing rates of already known diseases. The importance of these lies in the fact that they are usually or are intended to be easy to use, at more accessible prices and with better results than common methods. There are diseases, such as chronic kidney disease (CKD), which are classified as silent, because they do not usually present symptoms or signs until advanced and irreversible stages, hence the importance of developing safe and reliable biosensors that allow both prevention and control and monitoring of any type of disease. In addition, the use of nanotechnology has allowed the development of this type of evaluation and control systems with better results in that it can lead to greater biosensor performance, including greater sensitivity and a low detection limit of several orders of magnitude, showing greater chemical activity, mechanical resistance, electrocatalytic properties and improved diffusivity, all thanks to the physicochemical properties of nanomaterials, which in turn make them quite useful for immobilization.

In this work we developed a colorimetric biosensor with four main recognition systems (type A) using enzymes for the evaluation of analytes related to CKD, and another system based on pH changes (type B). For each type A recognition system the same general structure was used which was to functionalize chitosan nanospheres with a specific enzyme and a chromogenic agent related to the reactions that would be generated between enzyme-analyte, and for the type B system it is the same omitting only the functionalization with an enzyme. In general, the results were satisfactory, obtaining from the calibration curves of the colorimetric tests, determination coefficients greater than 0.92 for each of the tests, and quite acceptable and competent detection limits. In addition, the interferent test showed that there are no molecules that are generating inhibitory or potentiating signals to the signals of interest.

Keywords: Biosensor, nanotechnology, enzyme, colorimetry, chronic kidney disease.

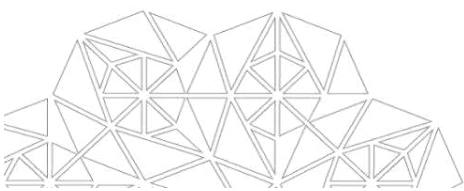




DEDICATORIA

Con mucho cariño y respeto a mis padres, que siempre han depositado su confianza en mí y que me han apoyado en innumerables ocasiones y de incontables maneras para poder lograr todo aquello que me propongo. Quisiera permitirme dejar en claro que no solo es un logro mío, sino de ustedes también, que han estado en todo este proceso, que se dice fácil, pero que hay mucho esfuerzo y sacrificio detrás de ambas partes. A mi hermano que siempre ha estado ahí cuando necesito de él, y que, de igual manera, me ha apoyado incondicionalmente y de quien ciertamente he aprendido muchas cosas. A mi abuelita María y a mi familia que siempre han estado al pendiente de uno, echándonos porras y alentándonos a perseguir nuestros sueños.

De manera especial a mis abuelitos, Jesús, Florentino, y Julia, que de igual manera siempre apoyaban mis ideas, y que donde sea que se encuentren ahora mismo, que sepan que aquel muchachito que tenía grandes sueños, ha comenzado a lograrlos. Gracias por todo lo que hicieron por y para mí, porque gracias a ello he tenido la fuerza y el valor suficiente para lograr lo que he logrado.





AGRADECIMIENTOS

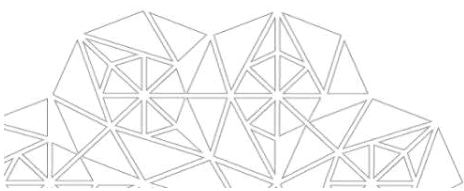
Agradezco infinitamente con todo el amor que les tengo a mis padres, Jesús López Laurencia y María de la Luz Rivas Morales, por siempre estar conmigo, incluso a distancia con esa llamada diaria que me hacían en mi condición de foráneo, fortaleciéndome de cierta manera y no dejándome caer, haciendo que los días pesados se hicieran más fáciles de llevar preguntándome como me iba y dándome ánimos, haciéndome sentir como si estuviera en casa, y por permitirme estudiar esta carrera que siempre había querido.

A mi hermano y a mi familia por siempre apoyarme, alentarme y depositar su confianza en mí. Que sepan que estaré eternamente agradecido por todo lo que han puesto a mi disposición para poder lograrlo. Y así como confiaron, es mi turno de hacerles ver que no se equivocaron, comenzando con este logro.

Al Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa, la Dra. Alejandra Álvarez López, al Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez y al Dr. Andrés Dector Espinoza, por toda la confianza, esfuerzo, dedicación y paciencia que me han brindado hasta el momento. Por todo lo que aprendí de ustedes de esa manera tan agradable y amigable en que siempre la brindaron, generando confianza en uno para hacer las cosas. Y por todas las oportunidades que me han brindado para mi crecimiento tanto profesional, académico y personal. De igual manera, a la Dra. Vanessa Vallejo Becerra por permitirme formar parte del laboratorio y enriquecer mis conocimientos en el área de biosensores.

A todos los docentes: de preescolar, primaria, secundaria, prepa y universidad; que de cierta manera pusieron su granito de arena para lograr que aquel niño, adolescente o joven, llegara a ser lo que hoy es. Gracias por alimentar y fomentar el espíritu científico y de búsqueda de conocimiento en mí.

A mi amigo de casi toda la vida, el Ingeniero Johannes Pedro, que siempre me ha apoyado y con quien he tenido la fortuna de compartir muchas experiencias y vivencias, tanto académicas como personales, y con quien sé que siempre puedo confiar. De igual manera, a su familia Martínez Morales que me ha brindado su apoyo y con quienes he hecho una buena amistad.





A todos los excelentes amigos que la universidad me permitió conocer y tener en esta vida, los ingenieros: Cristian Arreola, Luis Jiménez, Alondra Quirino, Jesús Pineda, Brandon Ortiz, Carlos Ruíz, América Rodríguez, Alberto Hernández, Alejandra Torres, Mónica Magallón; de quienes su apoyo fue prescindible para poder culminar con este enorme logro en la vida de su gran amigo, y con quienes espero en un futuro, tener más historias que contar.

A todos los miembros y grandes amigos del Laboratorio de Biosensores BIOSENS de la Facultad de Ingeniería, con y de quienes he aprendido y compartido muchas experiencias y conocimientos, y con quienes he pasado muy buenos momentos. De igual manera, espero con mucho cariño que esta amistad perdure por muchos años más.

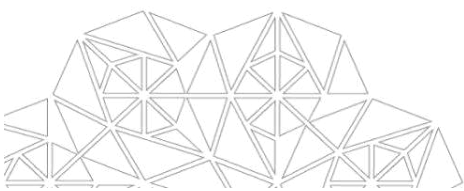
A la Universidad Autónoma de Querétaro y al proyecto FIN202211 del Fondo para el Desarrollo del Conocimiento FONDEC-UAQ2022 por los recursos, espacios y tiempos ofrecidos para poder llevar a cabo esta investigación, agradecido de todas las oportunidades y apoyos que se le han brindado a un servidor.

A todos los amigos que me he encontrado durante mi paso en esta vida, quienes de igual manera siempre tuvieron fe en mí, en ese muchacho que le gustaba hacer reír a los demás, quizás porque siempre he pensado que la comedia es parte crucial para disfrutar la vida, no lo sé. Que sepan que los llevo con mucho cariño en el corazón y muchas gracias por confiar en mí y por alentarme a cumplir mis sueños.

De hecho, ya que mencione lo de la comedia, me gustaría citar en profundo agradecimiento a todos los mencionados, y los que quizás se me escapan en estos momentos la frase que, desde mi punto de vista, muy acertadamente un comediante dijo: *El agradecimiento, es la memoria del corazón*. No tengo más palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, en verdad muchísimas gracias a todos, atesorare por siempre todo lo que han hecho.

Agradezco finalmente a la vida, por permitirme disfrutar de todo este proceso, con todas las maravillosas personas con quienes me he encontrado en este camino.

¡Que brille la luz del conocimiento, por sobre la oscuridad de la ignorancia!

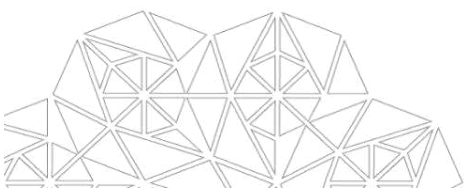




ÍNDICE GENERAL

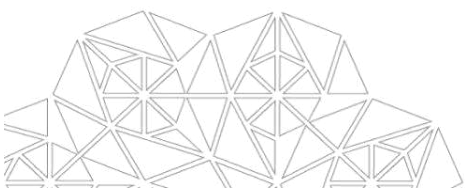
Contenido

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. ANTECEDENTES	9
4.1. Daño renal	9
4.2. Diagnóstico para daño renal	20
4.3. Daño renal en México	25
4.4. Biomarcadores	27
4.5. Creatinina en daño renal	31
4.6. Creatina en daño renal	37
4.7. Urea en daño renal	42
4.8. Biosensores	46
4.9. Biosensores colorimétricos	52



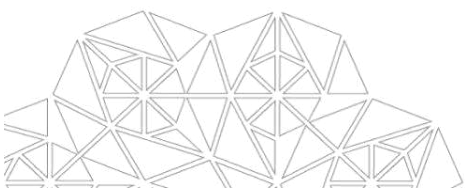


4.10.	Biosensores colorimétricos microfluídicos	55
4.11.	Colorimetría.....	61
4.12.	Enzimas como bioreceptores en biosensores catalíticos	67
4.13.	Creatinasa	72
4.14.	Creatininasa	75
4.15.	Ureasa	77
4.16.	Sarcosina oxidasa	80
4.17.	pH en orina	82
4.18.	Inmovilización de enzimas	85
4.19.	Nanoesferas de quitosano	89
5.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	93
5.1.	Hipótesis.....	93
5.2.	Objetivos	93
5.2.1.	Objetivo General.....	93
5.2.2.	Objetivos específicos	93
6.	METODOLOGÍA.....	94
6.1.	Ensayos enzimáticos	94
6.1.1.	Ensayo enzimático de la creatininasa	94
6.1.2.	Ensayo enzimático de la creatinasa.....	97
6.1.3.	Ensayo enzimático de la sarcosina oxidasa	98
6.1.4.	Ensayo enzimático de la ureasa	99
6.2.	Diseño del prototipo.....	101





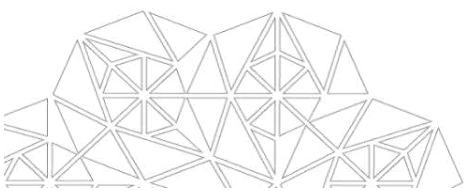
6.3.	Nanoesferas de quitosano.....	104
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
7.1.	Caracterización de las nanoesferas de quitosano	105
7.1.1.	Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las nanoesferas de quitosano	105
7.1.2.	Caracterización por espectroscopia Raman de las nanoesferas de quitosano 107	
7.2.	Evaluación enzimática de la enzima ureasa	109
7.2.1.	Evaluación de la actividad enzimática de la enzima ureasa	109
7.2.2.	Evaluación del acoplamiento enzimático de la enzima ureasa	113
7.3.	Pruebas colorimétricas para detección enzimática.....	114
7.3.1.	Determinación colorimétrica de urea por distancias Euclidianas	115
7.3.2.	Determinación colorimétrica de sarcosina por distancias Euclidianas	120
7.3.3.	Determinación colorimétrica de creatina por distancias Euclidianas	125
7.3.4.	Determinación colorimétrica de creatinina por distancias Euclidianas	130
7.4.	Pruebas de interferentes	135
7.4.1.	Prueba de interferentes para la urea	135
8.	CONCLUSIONES.....	137
9.	MEJORAS A FUTURO	139
10.	REFERENCIAS.....	140





ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales similitudes y diferencias entre los dos tipos de insuficiencia renal: Insuficiencia Renal Aguda (IRA) e Insuficiencia Renal Crónica (IRC).	17
Tabla 2. Aspectos básicos destacables para la comprensión del funcionamiento de los biosensores.....	51
Tabla 3. Clasificación de las enzimas de acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.	71
Tabla 4. Preparación de estándares para curva de estandarización del ensayo enzimático de creatinasa.	95
Tabla 5. Cantidades de solución estándar de creatina para cada estándar del ensayo enzimático de creatinasa.	95
Tabla 6. Cantidades de agua desionizada para cada estándar del ensayo enzimático de creatinasa.	96
Tabla 7. Preparación de estándares para la prueba colorimétrica del ensayo enzimático de ureasa.	100
Tabla 8. Tabla comparativa del límite de detección de urea con respecto a otros trabajos.	119
Tabla 9. Tabla comparativa del límite de detección de sarcosina con respecto a otros trabajos.	124
Tabla 10. Tabla comparativa del límite de detección de creatina con respecto a otros trabajos.	129
Tabla 11. Tabla comparativa del límite de detección de creatinina con respecto a otros trabajos.....	134





INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Representación de los riñones desde la vista posterior (Imagen creada a partir del software Anatomía – Atlas 3D Catfih Animation Studio S.r.l.).....	9
Fig. 2. Anatomía del riñón. Corte transversal del riñón derecho que muestra los componentes de este (Imagen creada en BioRender a partir de imágenes tomadas del software Anatomía – Atlas 3D Catfih Animation Studio S.r.l.).....	10
Fig. 3. Representación de la nefrona y sus partes (Imagen creada en BioRender a partir de imágenes del software Anatomía – Atlas 3D Catfih Animation Studio S.r.l.).....	11
Fig. 4. Distribución de porcentajes de prevalencia y mortalidad de ERC para el año 2017 a nivel mundial (Imagen tomada del Institute for Health Metrics and Evaluation).	20
Fig. 5. Métodos comunes para el diagnóstico del daño renal.....	24
Fig. 6. Distribución de porcentajes de prevalencia y mortalidad de ERC en los estados de México, así como la distribución de porcentajes por Estado y género para el año 2019 (Imagen tomada del Institute for Health Metrics and Evaluation).	26
Fig. 7. Estructura química de la molécula de creatinina.	34
Fig. 8. Estructura química de la molécula de creatina.....	38
Fig. 9. Estructura química de la molécula de urea.	43
Fig. 10. Esquema básico de los componentes de un biosensor (Imagen generada en BioRender.com).....	47
Fig. 11. Esquema básico general de un biosensor colorimétrico. El complejo cromogénico incluye al elemento de reconocimiento biológico (Imagen generada en BioRender.com). ..	53
Fig. 12. Esquema del principio básico de los biosensores microfluídicos colorimétricos. ..	57
Fig. 13. Representación gráfica de los diferentes espacios de color.	62
Fig. 14. Estructura tridimensional de la enzima creatinasa.	73
Fig. 15. Estructura tridimensional de la enzima creatininasa.	76

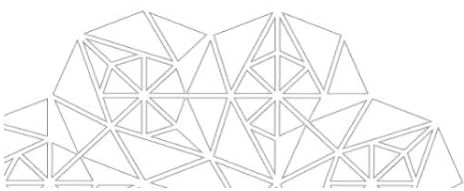


Fig. 16. Estructura tridimensional de la enzima ureasa.....	78
Fig. 17. Estructura tridimensional de la enzima sarcosina oxidasa.....	81
Fig. 18. Representación gráfica de los métodos de inmovilización de enzimas (Creada en BioRender.com).....	86
Fig. 19. Esquema representativo con medidas del prototipo de la cinta sensora multicolorimétrica en un pañal común para adulto mayor.	102
Fig. 20. Esquema de la distribución de capas integrando la capa de la cinta sensora o mejor llamada cinta biosensora, junto con la representación de la cinta de extracción.....	103
Fig. 21. Imagen SEM de las nanopartículas (nanoesferas) de quitosano obtenidas y su distribución de tamaños. a) Imagen SEM con resolución de 40 μm , b) Análisis de áreas realizada con el software ImageJ, c) distribución de la frecuencia de áreas de las nanopartículas, y d) Paneo de algunas nanopartículas mayores a 1000 nm.	107
Fig. 22. Espectro Raman para las nanoesferas de quitosano (NEQ).....	108
Fig. 23. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima ureasa en estado libre e inmovilizada.	111
Fig. 24. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la enzima ureasa en estado libre e inmovilizada.	112
Fig. 25. Curvas de acoplamiento enzimático para la inmovilización enzimática de la enzima ureasa sobre macro y nano esferas de quitosano.	114
Fig. 26. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de urea.	115
Fig. 27. Curva de calibración para determinación de concentración de urea a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas.....	116
Fig. 28. Regresión lineal para la curva de calibración para determinación de concentración de urea.....	117

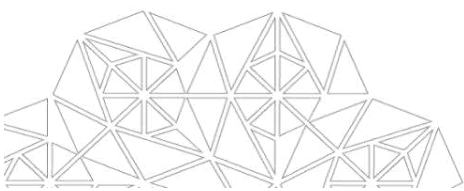




Fig. 29. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de urea en la prueba colorimétrica..... 117

Fig. 30. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de urea. 118

Fig. 31. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de urea. 119

Fig. 32. Descomposición de los valores RGB obtenidos para las pruebas colorimétricas de sarcosina. 121

Fig. 33. Curva de calibración y regresión lineal para la determinación de concentración de sarcosina a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas..... 122

Fig. 34. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de sarcosina..... 122

Fig. 35. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de sarcosina. 123

Fig. 36. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de sarcosina. 124

Fig. 37. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de creatina..... 126

Fig. 38. Curva de calibración y regresión lineal para la determinación de concentración de creatina a partir de los valores RGB por el método de distancias Euclidianas. 127

Fig. 39. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de creatina..... 127

Fig. 40. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de creatina..... 128

Fig. 41. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de creatina..... 129

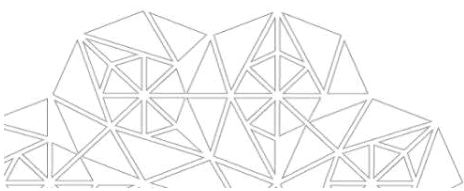




Fig. 42. Descomposición de los valores RGB obtenidos para las pruebas colorimétricas de creatinina. 131

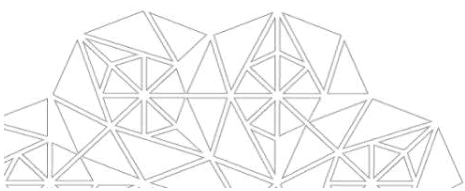
Fig. 43. Curva de calibración y regresión lineal para la determinación de concentración de creatinina a partir de los valores RGB por el método de distancias Euclidianas. 132

Fig. 44. Mapa de colores del espacio RGB para cada una de las concentraciones de creatinina. 133

Fig. 45. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de creatinina..... 133

Fig. 46. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de creatinina. 134

Fig. 47. Prueba de interferentes para detección de urea en presencia de distintos analitos. 136





1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos del ciclo de la urea (TCU) resultan de alteraciones en las funciones bioquímicas y fisiológicas del metabolismo, que afectan la excreción del exceso de nitrógeno en los mamíferos, es decir, resultan de deficiencias hereditarias en alguna de las seis enzimas o de los dos aminoácidos transportadores en la ruta del ciclo de la urea. Los pacientes con TCU pueden presentarse casi a cualquier edad, sin embargo, hay ciertas etapas durante el crecimiento en las cuales hay mayor probabilidad de desarrollar síntomas debido al estrés metabólico, y estas son: el periodo neonatal (que es la más común, llegando a representar el 60 % de los casos) a consecuencia de déficits enzimáticos completos, durante la infancia tardía a causa de la disminución de anticuerpos maternos y el consiguiente desarrollo de infecciones, y en la pubertad debido al cambio en la tasa de crecimiento y factores psicosociales que pueden producir una descompensación (Crespo, 2018; Leonard, 2006).

Los síntomas iniciales típicos son: mala alimentación, vómitos, pérdida de la termorregulación con una disminución de la temperatura central y somnolencia. Los síntomas pueden progresar llegando a edema cerebral y signos relacionados de letargo, anorexia, visión borrosa, hiperventilación o hipoventilación, hipotermia, convulsiones, posturas neurológicas e incluso llegar a un estado de coma o muerte, todo acompañado de un patrón de electroencefalograma (EEG) encefalopático (onda lenta) y atrofia cerebral no inespecífica (Ah Mew *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2002; Barmore *et al.*, 2021). En adultos los pacientes comúnmente presentan una enfermedad neurológica más evidente, seguidos de alteraciones hepáticas, gastrointestinales y psiquiátricas, y el cuadro sintomático puede presentarse con migraña crónica, ataxia, disartria, vómitos recurrentes, anorexia, trastornos psiquiátricos como hiperactividad, alteración del estado del ánimo, agresividad, encefalopatía, catatonía, y alucinaciones visuales (Crespo, 2018; Ortega, 2018; Leonard, 2006).

Recientemente, el monitoreo de biofluidos ha posicionado a la orina como un candidato no invasivo para el diagnóstico clínico ya que contiene diversa información fisiológica. Los procedimientos ideales del análisis de orina son considerados como simples, rápidos, sensibles con mucha independencia técnica, y principalmente prácticos. Sin embargo, las tecnologías para este tipo de análisis llegan a ser muy tediosas por la cantidad de pasos secuenciales necesarios para poder obtener una respuesta, por lo cual no es favorable, por

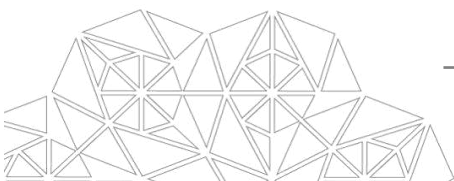


ejemplo, para pacientes con incontinencia urinaria o que no pueden controlar conscientemente la micción (He *et al.*, 2020).

En la actualidad, los biosensores desempeñan un papel crucial en la sociedad, ya que se utilizan para detectar drogas, contaminantes, microorganismos patógenos y para el diagnóstico y monitoreo de marcadores de enfermedades en fluidos corporales como sangre, orina, saliva y sudor, entre otros (Bhalla *et al.*, 2016). De igual manera, gracias a la gran popularidad que han ganado los dispositivos portátiles, pueden emplearse para evaluar las condiciones de salud y el estado físico de la población, permitiendo monitorear factores clave como lo es la frecuencia cardíaca, presión arterial, seguimiento de calorías, conteo de pasos, etc. (Koh *et al.*, 2016). En los últimos años, los métodos de análisis colorimétricos han ganado gran importancia ya que mejoran la operacionalización de los biosensores (Encyclopedia, 2021). Implica el sustituir las respuestas subjetivas como “azul claro”, “púrpura oscuro”, “oro brillante”, por un sistema numérico objetivo, es decir, una especificación numérica precisa de un color determinado, por ejemplo, un valor del sistema RGB (Red, Green, Blue) (Gilchrist *et al.*, 2017).

La adopción generalizada de los teléfonos inteligentes entre casi todos los grupos de edad e ingresos, constituye una oportunidad para desarrollar aplicaciones móviles de salud y accesorios para estos dispositivos, lo que puede contribuir a reducir costos y mejorar la accesibilidad a los servicios de salud (Oncescu, *et al.*, 2013). De igual manera, los avances en la tecnología avanzada y sofisticada de las cámaras de los teléfonos inteligentes, junto con el desarrollo de biosensores colorimétricos, han generado nuevas opciones para leer y medir los niveles de diversos biomarcadores en distintos fluidos biológicos mediante el análisis de color, utilizando procesos colorimétricos de las reacciones químicas donde detecta ópticamente analitos en muestras de sangre, sudor, saliva, etc. (Cornell Universit, 2013). Las técnicas de bioanálisis tradicionales, tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la espectroscopia UV- vis, la cromatografía líquida- espectrometría de masas, entre otras, se han utilizado ampliamente para determinar diversos analitos, sin embargo no siempre existe una detección confiable a bajas concentraciones.

Además, este tipo de equipos son muy caros y de operación compleja, teniendo la necesidad de ser manipulados por personal capacitado o especializado, añadiendo que la detección toma





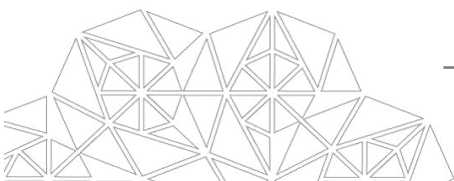
mucho tiempo (Liu *et al.*, 2020). Por ello, el desarrollo de biosensores es prometedor para mejorar el proceso de análisis y se presenta como una gran alternativa ya que se busca que puedan monitorear en el punto de atención en dispositivos portátiles, además de que reduce el tiempo de detección, la cantidad de muestra, costos, teniendo una gran selectividad para detección de biomarcadores (Haleem *et al.*, 2021; Koh *et al.*, 2016).

Debido a su precisión analítica, sería ingenuo creer que la investigación de biosensores se limita a un solo nicho, y se puede ver claramente porque ha llevado a un rápido crecimiento en el desarrollo e investigación de estos, en las últimas décadas (Bhalla *et al.*, 2016). Además, la introducción de esta tecnología ha tenido un impacto significativo en la sociedad, facilitando a los centros sanitarios el proceso clínico para problemas de daño renal, e incluso diseñados para ser una herramienta de análisis fiable y sencilla sin necesidad de conocimientos múltiples y profesionales, por ende, puede ser operado en todo momento y en cualquier lugar por los propios pacientes con problemas de daño renal, evitando los procesos de análisis clínicos convencionales que generalmente tienen altos costos, son de operación compleja, son de largo tiempo de respuesta, y con una mayor probabilidad de resultados falsos-positivos (Bhalla *et al.*, 2016; Haleem *et al.*, 2021). Por ello, la detección y monitoreo en tiempo real de la creatinina y urea es de gran importancia para el control, prevención y diagnóstico de ciertos trastornos generados por problemas de daño renal, como los TCU que pueden provocar hasta el deceso si no es detectado a tiempo (Ah Mew *et al.*, 2003; Cornell Universit, 2013).

Es por ello que en este trabajo se revisarán los aspectos enzimáticos y bioquímicos de los biomarcadores específicos asociados a problemas de enfermedad renal, para desarrollar un dispositivo de biosensado múltiple basado en cinta, utilizando ensayos bioquímicos colorimétricos que permitan medir los niveles de urea y creatinina con interés clínico en pacientes con enfermedad renal. De igual manera, se involucrará técnicas de telemedicina, objetivo que se persigue mediante la creación de una aplicación para smartphones que combine el procesamiento de imágenes con la utilización de dichos dispositivos, que nos permita registrar los cambios en los ensayos colorimétricos y, por ende, los cambios del triplete RGB de la prueba que nos permitirá la lectura colorimétrica enzimática para determinar las concentraciones de creatinina y urea en rangos que son fisiológicamente



relevantes. Este conjunto de un sistema de biosensores basado en teléfonos inteligentes puede generar oportunidades potenciales para la detección y monitoreo clínico no invasivo de enfermedades renales.





2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

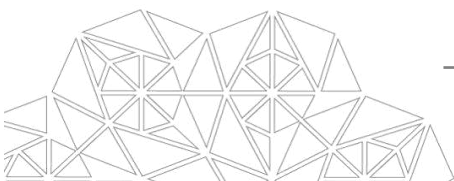
La enfermedad renal crónica (ERC) es altamente prevalente en todo el mundo, afectando más del 10 % de la población mundial, con un impacto notable la población de adultos mayores, llegando a afectar a más del 50 % de aquellos mayores a 70 años (Mora-Gutiérrez *et al.*, 2017; Levey *et al.*, 2015; Ellam *et al.*, 2016). El problema se torna aún más de especial cuidado ya que en muchos países, principalmente aquellos desarrollados, el número de personas mayores está creciendo debido a la reducción de la mortalidad y el incremento de la población de la generación de baby boomers (Maw *et al.*, 2013).

El análisis de urea junto con el de creatinina, se utiliza principalmente para estimar la función renal en diversas situaciones, ayudar a diagnosticar enfermedades renales y controlar la condición de pacientes tanto con disfunción renal crónica como aguda (Lab Tests, 2021). Desde un punto de vista fisiológico, la insuficiencia renal se caracteriza por una reducción en la filtración de la sangre o mejor conocida como la Tasa de Filtración Glomerular (TFG), lo que se manifiesta clínicamente con niveles elevados de creatinina y urea en el suero (López *et al.*, 2012). Los rangos de concentraciones de urea en adultos mayores a 60 años convencionalmente son de 8-23 mg/dL, mientras que en adultos jóvenes van de 17-45 mg/dL, por otro lado, los valores de la creatinina abarcan de 0.6-1.3 mg/dL, similar a los valores de personas jóvenes que van de 0.5-1.13 mg/dL (Medline Plus, 2021; Lab Tests, 2021; Savia, s. f.; MC, 2023; Garg, 2024). La mejor manera en la práctica clínica para evaluar la función renal es mediante la estimación de la TFG, haciendo uso de fórmulas que se basan en los niveles de creatinina sérica (Dehesa, 2008). En la actualidad, el diagnóstico de la enfermedad renal se puede realizarse mediante: análisis de sangre, análisis de orina, pruebas por imágenes, e incluso la extracción de una muestra de tejido renal para su análisis, lo cual puede llegar a ser un procedimiento bastante invasivo y consumir mucho tiempo (Mayo Clinic, 2021b).

De ese modo, el aumento gradual de la morbilidad, los costos elevados de los tratamientos, la limitada disponibilidad de servicios y los presupuestos de salud insuficientes en muchos países en vía de desarrollo, entre otros factores, tienen un impacto significativo en términos humanos, éticos, económicos, sociales e incluso políticos al abordar este desafío de salud (Gámez Jiménez *et al.*, 2013). Lo que ha motivado a aumentar los esfuerzos por una



detección precoz de los marcadores, mucho más precisa, a menores costos y con una mejor coordinación entre distintas especialidades, como es el caso del aprovechamiento de lo que puede ofrecernos la nanotecnología y los biosensores.





3. JUSTIFICACIÓN

Hablando de biosensores específicamente, los nanomateriales juegan un rol bastante importante en esta área, principalmente se ha estudiado una aplicación específica que es la inmovilización de enzimas. La inmovilización de enzimas en nanomateriales puede aumentar su actividad y conferirles resistencia frente a agentes como proteasas o solventes orgánicos (Ache, 2018). Los nanomateriales son de gran importancia ya que tienen la capacidad de incrementar la relación de área de superficie a volumen, lo que incrementa la estabilidad de la enzima inmovilizada e incrementa el desempeño enzimático (Fatima *et al.*, 2021). Es decir, el uso de nanomateriales puede conducir a un mayor rendimiento del biosensor, lo que se incluye una mayor sensibilidad y un bajo límite de detección de varios órdenes de magnitud, mostrando una mayor actividad química, resistencia mecánica, propiedades electrocatalíticas y difusividad mejorada, todo esto es posible gracias a las propiedades fisicoquímicas con las que cuentan los nanomateriales, que a su vez los hacen bastante útiles para la inmovilización (Ayesha Fazal Nawaz *et al.*, 2021; Malhotra *et al.*, 2018). De manera general, todas las ventajas de las enzimas inmovilizadas sobre partículas del tamaño de una micra se heredan cuando se utilizan nanomateriales como soportes sólidos (Munishwar *et al.*, 2011). Entre las ventajas de utilizar enzimas inmovilizadas se encuentran: el aumento de la estabilidad de la enzima frente a variaciones de pH y temperatura, la posibilidad de recuperar y reutilizar las enzimas, enantioselectividad mejorada, aplicaciones sencillas de procesos enzimáticos continuos, operación del reactor más sencilla, bajo costo del producto, separación del producto, y una catálisis respetuosa con el medio ambiente (Arroyo, 1998; Arabaci *et al.*, 2020).

La colorimetría es una técnica utilizada en los laboratorios de Bioquímica que proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre las sustancias disueltas. La detección de biomarcadores por medio de métodos colorimétricos es otra forma de análisis biológico de fluidos in situ no invasivo. Dichos métodos permiten una evaluación semicuantitativa, rápida, económica y confiable de biomarcadores en diversos biofluidos como el sudor, orina, saliva o sangre (Shen *et al.*, 2012). En el desarrollo de biosensores se está incorporando cada vez más el uso de enzimas, teniendo en cuenta parámetros y características de rendimiento específicas para su mejora, como el costo, el límite de detección, el tiempo de respuesta, y la



vida útil (Lad *et al.*, 2008). Gracias a un amplio conocimiento sobre la nueva tecnología emergente de biosensores de próxima generación, los biosensores de análisis portátiles y la telemedicina tendrán un gran impacto en un campo que se encuentra en un rápido desarrollo. Esto se debe a sus características como la capacidad e detección en tiempo real, que son no invasivas y que suelen ser de bajo costo (Kim *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016). Por ello, están surgiendo nuevas tecnologías que podrían adaptarse a los biosensores portátiles para ampliar sus capacidades de realizar un seguimiento fisiológico en tiempo real y con resultados confiables. El uso de biosensores portátiles para monitorizar el estado fisiológico de los pacientes en tiempo real es fundamental para proporcionar información detallada sobre su salud, rendimiento deportivo, función cardiovascular, entre otros y, proporcionar una mejor calidad de vida (Ye *et al.*, 2020).

Es vital considerar que la tecnología actualmente desarrollada no parece ser adecuada para que un solo biosensor permita detectar creatinina y urea en orina, sangre o sudor humanos sin antes diluir, y es por eso que las pruebas se realizan en laboratorios. La literatura indica que medir los niveles de creatinina y urea en sangre u orina humana es clínicamente crucial, ya que estos valores reflejan parcialmente que tan bien o que tan mal se encuentran la función renal y muscular (Tietz *et al.*, 1994). Con el conjunto de un sistema de biosensores de multi-sensado basado en reacciones enzimáticas, el uso de nanomateriales y gracias a la tecnología de cámara avanzada y sofisticada de los teléfonos inteligentes, han surgido nuevas alternativas para leer los niveles de diferentes biomarcadores mediante el análisis de color utilizando procesos colorimétricos donde detecta ópticamente los biomarcadores en una gota de sangre, sudor, saliva u orina (Malhotra *et al.*, 2018). Estas tecnologías aún se encuentran en su pleno auge, por ende, aún existen dificultades, pero es una tecnología prometedora.

4. ANTECEDENTES

4.1. Daño renal

Los riñones son órganos del tamaño de un puño, situados debajo de las costillas inferiores en la parte posterior del cuerpo, justo por encima de la cintura (National Kidney Foundation, 2015; Nefralia, s. f.). Estos órganos realizan numerosas funciones esenciales para mantener el equilibrio interno. A través de los procesos de reabsorción y secreción, producen orina, lo que permite a los riñones eliminar sustancias de desecho, y estabilizar el volumen y las propiedades fisicoquímicas del líquido extracelular (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017; KidsHealth, 2023).

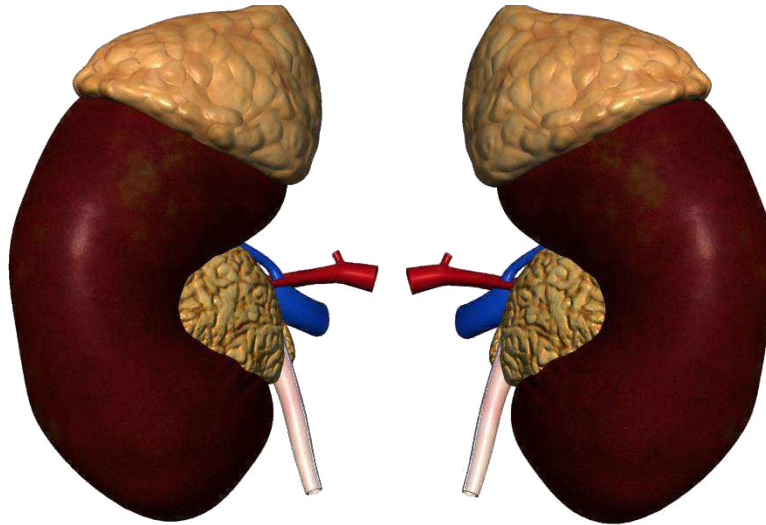


Fig. 1. Representación de los riñones desde la vista posterior (Imagen creada a partir del software Anatomía – Atlas 3D | Catfih Animation Studio S.r.l.).

Una de las principales funciones de los riñones se debe a su abundante irrigación sanguínea, necesaria para su papel de purificación, de ahí que se les considere como un filtro sanguíneo, que a su vez permite conservar lo que el cuerpo necesita y eliminando lo que no. Esto se da gracias a la existencia de ovillos microscópicos denominados glomérulos. También se encargan de regular el equilibrio hídrico del cuerpo, asegurándose de mantener la cantidad adecuada de líquido; cantidades insuficientes o excesivas pueden ocasionar complicaciones. Y finalmente pero no menos importante, se encargan de la producción de hormonas, precisamente de tres de suma importancia, de las que tenemos aquellas que se encargan de señalar de generación de glóbulos rojos, las relacionadas con el control de la presión arterial

y las que facilitan la utilización de la vitamina D por parte del organismo (National Kidney Foundation, 2015; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017).

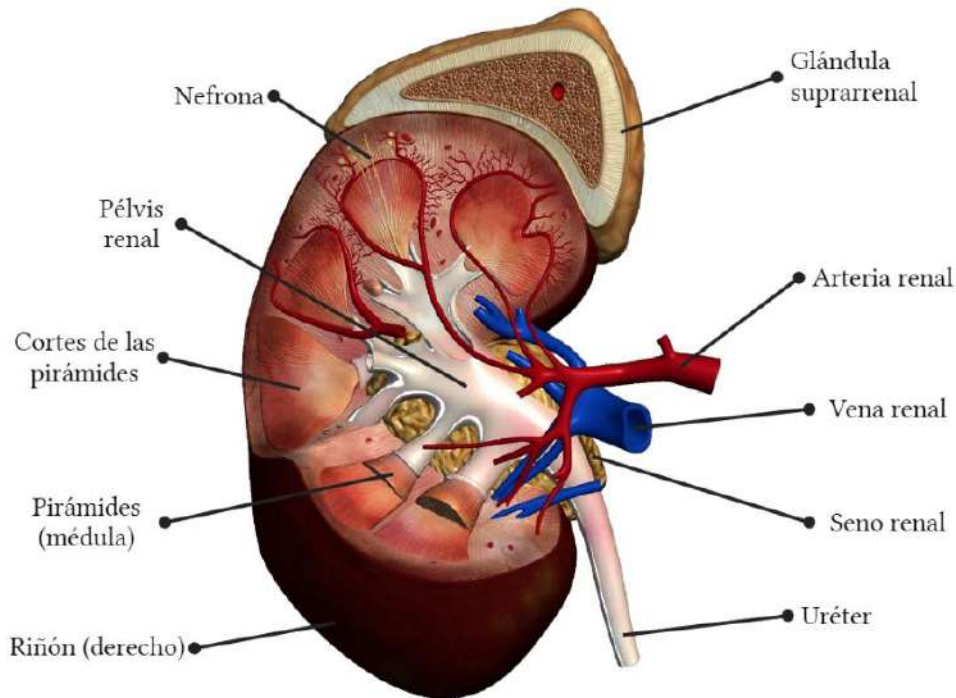
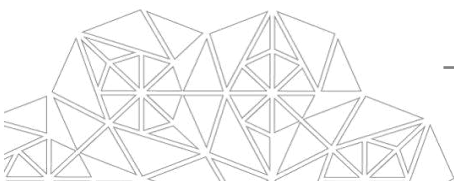


Fig. 2. Anatomía del riñón. Corte transversal del riñón derecho que muestra los componentes de este (Imagen creada en BioRender a partir de imágenes tomadas del software Anatomía – Atlas 3D | Catfish Animation Studio S.r.l.).

Dentro de la estructura del riñón, es importante resaltar la unidad estructural y funcional del parénquima renal llamada nefrona, que a su vez está constituida por los siguientes elementos: glomérulo, túbulo proximal, aparato yuxtaglomerular, túbulo distal, asa de Henle, y tubo colector. Entre estos elementos, uno destacable es el glomérulo, cuya función principal es actuar como un tamiz (o filtro) para el plasma sanguíneo, reteniendo dentro del torrente sanguíneo moléculas grandes como proteínas y filtrando al sistema tubular las pequeñas (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017).



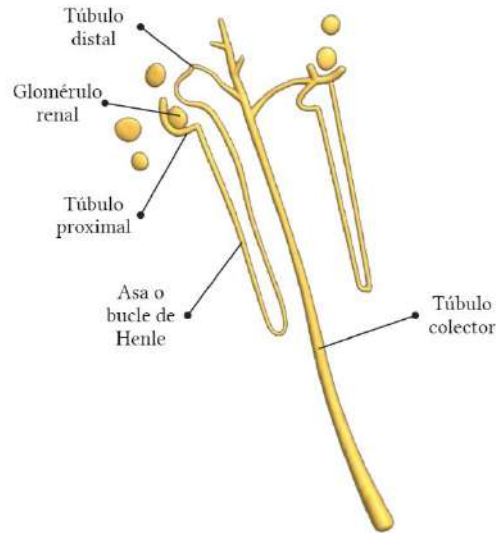
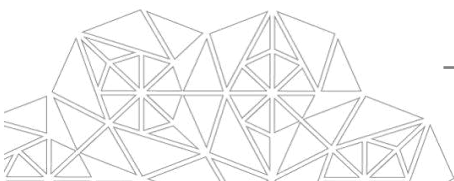


Fig. 3. Representación de la nefrona y sus partes (Imagen creada en BioRender a partir de imágenes del software Anatomía – Atlas 3D | Catfih Animation Studio S.r.l.).

El cuerpo de un adulto promedio contiene aproximadamente de 3.8 litros a 5.7 litros de sangre en circulación, la cual es filtrada por los riñones alrededor de 40 veces al día, es decir, en condiciones normales, el riñón sano filtra aproximadamente entre 170-190 litros de plasma en 24 horas, lo que a su vez supone que aproximadamente cada media hora filtran la sangre total del cuerpo, considerando de igual manera que el valor de referencia del aclaramiento plasmático en varones sanos es de $130 \text{ mL/min}/1.73\text{m}^2$, y de $120 \text{ mL/min}/1.73\text{m}^2$ en mujeres sanas. Además, el 99 % del volumen total de plasma filtrado es reabsorbido y retorna a la circulación general, mientras que solo el 1 % restante se convierte en orina, de modo que se expulsan por la vejiga entre 1-2 litros diarios de orina (KidsHealth, 2023; Itziar, 2009; National Kidney Foundation, 2015; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017; Nefralia, s. f.; Equilibriorenal, s. f.).

Algunos médicos usan el término insuficiencia renal, enfermedad renal y falla renal indistintamente, aunque si hay diferencias principalmente con respecto a la etapa del daño renal. También, otros médicos usan falla renal para referirse a las etapas finales de la enfermedad renal crónica (ERC), o por sus siglas en inglés: Chronic Kidney Disease (CKD) (Edwards, 2023; Gillette, 2023). La insuficiencia renal es principalmente la inhabilidad, parcial o total, de los riñones para filtrar la sangre de manera apropiada. Es decir, se refiere a cuando los riñones están funcionando pobremente, esto ocurre cuando la función renal se reduce a menos del 15 % de su nivel normal, y necesitan de tratamiento o de un diagnóstico





adicional (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017; Edwards, 2023; NIDDK, 2018). Hay dos categorías de insuficiencia renal: la insuficiencia renal aguda (IRA), o daño renal agudo (DRA), y la insuficiencia renal crónica (IRC), o enfermedad renal crónica (ERC) (Edwards, 2023).

La insuficiencia renal aguda (IRA) se define como un conjunto de síntomas clínicos que se caracterizan por un deterioro repentino, generalmente reversible, de la función renal. Este deterioro puede llevar a una descompensación en la homeostasis del cuerpo y a la retención de productos finales del metabolismo nitrogenado, como la urea y la creatinina, además de alteraciones en el equilibrio de líquidos, electrolitos y ácido-base (Andreu-Periz *et al.*, 2003). La insuficiencia renal aguda puede surgir por diversas razones, incluyendo una rápida disminución en la filtración glomerular (FG), lo que impide al riñón eliminar los productos nitrogenados y mantener el equilibrio de líquidos y electrolitos. Esto conlleva a un aumento en los niveles de urea y creatinina en la sangre, acompañado o no de oliguria. Además, se manifiesta mediante alteraciones en el flujo de la orina (Díaz de León-Ponce MA *et al.*, 2017; Gaínza de los Ríos, 2020). El término insuficiencia renal aguda se utiliza cuando los niveles de creatinina en suero aumentan ≥ 0.5 mg/dL (o más de un 50 %) en comparación con los valores basales previamente establecidos, o cuando la TFG disminuye en un 50 % o más (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017).

La insuficiencia renal aguda presenta una alta tasa de morbilidad y mortalidad, con una mortalidad que puede superar el 50 por ciento. A pesar de los avances en el tratamiento de los pacientes agudos, esta tasa apenas ha experimentado cambios significativos en los últimos años. Basándose en el mecanismo subyacente, se pueden clasificar en tres categorías principales: insuficiencia renal aguda prerrenal o funcional, causada por una reducción en el flujo sanguíneo al riñón; insuficiencia renal aguda renal u orgánica, que resulta de lesiones intrínsecas en el tejido renal o sus vasos; e insuficiencia renal aguda posrenal u obstructiva, en la que hay dificultades para eliminar la orina (Andreu-Periz *et al.* 2003).

La IRA prerrenal o funcional, que representa hasta el 60 % de los casos, se caracteriza por un fallo en la función renal en un riñón que se encuentra estructuralmente intacto. Este fallo es resultado de una reducción en el gasto cardíaco o de una disminución en el volumen de líquidos corporales (hipovolemia), lo que conduce a una disminución en la TFG como



respuesta fisiológica a la disminución en la perfusión del riñón (hipoperfusión). La orina producida en esta situación se encuentra con una mayor concentración en solutos de desecho como urea, creatinina, fosfatos y amonio, lo que resulta en una osmolalidad elevada. Sin embargo, no se logrará eliminar completamente todas las sustancias de desecho, lo que dará lugar a una retención de productos nitrogenados, también conocida como azotemia (Gaínza de los Ríos, 2020; Andreu-Periz *et al.* 2003; Díaz de León-Ponce MA *et al.*, 2017).

La IRA renal u orgánica constituye aproximadamente el 35 % de todos los casos de insuficiencia renal. En esta situación, se produce una lesión en diferentes niveles del tejido renal, que puede afectar los túbulos, los glomérulos, los vasos sanguíneos, o el intersticio. Como característica, la orina presenta una baja osmolaridad (menor que 250 mOsm/Kg) y una fracción de excreción de iones de sodio (Na^+) mayores que 40 mEq/L. (Andreu-Periz *et al.* 2003; Gaínza de los Ríos, 2020; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017).

Por último, la insuficiencia renal aguda posrenal u obstructiva, que es la menos común y representa solo el 5 % de los casos. Aunque los riñones inicialmente pueden funcionar correctamente en términos de filtración, reabsorción y secreción, una obstrucción en el flujo de la orina, que puede ocurrir en la uretra, la vejiga o el área retroperitoneal, eventualmente afecta estas funciones. Si la obstrucción es bilateral (o unilateral en un solo riñón funcional), puede resultar en anuria, definida como la producción de menos de 100 mL de orina al día. En este escenario, se denomina fracaso renal agudo obstructivo o posrenal. Sin embargo, este tipo de insuficiencia renal aguda tiende a ser altamente reversible, y la función renal generalmente se restablece rápidamente una vez que se corrige la causa subyacente o se facilita el flujo de orina, ya sea mediante sondaje, cateterización o cirugía (Andreu-Periz *et al.* 2003; Gaínza de los Ríos, 2020).

Como ya se abordó brevemente, existen diferentes causas que producen algún tipo de IRA; por reducción del flujo sanguíneo hacia los riñones, por lesiones directas a los riñones y por obstrucción del sistema de drenado de orina (Mayo Clinic, 2022; AKF, 2022).

En las formas leves de IRA podría no haber signos ni síntomas, no obstante, a medida que la afección se agrava, pueden presentarse ciertos síntomas como disminución en la frecuencia de la micción (diuresis), retención de líquidos que se manifiesta como hinchazón en las



piernas, tobillos o pies, debilidad o fatiga, confusión, náuseas, dolor en el pecho, convulsiones o incluso coma en casos más graves (Edwards, 2023; AKF, 2022; Mayo Clinic, 2022). Dentro de los factores de riesgos para desarrollar IRA tenemos: el estar hospitalizado (sobre todo por una enfermedad grave), tener 65 años o más (edad avanzada), tener enfermedades cardíacas, tener antecedentes de enfermedades renales, presión arterial alta severa y no tratada, diabetes, enfermedades hepáticas, estar muy deshidratado o no retener el agua en el organismo, y algunos tipos de cáncer y sus tratamientos (AKF, 2022; Mayo Clinic, 2022).

En cuanto a la insuficiencia renal crónica (IRC o ERC), se caracteriza, según la KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes), por anomalías en la estructura o función del riñón que persisten durante más de tres meses y tienen repercusiones en la salud (Official Journal of the International Society of Nephrology, 2013; Stevens *et al.*, 2013). Aunque la IRA y la IRC son dos entidades distintas, existe una relación entre ellas. La IRA puede desencadenar o empeorar la ERC, mientras que la ERC puede aumentar el riesgo de desarrollar IRA. La presencia de IRA puede acelerar la progresión de la ERC y aumentar el riesgo de complicaciones graves, como enfermedades cardiovasculares y mortalidad (Chawla *et al.*, 2014; Siew *et al.*, 2015).

En este caso, con respecto a la ERC, la pérdida de las funciones se da de manera gradual, en comparación con la IRA, es decir, se da de manera lenta y por etapas. También se sabe que en las etapas tempranas es difícil notar algún síntoma o signo, y no es sino hasta las etapas avanzadas cuando se dan cuenta de que la afección está ahí y ya está avanzada (Andrew Bentall, 2021; OPS, s. f.; National Kidney Foundation, 2015). Está estrechamente vinculada con la pérdida progresiva y generalmente irreversible de la TFG, lo que resulta en una serie de síntomas y signos conocidos como uremia. En su fase terminal (estadio 5 o ERCT), el paciente necesita terapia de reemplazo renal (TRR) o diálisis (hemodiálisis o diálisis peritoneal), ya que de no recibir tratamiento, puede llevar a la muerte (Torres Zamudio, 2003; Espinosa-Cuevas, 2016; Gómez-Carracedo *et al.*, 2006).

La enfermedad renal crónica se divide en 5 etapas, cada una representando un deterioro progresivo en la función renal en comparación con la etapa anterior. Estas etapas se utilizan para evaluar el nivel de función renal, el cual se determina mediante una prueba llamada tasa



de filtración glomerular (TFG), de ahí la importancia de la TFG (National Kidney Foundation, 2015). La TFG es el principal indicador de la función renal en personas tanto sanas como enfermas, ya que proporciona una excelente medida de la capacidad de filtrado del riñón. Se define como el volumen de fluido filtrado por unidad de tiempo, generalmente medido en mililitros sobre minuto (mL/min). En individuos sanos, sus valores fisiológicos suelen estar entre 90 ± 14 mL/min/m² en varones y de 60 ± 10 mL/min/m² en mujeres, y se calcula que existe una disminución de 10 mL/min/1.73m² por cada década a partir de los 40 años, llegando a ser la mitad a los 80 años (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017; Itziar, 2009).

La forma clásica de medir la TFG es mediante la prueba de aclaramiento de creatinina, la cual compara muestras de sangre y orina recolectadas durante 24 horas. La concentración de creatinina en el plasma es un buen indicador de la TFG porque su aclaramiento es aproximado y su tasa de excreción se mantiene relativamente constante. Sus valores fisiológicos normales son de 117 ± 20 mL/min en varones y de 108 ± 20 mL/min en mujeres. De modo que cuando existe una reducción del aclaramiento de creatinina estimado < 60 mL/min/1.73 m² se dice que existe ERC (Gómez-Carracedo *et al.*, 2006; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2017).

Como ya se había mencionado, los estadios o etapas de la ERC se clasifican o establecen de acuerdo con la función renal medida por la TFG, de modo que tenemos (Gómez-Carracedo *et al.*, 2006; National Kidney Foundation, 2015; Stevens *et al.*, 2013):

- Etapa 1 TFG ≥ 90 mL/min/1.73m²: Daño renal con FG normal.
- Etapa 2 TFG 60-89 mL/min/1.73m²: Daño renal con FG ligeramente disminuido, leve pérdida de la función renal. En esta etapa, al igual que en la anterior, se pueden detectar microalbuminuria/proteinuria, alteraciones en el sedimento urinario y anomalías en las pruebas de imagen
- Etapa 3 TFG 30-59 mL/min/1.73m²: FG moderadamente disminuido. Pérdida moderada de la función renal. Puede estar acompañada de las siguientes alteraciones: elevación de urea y creatinina en sangre, problemas clínicos como hipertensión o anemia, anomalías de laboratorio como hiperlipidemia o hiperuricemia, leves



alteraciones en el metabolismo fosfo-cálcico y una reducción en la capacidad de concentración urinaria (poliuria/nicturia).

- Etapa 4 TFG 15-29 mL/min/1.73m²: FG gravemente disminuido. Pérdida grave de la función renal. Se produce una intensificación de alteraciones clínicas, entre ellas tenemos la anemia intensa refractaria, hipertensión acentuada, trastornos digestivos, circulatorios y neurológicos.
- Etapa 5 TFG <15 mL/min/1.73m²: Fallo renal. Etapa en la que es necesario TRR o diálisis. Cursa con osteodistrofia renal y trastornos endocrinos y dermatológicos sobreañadidos a las alteraciones previas.

Algunas de las causas que pueden originar IRC podrían ser las mismas que causan la IRA, sin embargo a continuación se presentan las enfermedades, afecciones y factores de riesgo identificados que causan ERC. Dentro de las enfermedades y afecciones destacan: diabetes tipo 1 o tipo 2, glomerulonefritis, presión arterial alta, nefritis intersticial, enfermedad renal poliquística y otras enfermedades renales hereditarias, reflujo vesicoureteral, obstrucción prolongada de las vías urinarias, infección renal recurrente, enfermedades autoinmunes, malformaciones en el riñón y/o en el tracto urinario, obesidad, y dislipemia. Dentro de los factores destacan: el ser mayor de 60 años, el consumo excesivo de fármacos (sobre todo antiinflamatorios no esteroideos), tabaquismo, trasplante renal, lesiones renales, masa renal reducida, bajo peso al nacer, y nivel socioeconómico bajo (Medline Plus, 2021; NKF, 2022a; Andrew Bentall, 2021; Gómez-Carracedo *et al.*, 2006).

En cuanto a su sintomatología, también suele ser similar a la que se produce con IRA, al principio pudiera no sentirse nada sino hasta que está avanzada. En este caso puede incluir: falta de apetito, picazón y resequedad en la piel, fatiga, dolor de cabeza, náuseas, pérdida de peso, cambio de pigmentación en la piel, dolor de huesos, hinchazón en extremidades, calambres, mal aliento, hipo frecuente, sed excesiva, amenorrea, y problemas para concentrarse (Medline Plus, 2021; NKF, 2023).

Si la enfermedad renal no se trata, puede provocar otras complicaciones secundarias, tales como hipertensión arterial, enfermedades cardíacas y vasculares, anemia, trastornos minerales y óseos, daño al sistema nervioso central (SNC), disminución de la respuesta

inmunitaria, pericarditis, acumulación de líquidos, dolor en el pecho, debilidad muscular, lesiones permanentes, y eventualmente, la necesidad de diálisis o trasplante de riñón. En casos extremos, puede llevar a la muerte (National Kidney Foundation, 2015; Mayo Clinic, 2022; Andrew Bentall, 2021). La ERC se asocia con una alta morbilidad y comorbilidad, ésta última relacionada principalmente con enfermedades cardiovasculares (CVD, por sus siglas en inglés) por ejemplo el síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular, fallo cardíaco o muerte súbita cardíaca, afectando la calidad de vida de los pacientes. Estudios han demostrado un incremento en el riesgo de muerte y mortalidad cardiovascular en relación a la TFG; en aquellos con una TFG de 45-59 mL/min/1.73m², el riesgo incrementa en un 43 %, y en aquellos con valores por debajo de 15 mL/min/1.73m² el riesgo incrementa en un 343 % (Official Journal of the International Society of Nephrology, 2013; Hill *et al.*, 2016; Robles-Osorio *et al.*, 2015; Chávez-Gómez *et al.*, 2017; Perales-Montilla *et al.*, 2012).

Tabla 1. Principales similitudes y diferencias entre los dos tipos de insuficiencia renal: Insuficiencia Renal Aguda (IRA) e Insuficiencia Renal Crónica (IRC).

	IRA	IRC o ERC
Tipo de deterioro renal	Brusco	Gradual
Reversible	Si	No
Característica más evidente	Disminución abrupta de la FG	Disminución de la TFG
Grupos de clasificación/ etapas	3: Pre-renal, Renal, Pos-renal	5: Normal, Ligeramente disminuido, Moderadamente disminuido, Gravemente disminuido, Fallo renal
Causas principales	◦ Reducción de flujo sanguíneo hacia los riñones	◦ Enfermedades y afecciones como diabetes, hipertensión, obesidad, glomerulonefritis, entre otras
	◦ Lesiones directas	◦ Factores como ser mayor de 60 años, consumo en exceso de fármacos, tabaquismo, bajo peso al nacer, nivel socioeconómico
	◦ Obstrucción del sistema de drenado de orina	◦ Algunas causas podrían ser las mismas que causan IRA
Síntomas	◦ En formas leves podrían no existir Sí aumenta la severidad: ◦ Diuresis ◦ Retención de líquidos	◦ En etapas tempranas es difícil de notar En etapas muy avanzadas: ◦ Falta de apetito ◦ Dolor de cabeza



	<ul style="list-style-type: none">◦ Debilidad, cansancio, fatiga◦ Confusión◦ Náuseas◦ Dolor en pecho◦ Convulsiones o coma	<ul style="list-style-type: none">◦ Picazón y resequedad en piel◦ Pérdida de peso◦ Dolor de huesos◦ Mal aliento y sed excesiva◦ Hipo frecuente◦ Pigmentación en piel◦ Hinchazón◦ Calambres◦ Náuseas
--	---	---

Para 2016 la prevalencia global media fue de 13.4 %, mayor al dato anterior que se tenía de 11.0 %. La prevalencia aumenta con la edad, llegando a afectar al 27.6 % de las personas mayores de 60 años y a cerca del 35 % en la población de más de 70 años, tan solo en las primeras etapas (Hill *et al.*, 2016). Sin embargo, para 2017 la prevalencia se estimó en un 9.1 % a nivel mundial, alcanzando una cifra de casi 700 millones de individuos, lo que sugiere que hay una cantidad mayor de individuos afectados en comparación con aquellos que padecen diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, trastornos depresivos osteoartritis, o asma. Además, la prevalencia fue 1.29 veces más en mujeres que en hombres, 9.5 % y 7.3 % respectivamente (Bikbov *et al.*, 2020; Carney E.F., 2020; Persaud, 2020; Fundación Femeba, 2020; Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022). Aunque la prevalencia reportada en GBD (Global Burden of Diseases) de 2017 es menor que la global estimada del meta análisis publicado en 2016 (13.4 %), se atribuye que la diferencia se debe a variaciones en aproximaciones metodológicas y criterios de inclusión de datos. Por ejemplo, se sabe que en las regiones con las cargas más altas de ERC tienen de poco a nada de datos disponibles sobre la incidencia y prevalencia, o que la mayoría de las fuentes de datos que informan la prevalencia de la ERC no fatal son transversales y no repiten las mediciones de creatinina sérica y ACR en orina durante 3 meses, como sugieren las pautas KDIGO, para confirmar la cronicidad de las anomalías. También, estudios sugieren que el uso de una medición de TFG disminuida para caracterizar la ERC podría sobrestimar la prevalencia en un 25 a 50 % (Bikbov *et al.*, 2020). La prevalencia global de personas con ERC en todas las franjas etarias aumentó un 29.3 % entre 1990 y 2017, sin embargo, la prevalencia ajustada por edad se mantuvo constante en un 1.2 % (Fundación Femeba, 2020; Bikbov *et al.*, 2020). Además,



debido a enfermedades comunes como la hipertensión arterial o la diabetes mellitus, se espera que la prevalencia aumente al 35-40 % en los años venideros (Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022).

Se ha notado un incremento exponencial de mortalidad en TFGs bajas. El riesgo se vuelve significativo con una TFG próxima a $60 \text{ mL/min/1.73m}^2$, y es dos veces mayor cuando el valor de TFG se aproxima entre $30\text{-}45 \text{ mL/min/1.73m}^2$, comparado con los valores óptimos ($90\text{-}104 \text{ mL/min/1.73m}^2$) independientemente de albuminuria y factores de confusión (Matsushita *et al.*, 2010). En 2017, la ERC causó 1.2 millones de muertes, y del total de muertes cardiovasculares (CVD), 1.4 millones fueron atribuidas a insuficiencia renal, lo que representó el 7.6 % de todas las muertes por CVD en ese año. Además, las muertes entre ERC y CVD atribuidas a problemas renales, representan el 4.6 % de la mortalidad total en ese mismo año. En el año 1990, se ubicó como la decimoséptima causa principal de deceso, y desde entonces la ERC ha incrementado su tasa global de mortalidad en un 41.5 %, escalando en la clasificación llegando a ocupar la decimosegunda posición para 2017 (Bikbov *et al.*, 2020; Carney E.F., 2020).

Es crucial prevenir, detectar tempranamente y gestionar adecuadamente la ERC para disminuir su impacto en la sociedad. Los objetivos de desarrollo sostenible de las Naciones Unidas tienen apuntes a reducir la mortalidad prematura causada por enfermedades no transmisibles (como la ERC) en un tercio para 2030 y dichas estimaciones sugieren que abordar la ERC será una consideración importante para alcanzar estos objetivos (Carney E.F., 2020).

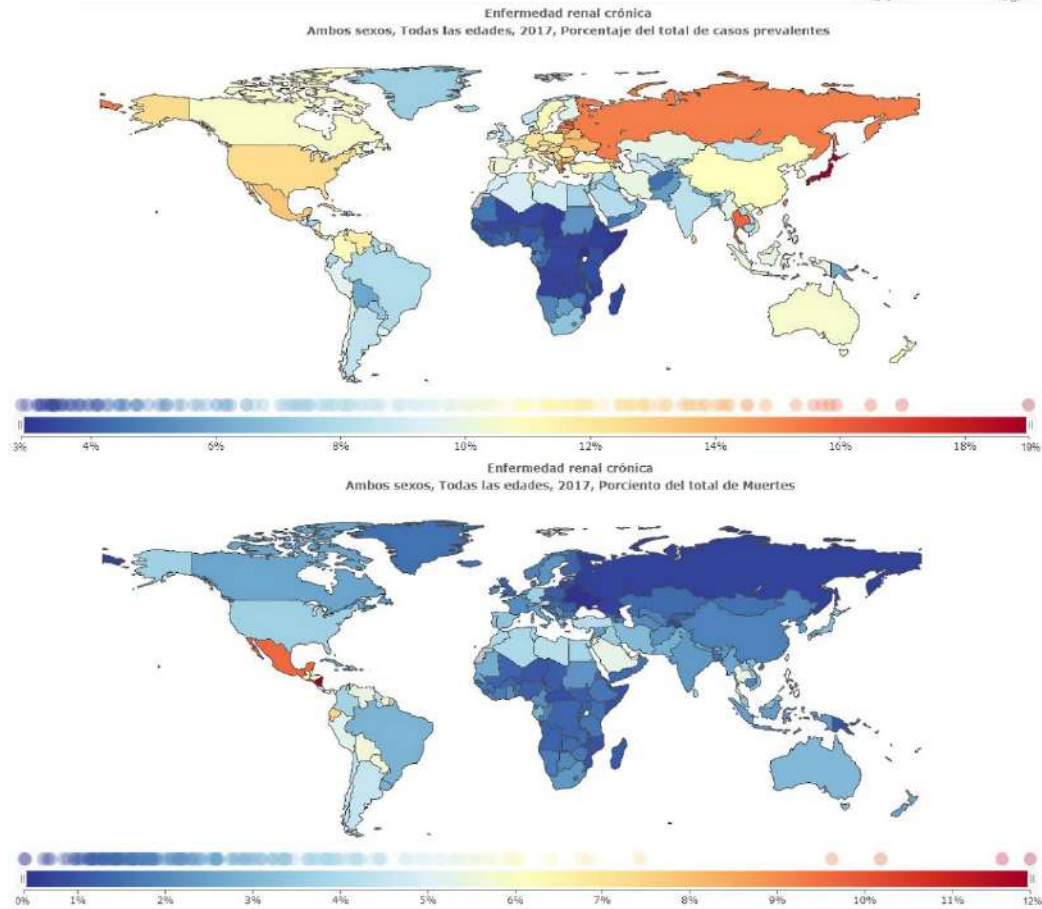


Fig. 4. Distribución de porcentajes de prevalencia y mortalidad de ERC para el año 2017 a nivel mundial (Imagen tomada del Institute for Health Metrics and Evaluation).

4.2. Diagnóstico para daño renal

El retraso en el diagnóstico de la ERC conlleva a tres consecuencias potenciales: muchos pueden morir por complicaciones prevenibles de la ERC sin haber tenido un diagnóstico definitivo; muchos no habrán podido tomar medidas en las primeras etapas con el fin de reducir el progreso de la ERC; y muchos de ellos no contarán con el tiempo adecuado de preparación y organización de sus familias para el inicio de la TRR, así como con los establecimientos de salud, lo que en última instancia puede llevar a una mayor morbilidad y mortalidad (Nogueira *et al.*, 2019).

Para diagnosticar una enfermedad renal, el médico deberá comenzar interrogando acerca del historial médico personal y familiar del paciente, de manera que obtenga información acerca



de la presencia de presión arterial alta, la ingesta de medicamentos que puedan afectar la función renal, la presencia de cambios en los hábitos urinarios y si algún familiar ha presentado daño renal (Mayo Clinic, 2021b). Para el diagnóstico de enfermedad renal, es posible que también se necesiten ciertas pruebas y procedimientos para determinar qué tan grave es (etapa) su enfermedad renal. Las pruebas pueden abarcar desde análisis de orina y sangre, hasta pruebas de imagen y una biopsia renal (Mayo Clinic, 2021b; NIH, 2016; NHS, 2023).

Dentro de los exámenes de sangre, destacan la determinación de la TFG y el aclaramiento de creatinina. La TFG se considera el indicador más completo de la función renal en condiciones de salud y enfermedad. Sin embargo, no puede medirse fácilmente en la práctica clínica; en lugar de eso, es estimado a partir de ecuaciones que usan los niveles de creatinina sérica, y otras variables como lo es la edad, raza, sexo, y el tamaño corporal. La ecuación más aceptada y utilizada por laboratorios clínicos es la MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), aunque se menciona también que la ecuación CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) se desempeña mejor que la ecuación MDRD, especialmente con una TFG más alta, de manera que podría incluso reemplazarla para el uso clínico (Levey *et al.*, 2009). La creatinina es un subproducto del metabolismo muscular normal en el cuerpo. Los riñones son responsables de filtrar la creatinina de la sangre. Cuando los riñones no funcionan adecuadamente, la creatinina y otros desechos se acumulan en la sangre. Por lo tanto, se utiliza la concentración de creatinina en la sangre para estimar la TFG. A medida que la enfermedad renal progresa, los niveles de creatinina en la sangre tienden a aumentar (NIH, 2016).

Los riñones sanos deberán filtrar más de $90 \text{ mL/min/1.73m}^2$, de manera que es posible que se tenga ERC si su tasa es inferior a esta (NKF, 2022a; NHS, 2023). Los valores normales de TFG promedio son de 130 y 120 mL/min/1.73m^2 en hombres jóvenes y mujeres jóvenes saludables, respectivamente (Stevens *et al.*, 2008). Dentro de los métodos de medición de TFG tenemos: los marcadores (directos) de filtración exógenos, incluidos la inulina, el iotalamato (marcado con ^{125}I o sin marcar), el ácido etilendiaminotetraacético de cromo 51 ($^{51}\text{Cr-EDTA}$), el ácido dietilentriaminopentaacético de tecnecio-99 ($^{99}\text{Tc-DTPA}$) y el iohexol proporcionan una buena precisión; se puede utilizar el aclaramiento urinario o plasmático de



marcadores de filtración exógenos para medir la TFG; el aclaramiento urinario de marcadores de filtración exógenos es menos susceptible de error que el aclaramiento plasmático (Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022; Levey *et al.*, 2005). Los valores normales de creatinina sérica oscilan entre 0.8 y 1.3 mg/dL en hombres, y entre 0.6 y 1.0 mg/dL en mujeres. Variaciones de ± 0.3 mg/dL entre distintos laboratorios pueden ser consideradas cambios interensayos aceptables (Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022).

En cuanto a los exámenes de orina, podemos destacar las evaluaciones de proteinuria, y más especialmente los análisis para albuminuria. Se sabe que los adultos sanos eliminan menos o igual a 150 mg/día de proteínas y típicamente menos de 30 mg/día de albúmina en la orina (Milani *et al.*, 2022; Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022). La albúmina es la proteína urinaria preferida, la incrementada excreción de albúmina en la orina es el primer signo de enfermedad renal crónica, asociada con diabetes, otras afecciones glomerulares y la nefrosclerosis hipertensiva. La albuminuria podría también acompañar a enfermedades túbulo-intersticiales, enfermedad renal poliquística, y enfermedad renal en receptores de trasplante renal (Levey *et al.*, 2005). La medición de albúmina en la orina, se prefiere incluso más que la medición de la proteína total, ésta última es más apropiada para identificar tanto albuminuria como proteinuria de bajo peso molecular (Eknoyan *et al.*, 2003). Se dice que hay un incremento en la prevalencia de albuminuria del 7 % en edades de entre 20 y 30 años, y de un 30 % en edades de 70 o mayores (Stevens *et al.*, 2008). Existen diferentes métodos con los que se puede hacer el ensayo de albúmina como: turbidimetría (menos sensible y específica para la albúmina que otros métodos); nefelometría; radioinmunoensayo (RIA); ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); si lo anterior no está disponible, se puede usar una tira reactiva a base de anticuerpos; y la tira reactiva convencional en muestras puntuales de orina es aceptable (Levey *et al.*, 2005). Mediante la medición conjunta de creatinina y albúmina en la muestra de orina, es posible calcular el cociente albumina o proteínas totales/creatinina (ACR). Este test mide y compara la cantidad de albúmina con la cantidad de creatinina en la muestra de orina. Se usa para estimar cuanta albúmina pasa en la orina durante 24 horas. Un riñón dañado permite el paso de albúmina a la orina; entre menos albúmina en la orina, mejor (Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022; NIH, 2016; NHS, 2023). Los valores de ACR mayores ≥ 300 mg/g (> 200 mg/g en hombres y > 300 mg/g en mujeres) corresponden a varias definiciones de macroalbuminuria o proteinuria clínica, la cual está



asociada con niveles mayores de riesgo para la progresión de enfermedad renal y CVD. El término albuminuria debería sustituirse por los términos microalbuminuria (mayor de 30 hasta 300 mg de albumina/g de creatinina) y macroalbuminuria (valores > 300 mg albumina/g creatinina) (Eknoyan *et al.*, 2003; Levey *et al.*, 2005). Investigadores reportaron que una puntuación de riesgo basada en la ACR en orina, creatinina sérica, albúmina sérica y hemoglobina mejoró la predicción del riesgo de progresión de la nefropatía a ESRD (End-Stage Renal Disease; enfermedad renal crónica terminal) del 50 % para la albúmina sola a más del 80 % para la puntuación de riesgo (Taal *et al.*, 2006). Es crucial detectar los factores que están vinculados con el avance de la ERC para determinar su pronóstico. Estos factores abarcan la causa subyacente de la enfermedad renal crónica, el nivel de la TFG, los niveles de albuminuria, la edad, el género, la raza o el origen étnico, la presencia de hipertensión arterial, entre otros (Official Journal of the International Society of Nephrology, 2013). De esa manera, los clínicos necesitarán identificar tanto la albuminuria como la TFG, y más en los adultos mayores; el riesgo por mortalidad y complicaciones es mayor que por progresión de la falla renal para los adultos mayores, y en muchos pacientes mayores, las intervenciones más importantes deberían de reducir los riesgo de enfermedad cardiovascular y evitar la toxicidad del riñón y otros efectos adversos de medicamentos y procedimientos clínicos (Stevens *et al.*, 2008; Masson *et al.*, 2015).

Otra opción es la biopsia renal. Este es un procedimiento bastante invasivo y no exento de riesgo. Se recomienda cuando hay incertidumbre en el diagnóstico de la enfermedad renal primaria o en la evaluación del grado de daño tisular crónico (Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022). La biopsia renal involucra la remoción de una muestra (o varias) de tejido renal, generalmente usando una aguja, para enviar esa muestra a un laboratorio a ser examinada bajo el microscopio (Mayo Clinic, 2021b; NHS, 2023). La toma de la muestra puede hacerse de dos maneras: la primera y preferida llamada percutánea; en ésta una aguja es colocada a través de la piel que se encuentra sobre el riñón y se guía al lugar correcto en el riñón, generalmente con la ayuda de una ecografía, la otra forma es la biopsia abierta; aquí la muestra se toma directamente del riñón durante una cirugía (Mayo Clinic, 2021b; NHS, 2023; NKF, 2022b).

Algunos otros métodos para el diagnóstico de daño renal pueden ser los análisis de imagen, como el ultrasonido (o sonografía) con el fin de evaluar la estructura y el tamaño de los

riñones, la ecografía abdominal, radiografías simples de abdomen y de tórax (y de huesos si procede); para despistaje de uropatía obstructiva o para el despistaje de patología vascular, la ecografía Doppler, la resonancia magnética, o bien una tomografía computarizada. También debe de tomarse en cuenta la exploración física, registrando el peso, la talla, posibles malformaciones y trastornos de desarrollo. También es esencial medir la presión arterial, evaluar el sistema cardiovascular y torácico, realizar un examen del fondo de ojo, y palpar el abdomen en busca de masas o riñones palpables al aplicar presión en la región lumbar (Gaínza de los Ríos, 2020; Lorenzo-Sellares *et al.*, 2022; Radiologyinfo, 2022). Otra forma más novedosa es con la incorporación de los llamados nuevos marcadores de daño renal. Entre estos marcadores se incluyen la cistatina C y la beta-2 microglobulina. La cistatina C es una proteína producida por todas las células nucleadas del cuerpo. Se filtra libremente en el riñón y se reabsorbe completamente en los túbulos proximales. Su medición se realiza mediante inmuno-nefelometría y, a diferencia de la creatinina, no está influenciada por la masa muscular. Además, se correlaciona de manera más precisa con el FG en casos de filtrados elevados. El propósito es facilitar la detección temprana de enfermedades, permitir la diferenciación entre distintas patologías y establecer una evaluación pronóstica adecuada (Gaínza de los Ríos, 2020).

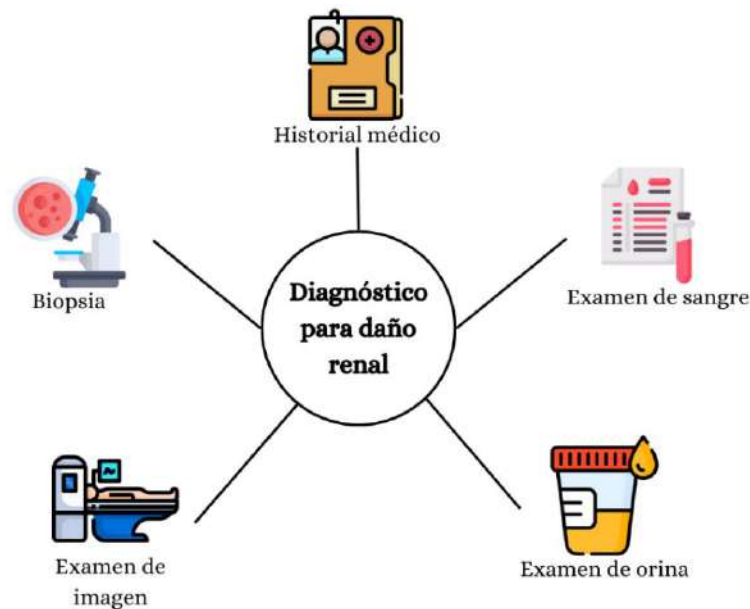


Fig. 5. Métodos comunes para el diagnóstico del daño renal.



4.3. Daño renal en México

Lamentablemente, la ERC es un problema global, y México no está exento de ello. De hecho, México se encuentra entre los tres países con mayores pérdidas en el sector salud debido a esta enfermedad. Actualmente, la ERC se considera un problema de salud pública significativo, con incidencias y prevalencias aumentando anualmente (Méndez-Durán *et al.*, 2010; Dehesa, 2008; Lozano *et al.*, 2013).

Por desgracia en México no existe un registro nacional de ERC (Polanco-Flores *et al.*, 2019). Sin embargo, para 2008 México alcanzó la tasa más alta de incidencia de enfermedad renal terminal a nivel mundial. Además, entre 1990 y 2010 se estimó que la mortalidad por ERC en México aumentó en un 393 %, situándose entre las principales causas de mortalidad y morbilidad (Chávez-Gómez *et al.*, 2017; Arreola *et al.*, 2019).

Por esta razón, se ha incentivado al sistema de salud a intensificar sus esfuerzos en la detección precoz de la ERC, lo que permite optimizar las opciones de tratamiento, retrasar su progresión y reducir potencialmente las complicaciones secundarias sistémicas, tales como anemia, insuficiencia renal aguda, hiperparatiroidismo secundario, infecciones, enfermedades cardiovasculares, y deterioro físico y cognitivo, entre otras (Mora-Gutiérrez *et al.*, 2017).

Para 2017, se informó que la prevalencia de la ERC en México era del 12.2 %, con una tasa de mortalidad de 51.4 por cada 100,000 habitantes (INSP, 2020; James *et al.*, 2018), y en adultos mayores oscila de 23.45 a 35.7 %, en función de la metodología utilizada. Bastante contrastante si se compara con la prevalencia en la población joven que es del 7.2 % (Otero González, 2011). Los gastos de esta patología son abrumadores para cualquier sistema de salud, tan solo en 2014, el gasto anual promedio en salud por persona se estimó en 8,966 dólares estadounidenses (USD) en la Secretaría de Salud, y en 9,091 USD en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), esta última se encarga de atender aproximadamente al 80 % de los pacientes con este problema (IMSS, 2007; Figueroa-Lara *et al.*, 2016; INSP, 2020).

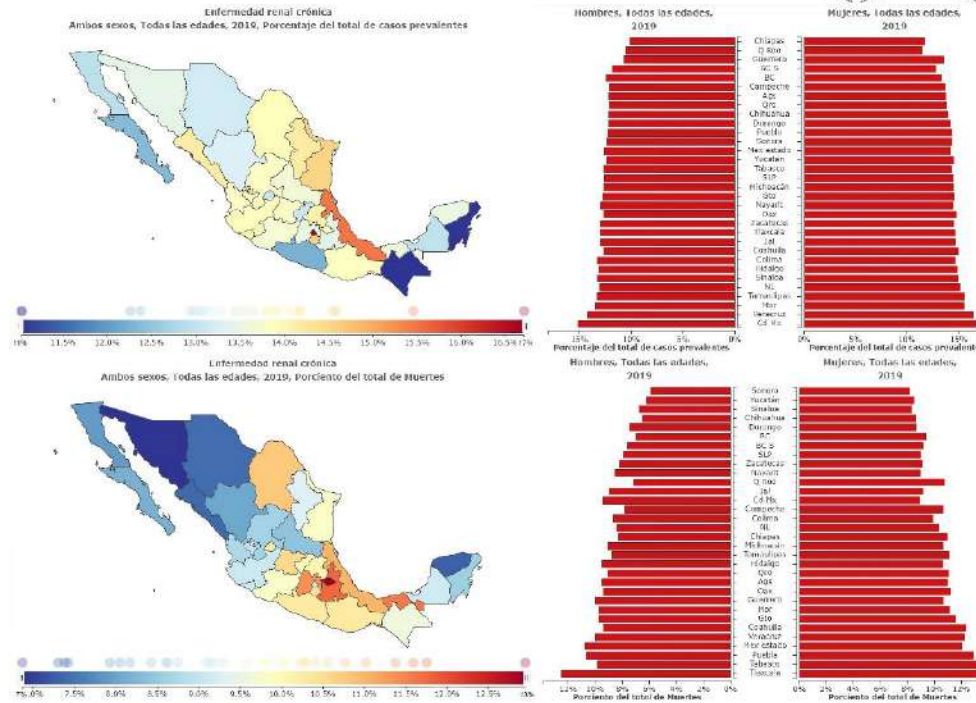


Fig. 6. Distribución de porcentajes de prevalencia y mortalidad de ERC en los estados de México, así como la distribución de porcentajes por Estado y género para el año 2019 (Imagen tomada del Institute for Health Metrics and Evaluation).

De acuerdo al estudio comparativo del Sistema de Datos Renales de Estados Unidos (USDRS) ningún país registra niveles de incidencia tan altos como México, donde se reportan más de 500 enfermos por cada millón de habitantes. Según la Fundación Mexicana del Riñón, en México hay actualmente entre 8 y 9 millones de personas con insuficiencia renal en etapas tempranas, aproximadamente 109,000 con insuficiencia renal crónica en el estadio 5, y cerca de 60,000 en tratamiento sustitutivo de la función renal (diálisis peritoneal o hemodiálisis), de los cuales solo el 50 % tiene acceso a la Salud Pública. Actualmente, el costo mensual de atender a un paciente en tratamiento de diálisis es de aproximadamente 800 USD, lo cual supera el ingreso promedio de los hogares en el país. Por eso es preocupante el futuro que se prevé para esta enfermedad ya que, debido a su incremento acelerado en cuanto a su incidencia y prevalencia, y de acuerdo con estimaciones del Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC), se prevé que para el año 2025 habrá aproximadamente 212 mil pacientes con insuficiencia renal en fase avanzada, de los cuales 160 mil podrían fallecer anualmente. De modo que estaríamos hablando que las cifras podrían duplicarse a causa de la epidemia de obesidad, de diabetes, y el envejecimiento de la población (Tamayo *et al*, 2016; Secretaría de Salud, 2017).



Es importante saber que el envejecimiento se asocia con diversos grados de disminución de la función renal. Sin embargo, un 11 % de las personas sin enfermedades subyacentes como diabetes mellitus o hipertensión arterial desarrollan ERC, posiblemente debido al envejecimiento natural del riñón (Otero González, 2011). Además, el riñón humano llega a medir alrededor de 12 cm de longitud y pesar 400 g en la cuarta década de vida, luego experimenta una disminución anual natural del 10 % en su masa renal, por lo que en adultos mayores existe un mayor riesgo de tener complicaciones e incluso la muerte (Levey *et al.*, 2015, Otero González, 2011).

4.4. Biomarcadores

El uso de biomarcadores en la evaluación de riesgos de determinadas afecciones médicas ha aumentado significativamente durante la última década (Gil Hernández, s. f.). De igual manera, la utilización de biomarcadores en investigación básica, clínica y práctica médica ha alcanzado tal nivel de frecuencia que su inclusión como criterios primarios de evaluación en ensayos clínicos es ampliamente aceptada sin apenas objeciones (Strimbu *et al.*, 2010). Existen varias definiciones con ligeros cambios de lo que son los biomarcadores dependiendo del campo científico de donde se aborde (toxicología, higiene ocupacional, medicina y epidemiología) y también distintas clasificaciones de los mismos (Corella *et al.*, 2015; Vaidya *et al.*, 2010), por ejemplo, en el campo de la toxicología puede ser clasificado en diferentes subgrupos de acuerdo a su uso, además de que un simple biomarcador puede ser incluido en varios grupos (Patel *et al.*, 2023). Los biomarcadores son particularmente relevantes en el análisis de enfermedades progresivas, en las cuales los síntomas no se hacen evidentes hasta después de un extenso período de exposición, de igual manera, nos pueden servir para la identificación de peligros, y para asociar una respuesta con la probabilidad de un resultado de enfermedad (Gil Hernández, s. f.; WHO, 1993).

El concepto de biomarcador, derivado de "marcador biológico", abarca una extensa categoría de señales médicas, es decir, indicadores objetivos del estado de salud que pueden ser observados externamente al paciente, y que se pueden medir de manera precisa y reproducible. Estas señales médicas se distinguen de los síntomas médicos, que son las percepciones de salud o enfermedad experimentadas por los propios pacientes (Strimbu *et al.*, 2010). Un biomarcador también podría considerarse como un fenómeno que ocurre



dentro de un sistema biológico y que se interpreta como un indicador del estado de salud, del riesgo de una enfermedad, o de la esperanza de vida (Arango V., 2012). El Grupo de Trabajo de Definiciones de Biomarcadores de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) han definido el biomarcador como “una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a un agente terapéutico o intervención” (Gupta, 2014; Strimbu *et al.*, 2010; Califf, 2018; Vaidya *et al.*, 2010; Sahu, 2022).

De manera general podemos decir que un es simplemente una molécula biológica que se detecta en la sangre, u otro fluido biológico, así como en tejidos, cuya existencia indica un proceso biológico normal o anormal, una condición o una enfermedad, o bien como respuesta a una intervención determinada. Los biomarcadores son, por tanto, características objetivas y cuantificables de los procesos biológicos. También se puede encontrar con los nombres de marcador biológico, marcador molecular, y/o molécula distintiva (Corella *et al.*, 2015; NIH, s. f.; Strimbu *et al.*, 2010).

El análisis de tejidos y fluidos corporales en busca de productos químicos, metabolitos de productos químicos, enzimas y otras sustancias bioquímicas se ha utilizado para documentar la interacción de los productos químicos con los sistemas biológicos. Es por ello que la medida de esas sustancias, ahora referidas como biomarcadores, son reconocidas como proveedores de datos que vinculan la exposición a algún producto químico con la dosis interna y son relevantes para el proceso de evaluación de riesgos (WHO, 1993). En una amplia cantidad de esfuerzos de descubrimiento de biomarcadores, los biofluidos tales como el suero, plasma, lágrimas o la orina han sido la muestra elegida por varias razones. La primera de ellas es que es mucho más sencillo obtener biofluidos que muestras de tejidos. Por ejemplo, la recolección de orina es casi completamente invasiva, y las muestras de sangre son generalmente extraídas como parte de un examen físico de rutina. Los biomarcadores no invasivos son biomarcadores en los que los métodos de medición no penetran en el cuerpo o son mínimamente intrusivos. Generalmente se prefieren los métodos no invasivos a los invasivos, dada su capacidad para reducir el riesgo de complicaciones, la facilidad de realizarlos y la comodidad del paciente. Por otro lado, la recolección de muestras de tejido



requiere de procedimientos muy invasivos que pueden incluir anestesia general o local, además, lo vuelve impráctico para una enfermedad que puede afectar solo a una pequeña parte de la población, y que se debe de adquirir la muestra anualmente (o en periodos más cortos) (Veenstra, 2010; Sahu, 2022).

Desde un punto de vista farmacéutico, tomando en cuenta la importancia y el uso del biomarcador, tenemos las siguientes clases y definiciones de biomarcadores (Bleavins *et al.*, 2010):

- Validación de objetivos: biomarcadores que evalúan la relevancia y el potencial de que un objetivo determinado se convierta en objeto de manipulación que modificará la enfermedad para proporcionar beneficios terapéuticos claros al tiempo que asegura un índice terapéutico suficiente de seguridad y tolerabilidad.
- Biomarcadores de interacción compuesto-objetivo: biomarcadores que definen los parámetros discretos de la interacción compuesto (o biológica) con el objetivo molecular.
- Biomarcadores farmacodinámicos: biomarcadores que predicen las consecuencias de la interacción del compuesto (biológico) con el objetivo. Los biomarcadores farmacodinámicos incluyen eventos que son deseables desde el punto de vista terapéutico y eventos adversos basados en el mecanismo de acción.
- Biomarcadores predictivos: un biomarcador predictivo se caracteriza por el descubrimiento de que la detección o variación en el biomarcador indica que es más probable que un individuo o conjunto de individuos experimenten un resultado positivo o negativo debido a la exposición a un producto médico o agente ambiental (Califf, 2018).
- Biomarcadores de enfermedad: biomarcadores que se correlacionan estadísticamente con el fenotipo de la enfermedad (síndrome) para el que se desarrollan los tratamientos. La correlación de niveles (en la circulación, otros fluidos o tejidos) o patrones de expresión (gen, proteína) en células o tejidos de sangre periférica debe significar el inicio, la progresión, la regresión, la remisión o la recaída de la enfermedad.



- Biomarcadores de diagnóstico: Un biomarcador de diagnóstico detecta o valida la existencia de una enfermedad o condición específica de interés, o distingue a un individuo con un subtipo particular de la enfermedad (Califf, 2018).
- Biomarcadores de monitoreo: cuando un biomarcador se puede cuantificar repetidamente para analizar el estado de una enfermedad o condición médica en busca de indicios de exposición a un producto médico o a un agente ambiental, o para detectar un efecto de un producto médico o agente biológico, es un biomarcador de monitoreo (Califf, 2018).
- Otros: Selección de pacientes; biomarcadores que se utilizan para la selección de pacientes para estudios clínicos, específicamente estudios de prueba de concepto o ensayos clínicos de fase III de confirmación que se requieren para el registro de medicamentos. Diseño de ensayos adaptativos; los objetivos de los ensayos de diseño adaptativo son establecer un proceso integrado para planificar, diseñar e implementar programas clínicos que aprovechen los diseños innovadores y permitan el aprendizaje en tiempo real. El método se basa en el desarrollo clínico de fármacos guiado por simulación.

Otra de las clasificaciones de los biomarcadores es desde el punto de vista toxicológico, dentro de los cuales nos encontramos los de exposición, efecto o susceptibilidad (Arango V., 2012; Patel *et al.*, 2023; WHO, 1993; Gil Hernández, s. f.; Gupta, 2014):

- Biomarcador de exposición: Examina en un organismo la detección de una sustancia externa, un metabolito o el resultado de la interacción entre un agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del entorno que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula objetivo.
- Biomarcador de efecto: Evalúa la modificación bioquímica, fisiológica o conductual ocurrida en el organismo que, según su magnitud, puede vincularse con una enfermedad. Puede ser usado para evaluar la respuesta del organismo a la medicación, tratamiento o agentes externos.
- Biomarcadores de susceptibilidad: Es un marcador de la capacidad innata o adquirida de un organismo para reaccionar ante la exposición a una sustancia extraña. Son



herramientas para evaluar la sensibilidad individual a los efectos de un xenobiótico o conjunto de compuestos tóxicos.

Los biomarcadores tienen muchas otras aplicaciones importantes en la detección de enfermedades y el seguimiento del estado de salud. Estas aplicaciones incluyen lo siguiente: (i) como herramienta diagnóstica para detectar a los pacientes con una enfermedad o condición inusual (por ejemplo, niveles altos de glucosa en la sangre para diagnosticar diabetes mellitus); (ii) como un instrumento para determinar la etapa de la enfermedad (por ejemplo, mediciones del antígeno carcinoembrionario-125 para diferentes tipos de cáncer) o para evaluar la extensión de la enfermedad (por ejemplo, la concentración de antígeno prostático específico en la sangre, que se utiliza para indicar la extensión del crecimiento del tumor y la presencia de metástasis); (iii) como un predictor del curso de la enfermedad (por ejemplo, medición del tamaño del tumor en ciertos tipos de cáncer); y (iv) para predecir y monitorear la respuesta clínica a un tratamiento (por ejemplo, concentraciones de colesterol en sangre para evaluar el riesgo de enfermedad cardíaca) (Gupta, 2014).

Los biomarcadores exitosos generalmente tienen alta precisión, especificidad, sensibilidad, importancia biológica o plausibilidad clínica y se pueden obtener de manera fácil y segura, para que sean útiles como herramientas predictivas y de vigilancia (Patel *et al.*, 2023; Gupta, 2014).

4.5. Creatinina en daño renal

Los biomarcadores de función renal pueden ser utilizados para estimar la severidad y la naturaleza del daño renal. Dentro de estos, y específicamente hablando de daño renal, se incluye a la creatinina sérica (SCr) (Sakhujá, 2021). De modo que los marcadores bioquímicos primarios para el diagnóstico y evaluación de las etapas de la ERC son la SCr y la TFG estimada (Dimeski *et al.*, 2022). La utilidad clínica de las concentraciones de creatinina sérica se centra en su relación con la TFG (Perrone *et al.*, 1992). La TFG sigue siendo el marcador ideal de aproximación de la función renal global, desafortunadamente su medición no suele ser fácil en la mayoría de las clínicas o entornos de investigación, además suelen tomar mucho tiempo, y por lo tanto, es usualmente estimada a partir de ecuaciones que toman en cuenta marcadores de filtración endógena, tales como la SCr (Lopez-Giacoman *et al.*, 2015; Rimes-Stigare *et al.*, 2018; Huidobro *et al.*, 2018; Ostermann *et al.*, 2020). De



ahí que se hayan desarrollado fórmulas que utilizan el nivel sérico de creatinina junto con otros factores específicos del paciente, como la edad, el sexo y la etnia, para estimar la TFG. Existen muchas fórmulas para estimar la TFG basada en creatinina, como la Cockcroft-Gult, MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), la CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) y la FAS (Full Age Spectrum) (Huidobro *et al.*, 2018).

Como es sabido, la enfermedad renal crónica a menudo no presenta síntomas en sus etapas iniciales, lo que significa que la detección temprana depende en gran medida de los métodos utilizados para evaluar la TFG. En la práctica clínica habitual, la TFG se evalúa mediante la medición de la concentración de creatinina en suero y el aclaramiento (o *clearance*) de creatinina en una muestra de orina recolectada durante 24 horas, aunque estos métodos pueden presentar desafíos tanto antes como durante el análisis (González-González *et al.*, 2014). La TFG es utilizada para determinar la cantidad de sangre pasando a través de los riñones por minuto, y su cantidad puede ser indicativo de función renal. La TFG estimada minimiza el efecto de edad y sexo comparada a un nivel de creatinina solitario, y así, es uno de los mejores indicadores de la función renal en ERC (Dimeski *et al.*, 2022). Contar con una evaluación de la función renal es fundamental en el ámbito clínico, ya que posibilita la identificación y la clasificación de la enfermedad renal crónica, la adecuada dosificación de fármacos, la evaluación de la viabilidad de ciertos procedimientos radiológicos, la determinación de la idoneidad para la donación de riñón y la toma de decisiones sobre el inicio de TRR (Huidobro *et al.*, 2018).

En situaciones normales, la eliminación de creatinina fuera de los riñones es mínima, pero a medida que la TFG disminuye, se observa un incremento en su excreción a través del intestino. Además, es importante considerar que la relación entre creatinina y TFG es exponencial más que lineal, esto puede resultar en una subestimación de la relevancia de pequeñas fluctuaciones cuando los niveles de creatinina son bajos y una sobreestimación de la importancia de grandes fluctuaciones cuando los niveles son altos (Huidobro *et al.*, 2018; Siew *et al.*, 2011).

La creatinina se produce de forma endógena a partir de la creatina y el creatinfosfato como parte de los procesos metabólicos musculares. Es el producto final del metabolismo de la creatina en los músculos, y la cantidad de creatinina en la orina o en el suero está influenciada



por la masa muscular y su eliminación renal. El riñón la elimina mediante la filtración glomerular, excretándola como un residuo en la orina (Perazzi *et al.*, 2011; Dimeski *et al.*, 2022; Mayo Clinic, 2023). Es un compuesto metabólico no enzimático que se produce de manera constante desde el tejido muscular esquelético, representando aproximadamente el 2 % diario de la reserva total de creatina. Este proceso es irreversible y la creatinina resultante es filtrada libremente en los glomérulos renales, sin ser reabsorbida por los túbulos renales. Debido a estas características, la creatinina se considera un indicador endógeno útil para detectar la insuficiencia renal (Huidobro *et al.*, 2018; Dimeski *et al.*, 2022). Asimismo, la creatinina también puede derivarse de la ingesta cotidiana de carne. En situaciones de equilibrio, la cantidad excretada es igual a la cantidad producida, lo que significa que los niveles de creatinina sérica (SCr) varían de forma inversa al filtrado glomerular (FG) (Jabary *et al.*, 2006).

La molécula en sí se considera pequeña, ya que cuenta con una masa molecular de apenas 113 Dalton y un radio molecular de 30 nm, haciendo que cumpla con la mayoría, pero no todos, de los requerimientos para un marcador de filtración perfecto. No está ligada a proteínas plasmáticas, lo que permite que sea filtrada libremente a través del glomérulo, no es metabolizada por el riñón y es fisiológicamente inerte. Ya se mencionó que no se reabsorbe, pero si se secreta por el túbulo proximal en un porcentaje variable y significativo de un 5-20 % de la excreción total, y que aumenta a medida que progresa la insuficiencia renal hasta un 50 % como mecanismo compensatorio (Perrone *et al.*, 1992; Huidobro *et al.*, 2018; Lopez-Giacoman *et al.*, 2015; Lombi *et al.*, 2016). Una disminución del FG causa solo un ligero aumento en la creatinina plasmática debido a la mayor excreción tubular. Por lo tanto, un leve aumento de la creatinina no significa necesariamente que el FG sea normal. Sin embargo, cuando la creatinina supera los 2 mg/dL, la capacidad de secreción se satura y refleja más fielmente el FG (Jabary *et al.*, 2006; Rule *et al.*, 2004).

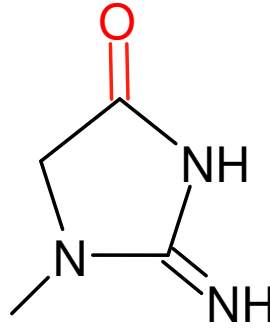


Fig. 7. Estructura química de la molécula de creatinina.

La cantidad de creatinina en sangre debe mantenerse relativamente constante. Un nivel elevado puede indicar una función renal deficiente. La creatinina sérica se mide en miligramos de creatinina por decilitro de sangre (mg/dL) o en micromoles de creatinina por litro de sangre ($\mu\text{mol/L}$). El rango normal de SCr es: para hombre adultos de 0.74-1.35 mg/dL (o 65.4-119.3 $\mu\text{mol/L}$), y para mujeres de 0.59-1.04 mg/dL (o 52.2-91.9 $\mu\text{mol/L}$) (Mayo Clinic, 2023; Lab Center, 2001). Los rangos normales de creatinina en orina son de: 10-20 mg/Kg/24 h (o 88-177 $\mu\text{mol/Kg/24 h}$) para hombres, y de 8-18 mg/Kg/24 h (o 71-177 $\mu\text{mol/Kg/24 h}$) para mujeres (Lab Center, 2001).

Los ensayos de creatinina ahora son trazables a métodos de referencia, y la TFG estimada ahora se informa de forma rutinaria en más del 75 % de los laboratorios clínicos en los Estados Unidos. Debido a que la SCr es comúnmente medida, los reportes de TFG estimada han permitido la detección de la ERC y ha dejado incrementar las referencias para los nefrólogos (Levey *et al.*, 2012). Uno de los requerimientos para usar las ecuaciones estimativas basadas en SCr es la función estable del riñón (Lopez-Giacoman *et al.*, 2015). Las ecuaciones son más precisas para la estimación de la TFG que la medición de SCr solo (Levey *et al.*, 2012).

Los métodos de medición se pueden dividir en dos: los químicos y los enzimáticos. Los químicos son basados principalmente en picrato alcalino, que fue descrito por Jaffe, y así, los métodos que usan este principio son llamados métodos de Jaffe. Los métodos enzimáticos implican someter la creatinina a varios procesos enzimáticos que resultan en la formación de peróxido de hidrógeno. Este peróxido reacciona con la peroxidasa para producir un color rojo intenso, que tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 510 nm (Dimeski *et*



al., 2022; Huidobro *et al.*, 2018). En ambos métodos existe una formación de color (principalmente rojizo), este color es proporcional a la cantidad de creatinina presente en la muestra (Huidobro *et al.*, 2018).

La creatinina se puede medir fácilmente en suero, plasma u orina, el método estándar para su medición usa la reacción o método de Jaffe, en la cual la creatinina reacciona directamente con ion picrato (ácido pícrico) bajo condiciones alcalinas para formar un complejo equimolar (picrato-creatinina) del cual un color rojo-anaranjado es fácilmente detectado y cuantificado entre 490-520 nm. La mayor desventaja es que en sujetos normales tanto como el 20 % del color en suero o plasma surge de otras sustancias (interferentes) diferentes a la creatinina (Perrone *et al.*, 1992; Dimeski *et al.*, 2022; Perazzi *et al.*, 2011). Existen entonces los llamados interferentes positivos (pseudocromógenos) que entregan un valor de medición de creatinina más elevado que el real, y los negativos que entregan valores de medición de creatinina menores al real. Dentro de los positivos podremos encontrar dos categorías: sustancias tales como la glucosa, ácido ascórbico, y ácido úrico los cuales lentamente reducen el picrato alcalino; y sustancias tales como acetoacetato, piruvato, otros cetoácidos y proteínas, los cuales reaccionan con el picrato alcalino para formar complejos coloreados. Y por otro lado, los interferentes negativos, tales como la bilirrubina, hemoglobina F, y la dopamina (Perrone *et al.*, 1992; Dimeski *et al.*, 2022; Huidobro *et al.*, 2018; Perazzi *et al.*, 2011).

Los métodos enzimáticos han incrementado su uso en laboratorios debido a que llegan a ser más económicos para mejorar la precisión, sin embargo no son inmunes a las interferencias, a pesar de que no son susceptibles a pseudocromógenos (siendo así más específicos), si pueden ser influenciados por niveles elevados de bilirrubina. Los métodos enzimáticos generalmente son dispositivos de uso en el lugar de cuidado (point-of-care, POC), y existen tres métodos enzimáticos comúnmente usados: creatininasa (creatinina amidohidrolasa), que es el menos usado debido a su mala cinética, sensibilidad reducida, y poca precisión; creatininasa y creatinasa que son un poco más usados, y para sobrellevar la interferencias por ácido ascórbico, se incluye ascorbato oxidasa; y finalmente el método de creatinina desaminasa (creatinina iminohidrolasa) que puede verse afectada por el amoniaco endógeno en pequeñas cantidades (Dimeski *et al.*, 2022; Huidobro *et al.*, 2018; Perazzi *et al.*, 2011).



La importancia de medir el aclaramiento de creatinina (también conocida como índice de depuración de creatinina (IDC) o *clearance*), no es solo mejorar la evaluación de la función renal, sino también identificar de manera temprana a pacientes que podrían ser considerados normales mediante la medición de la SCr (Jabary *et al.*, 2006; Perazzi *et al.*, 2011). Su cálculo se fundamenta en su filtración libre y nula reabsorción, partiendo de que la cantidad absoluta excretada debería de ser constante entre individuos con la misma producción de creatinina y función renal estable. La principal restricción radica en que, como se ha mencionado previamente, la creatinina se excreta en el túbulo proximal, lo que lleva a una sobreestimación de la verdadera TFG (Mayo Clinic, 2023; Huidobro *et al.*, 2018).

Como ya se había mencionado, hay diversas fórmulas para estimar la TFG a partir de creatinina. La Cockcroft-Gault estima el clearance de la creatinina y no la TFG, lo que en sí es un defecto, ya que, como ya se ha mencionado, el clearance sobreestima la TFG real. En cuanto a la MDRD, se tiene la MDRD de 4 y 6 variables, ambas con mejores rendimientos que la fórmula de Cockroft-Gault, en relación al estándar de oro. La limitación de esta fórmula es que fue desarrollada exclusivamente en pacientes con enfermedad renal, por lo que su rendimiento en pacientes con TFG normal es menor y por ello no podría ser apropiada para determinar la prevalencia de ERC (Rule *et al.*, 2004; Huidobro *et al.*, 2018). Por otro lado, en la CKD-EPI todas las creatininas fueron medidas por método enzimático y se incluyó pacientes con y sin enfermedad renal, mostrando mejor rendimiento que la MDRD para valores de TFG $> 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ y similar en pacientes con TFG $< 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$. Y finalmente pero no menos importante, la FAS la cual nació como un intento de usar una ecuación para los diferentes grupos etarios, con mejores resultados en ciertos rangos comparada con la CKD-EPI (Huidobro *et al.*, 2018; Perazzi *et al.*, 2011).

Es importante recalcar y aclarar que hoy en día el método *estándar de oro* o de referencia para la medición de creatinina, a partir del cual se miden la mayoría de los demás métodos es la espectrometría de masas por dilución de isótopos (IDMS, por sus siglas en inglés: Isotope dilution-mass spectrometry). Todos los métodos de Jaffe así como los enzimáticos, están estandarizados contra el método IDMS (Dimeski *et al.*, 2022). Otros métodos de referencia son: la cromatografía gaseosa acoplada a IDMS, cromatografía líquida acoplada a



IDMS y la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), aunque este último no se ocupa mucho en la práctica diaria (Perazzi *et al.*, 2011).

Existen restricciones en su aplicación para evaluar la función renal, las cuales incluyen edad, sexo, raza, uso de ciertos medicamentos y masa corporal, por ello es importante reconocer que la medición de la SCr no proporciona una indicación precisa y uniforme de la función renal en todos los individuos, ya que está influenciada por una variedad de factores (González-González *et al.*, 2014; Dimeski *et al.*, 2022; Huidobro *et al.*, 2018). Otras limitantes serían que es posible que la SCr no se eleve antes de que se haya perdido una función renal sustancial debido a la reserva renal, que la producción de creatinina está disminuida en casos de septicemia, y que la hipervolemia, que es común en pacientes en estado crítico, puede conducir a niveles de creatinina falsamente bajos (Sakhuja, 2021). Además, se ha reportado que la SCr tiene un rol muy limitado como biomarcador de función renal en pacientes en TRR (Ostermann *et al.*, 2020).

Otra forma de interpretar el recuento de creatinina en la orina es a través del cociente albúmina-creatinina (ACR), que muestra la proporción de albúmina presente en una muestra de orina en comparación con la cantidad de creatinina. Los resultados se expresan en miligramos de albúmina por gramo de creatinina, siendo los valores normales para riñones sanos los siguientes: menos de 17 mg/g para hombres mayores y, menos de 25 mg/g para mujeres adultas. Un resultado más alto de lo normal puede ser signo de daño renal (Mayo Clinic, 2023).

4.6. Creatina en daño renal

La creatina (ácido α -metil-guanidina-acético), se trata de un ácido orgánico nitrogenado, y se forma endógenamente mediante reacciones que implican los aminoácidos arginina, glicina y metionina, las cuales se realizan en los riñones (en menor medida) y el hígado. Exógenamente es obtenido a partir de la carne y/o como un suplemento dietético (Antonio *et al.*, 2021; Vega *et al.*, 2019; Baldin *et al.*, 2021). Como suplemento dietético, es uno de los más populares, con un amplio espectro de sus potenciales aplicaciones. La creatina es un actor central del sistema de fosfágenos, que es crucial para la bioenergética celular, especialmente en tejidos con demandas de energía altas y fluctuantes (Longobardi *et al.*, 2023). Es condicionalmente un nutriente esencial, y más en etapas avanzadas de ERC en las

que se suele demandar más, que está fuertemente involucrado en el metabolismo energético humano. Sirve como buffer energético espacial y temporal para muchos órganos con necesidades energéticas altas, incluyendo el cerebro, músculo esquelético, riñón e hígado (Ostojic, 2021; Post *et al.*, 2019; Rodríguez-Avalos, 2019).

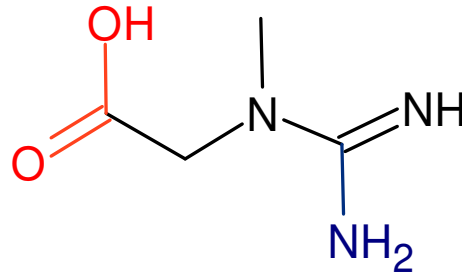


Fig. 8. Estructura química de la molécula de creatina.

Los atletas, culturistas y atletas profesionales suelen utilizar los suplementos de creatina como sustancia ergogénica. Entendiendo que una ayuda ergogénica es una técnica o práctica que sirve para aumentar la capacidad de rendimiento, la eficiencia para realizar un trabajo, la capacidad de recuperación del ejercicio y/o la calidad del entrenamiento, promoviendo así mayores adaptaciones al entrenamiento (Kreider, 2003; Vega *et al.*, 2019; Baldin *et al.*, 2021). La suplementación con creatina produce efectos ergogénicos al aumentar los niveles de creatina y fosfocreatina en los músculos, lo que facilita una mayor velocidad en la resíntesis de ATP (Rodríguez-Avalos, 2019). Para la síntesis de creatina endógena se requieren dos pasos. El primero es una función metabólica del riñón facilitado por la enzima arginina:glicina amidinotransferasa (AGAT), la cual convierte la arginina y glicina en guanidinoacetato. El segundo paso es facilitado por la enzima guanidinoacetato N-metiltransferasa (GAMT) en el hígado, el cual convierte el guanidinoacetato en creatina por un paso de metilación (Post *et al.*, 2019).

Su administración oral, popularizada desde 1992, puede tener diversos beneficios y/o aplicaciones como: incrementar el contenido de creatina muscular, con evidencia coherente mostrando que la suplementación de creatina puede beneficiar el rendimiento en ciertos deportes, y mejorar algunos síntomas clínicos, por ejemplo en enfermedades reumáticas, perturbación metabólica, miopatías, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, e insuficiencia cardiaca congestiva. También, puede aumentar



la capacidad de resistencia al entrenamiento de alta intensidad, podría tener beneficios en perfiles lipídicos, anormalidades musculoesqueléticas, incrementar la fuerza, el rendimiento de sprint, aumentar la masa muscular, menos fatiga durante entrenos, posible mejora en la capacidad aeróbica (Azevedo *et al.*, 2022; Longobardi *et al.*, 2023; Edmunds *et al.*, 2001; Kreider, 2003; Baldin *et al.*, 2021; Rodríguez-Avalos, 2019). Dentro de la dosis diaria recomendada, la suplementación de creatina generalmente no parece tener efectos negativos significativos. Sin embargo, hay casos aislados en los que se han reportado efectos adversos como aumento de peso, trastornos gastrointestinales, náuseas, dolores de cabeza, deshidratación, calambres musculares, y alteraciones en la función renal y hepática (Rodríguez-Avalos, 2019). Sin embargo, los potenciales efectos adversos de la creatina, particularmente en riñones, aún son materia de debate (Longobardi *et al.*, 2023).

Las tres formas de creatina más utilizadas son creatina monohidratada (Cr-MH), la creatina etil-éster (Cr-EE), y la creatina alcalina. De las cuales la forma de suplemento más explorada es la creatina monohidratada (Cr-MH) ya que como creatina libre no suele ser muy estable, y de la Cr-MH se han demostrado varios beneficios ergogénicos. Otras formas existentes son micronizada, etílico, y fosfato, y pueden existir en diversas presentaciones como polvos, geles, líquidos y barras (Azevedo *et al.*, 2022; Baldin *et al.*, 2021; Rodríguez-Avalos, 2019; Vega *et al.*, 2019).

El contenido de creatina en un adulto de 70 kg es aproximadamente de 120-140 g. El hígado produce aproximadamente 2 gramos de creatina al día, mientras que la ingesta diaria promedio a través de una dieta normal que incluye carne es de alrededor de 1 gramo (Vega *et al.*, 2019; Ostojic, 2021; Post *et al.*, 2019). Es casi imposible obtener altas dosis de creatina a partir de los alimentos; cada 250 g de carne cruda contienen apenas 1 g de creatina (Baldin *et al.*, 2021). El 95 % de la creatina almacenada en el cuerpo se encuentra en los músculos, y el 5 % restante distribuido entre riñón, hígado, cerebro y testículos. La creatina almacenada en el músculo está en aproximadamente 40 % como creatina, y el resto se encuentra como fosfocreatina. De igual manera se sabe que entre el 1-3 % del contenido total de creatina (ambas formas de presentación) se transforman de manera no enzimática, espontánea, constante e irreversible en creatinina al día (Post *et al.*, 2019; Vega *et al.*, 2019; Edmunds *et al.*, 2001; Baldin *et al.*, 2021). En el músculo esquelético, el ATP (adenosín trifosfato)



reacciona con la creatina mediante la participación de la enzima creatinkinasa (o creatininasa) formándose ADP (adenosín difosfato) y fosfocreatina. La fosfocreatina, que no puede abandonar el músculo, sirve como un depósito de energía para futuras necesidades. Cuando se utiliza ATP o cuando el pH en el músculo disminuye, ocurre una reacción inversa, regenerando el ATP a partir de la transferencia del grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP. Esto sucede cuando las reservas internas de ATP se agotan y la glicólisis aún no ha podido regenerar ATP dentro de la célula muscular, durante los primeros 10 segundos de ejercicios de corta duración y alta intensidad (Vega *et al.*, 2019; Edmunds *et al.*, 2001).

A lo largo de los años han existido preguntas y conceptos erróneos que involucran la suplementación de la creatina, algunas de ellas son: a) ¿crea o no retención de agua?, b) ¿causa daño o disfunción renal?, c) ¿es benéfica o no para adultos?, d) ¿es efectiva solo para hombres?, e) ¿puede simular una enfermedad renal?, f) ¿existe algún deterioro de la función renal por exposición prolongada?, g) ¿se puede usar en enfermos o con patologías renales o con riesgo de ellas?, o bien, h) ¿existen comunicaciones de toxicidad renal por el uso de creatina en sujetos sanos?, las cuales han sido resueltas con la recolección de información de diferentes autores y casos reportados vaciados en los trabajos de por ejemplo Antonio y colaboradores, de Vega y colaboradores, y de Kim y colaboradores (Antonio *et al.*, 2021; Vega *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2011). De manera que, como respuestas se consolidaron las siguientes: para la pregunta a) se concluyó que, aunque existe evidencia que sugiere que la suplementación con creatina incrementa la retención de agua a corto plazo, principalmente debido a un aumento en el volumen intracelular, varios estudios indican que no altera el contenido de agua corporal (intra o extracelular) en relación con la masa muscular durante períodos prolongados. Por lo tanto, es posible que la suplementación con creatina no cause retención de líquidos. Respecto a la respuesta b), investigaciones experimentales y controladas indican que la suplementación con creatina, cuando se toma en dosis recomendadas, no provoca daño ni disfunción renal en individuos saludables. Para la respuesta c) existe una cantidad creciente de evidencias que muestran que la suplementación con creatina, particularmente cuando se combina con ejercicio, proporciona beneficios musculoesqueléticos y de rendimiento en adultos mayores. Para la respuesta d) igual existe evidencia acumulada de que su uso tiene potencial de ser una intervención terapéutica multifactorial a lo largo de la vida de las mujeres, con poco o nulo efecto secundario (Antonio



et al., 2021). Para la respuesta e) la respuesta concreta es si, esto debido a que como ya se mencionó la creatina se degrada a creatinina, elevando así sus niveles séricos, pudiendo inducir a la sospecha de una nefropatía. Para la f) la respuesta concreta que se da es no. Para la g) mencionan que hay escasa evidencia disponible al respecto, por lo que no hay una posición concreta, aunque se recomienda no utilizarlos en sujetos con nefropatías crónicas o que ingieren drogas nefrotóxicas. Y para la h) la respuesta concreta es si, dado que existen algunas comunicaciones de disfunción renal que se han atribuido al uso de suplementos con creatina (Vega *et al.*, 2019).

La información en la que se basan estas respuestas, son estudios con evidencias hechas a partir de modelos en animales, de casos de estudio, e incluso de estudios controlados en humanos, como también lo presenta y fundamenta en su trabajo Longobardi, esto con el fin de evitar sesgos en los resultados. Debe resaltarse que ningún estudio reporta un efecto ergolítico (negativo) estadísticamente significativo de la suplementación con creatina. Aquellos estudios que han reportado los beneficios de la suplementación con creatina como insignificantes, generalmente tienen bajo poder estadístico, ya que no han incorporado controles experimentales apropiados (Kreider, 2003). Además, desde 2004, un panel científico de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) informó que la seguridad y biodisponibilidad de la creatina, monohidrato de creatina, en alimentos para usos nutricionales particulares, no es motivo de preocupación, siempre que exista un adecuado control de pureza de esta fuente de creatina (Kim *et al.*, 2011).

A pesar de los avances que se han hecho en los años recientes, existen algunas fuentes de sesgo y errores asociados con los métodos de TFG estimada, que pueden empeorar su precisión, por ejemplo el fumar, inflamaciones, medicación, masa muscular o dieta, lo cual limita su capacidad de evaluar exactamente la función renal en ciertos grupos. Tal es el caso de aquellos individuos que toman suplementación de creatina. Como ya se mencionó, la SCr es el parámetro más comúnmente usado para evaluar la función renal, y es a su vez el producto final del metabolismo de la creatina (Longobardi *et al.*, 2023). Por otro lado, también hay que tomar en cuenta el caso de los vegetarianos y los veganos, quienes presentan bajos niveles de SCr y por consiguiente clearances de creatinina más bajos, esto debido a su baja ingesta dietética de creatina. En el caso de los vegetarianos (veganos) aparentemente



tienen que sintetizar toda la creatina necesaria para las funciones del organismo, o casi toda (lacto-ovo vegetarianos). Ese mantenimiento de las reservas de creatina se ve comprometido en esas circunstancias por el hecho que se ha demostrado que los vegetarianos tienen niveles de creatina muscular más bajos que los no vegetarianos (Post *et al.*, 2019; Longobardi *et al.*, 2023).

4.7. Urea en daño renal

La urea fue el primer biomarcador empleado para evaluar la función renal, reconocida como la principal fuente circulante de compuestos nitrogenados y un indicador significativo del catabolismo (metabolismo destructivo) tisular en personas sanas. La producción de urea en el hígado depende en parte del amoníaco derivado del amonio generado en los riñones. Esta interacción es crucial, ya que tanto la urea sérica como la tasa de excreción de amonio regulan las funciones renales de concentración de la orina y equilibrio ácido-base, respectivamente (Rosero-Oñate *et al.*, 2023; Cruz Llanos *et al.*, 2021).

La urea, también llamada carbamida, es una molécula pequeña que es soluble en agua, con un peso molecular de apenas 60 g/mol (Vanholder *et al.*, 2017; Britannica, 2022; Higgins, 2016). Se filtra libremente a través de los glomérulos renales, pero no secretada, de modo que entre mayor sea el decremento en el flujo de orina, más urea será reabsorbida (Seki *et al.*, 2019; Zotta *et al.*, 2009). La formación de urea ocurre en el hígado de animales ureotélicos (mamíferos y anfibios), donde los grupos amino de los α -aminoácidos se integran en el ciclo de la urea (Seki *et al.*, 2019; Zotta *et al.*, 2009). La urea es el principal producto final del metabolismo de las proteínas en los mamíferos y se excreta principalmente a través de la orina, reflejando así el estado nutricional y la ingesta de proteínas (Zotta *et al.*, 2009; López *et al.*, 2012; Vanholder *et al.*, 2017; Pinheiro, 2022; Higgins, 2016).

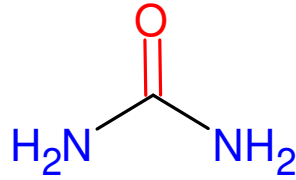


Fig. 9. Estructura química de la molécula de urea.

La *ruta* completa de producción y eliminación de urea es la siguiente: el hígado genera amoníaco (que contiene nitrógeno) al descomponer las proteínas utilizadas por las células del cuerpo; el nitrógeno se combina con elementos como hidrógeno, carbono y oxígeno, para formar urea; la urea viaja desde el hígado a través del torrente sanguíneo hasta los riñones; los riñones sanos filtran la urea y eliminan otros productos de desecho de la sangre; y finalmente, estos desechos se expulsan del cuerpo a través de la orina. (Mayo Clinic, 2021a). Debido a que se trata de un proceso continuo, suele haber una cantidad pequeña pero constante de nitrógeno ureico presente en la sangre (LabTest, 2021).

La urea representa aproximadamente la mitad de los solutos en la orina de personas con una dieta proteica típica y constituye entre el 90 y 95 % de la excreción total de nitrógeno. También puede ser eliminada en menor proporción a través del sudor y el intestino, además de estar presente en la bilis y la leche. El riñón puede excretar grandes cantidades de urea en un volumen pequeño de orina mientras conserva eficazmente el agua (Malkina, 2023; Zotta *et al.*, 2009; Britannica, 2022; Higgins, 2016). La urea tiene una toxicidad moderada (López *et al.*, 2012; Vanholder *et al.*, 2017). Las personas en las etapas iniciales de la ERC muestran un aumento leve y sostenido de la urea sérica, debido a un incremento del 50 % en la reabsorción tubular de urea, lo cual está relacionado con la disminución del flujo tubular renal (Cruz Llanos *et al.*, 2021). Además, la eliminación de urea como factor que contribuye al deterioro de la nefrona residual podría explicar las observaciones de que una dieta baja en proteínas ralentiza la progresión de la ERC (Zotta *et al.*, 2009). También puede existir una disminución de la concentración sérica de urea, aunque es menos común y usualmente menos significativa que su aumento. Esta situación se puede dar debido a un decremento en la producción de urea, incremento en la excreción urinaria, o una combinación de ambas. O bien, debido a una baja dieta proteica, el embarazo, sobrehidratación, daño hepático avanzado y por defectos inherentes en las enzimas del ciclo de la urea (Higgins, 2016).



Su excreción está determinada no sólo por el FG sino también por la reabsorción tubular, por lo tanto, tiene una función crucial en la producción de orina concentrada y en el equilibrio del agua corporal. Diversos factores pueden afectar el manejo de la urea tanto en la IRA como en la ERC (Higgins, 2016; Zotta *et al.*, 2009). Fisiológicamente, conforme se disminuye el número de nefronas y se reduce la TFG, los solutos que se eliminan principalmente por FG, como la urea y la creatinina, se incrementan en el suero (López *et al.*, 2012; Zotta *et al.*, 2009). Los resultados de los análisis de nitrógeno ureico en sangre se miden en miligramos por decilitro (mg/dL) en los Estados Unidos y en milimoles por litro (mmol/L) internacionalmente (Mayo Clinic, 2021a). La excreción diaria de productos nitrogenados en condiciones normales es de 300-600 mmoles de urea, 8-16 mmoles de creatinina y 25-50 mmoles de amonio (Zotta *et al.*, 2009). Puesto que el BUN (nitrógeno ureico en sangre) solo refleja el contenido de nitrógeno en urea (y éste cuenta con un peso molecular de 28 g/mol), y la medición de urea refleja la totalidad de la molécula (60 g/mol), la urea es aproximadamente el doble ($60/28 = 2.14$) que la BUN. Es decir un BUN de 10 mg/dL, sería equivalente a una urea de 21.4 mg/dL. En ese sentido existe también un factor de conversión de BUN en mg/dL a urea en mmol/L, cuyo valor es de 0.357 (Higgins, 2016). Los valores, bajo condiciones normales, de BUN varían entre 6.1-20.2 mg/dL, lo que corresponde a concentraciones de urea de 13-43 mg/dL o 2.2-7.2 mmol/L (Vanholder *et al.*, 2017; Mayo Clinic, 2021a; LabTest, 2021; Cleveland Clinic, 2022).

Para diagnosticar el daño renal agudo, generalmente se basa en la medición de nitrógeno ureico en la sangre (BUN por sus siglas en inglés: Blood Urea Nitrogen) y SCr, del cual los niveles son inversamente correlacionados con el decaimiento de la función renal. Tanto la BUN como la SCr no son muy sensibles o específicas para el diagnóstico de daño renal debido a que suelen verse afectados por diversos factores renales y no renales que son independientes del daño renal o de la función renal. Específicamente BUN es dependiente de esos factores no renales tales como: producción y manejo tubular renal, ingesta proteica, estado catabólico, edad, sangrado gastrointestinal superior, deshidratación, fallo cardiaco, y terapia con altas dosis de esteroides (Edelstein *et al.*, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2019; Seki *et al.*, 2019; Mayo Clinic, 2021a; Malkina, 2023; Higgins, 2016).



El índice urémico (IU) es una cifra que relaciona los niveles séricos de urea y creatinina, reflejando en condiciones de homeostasis el estado nutricional y la función renal de una persona sana. Este índice muestra una correlación negativa significativa con el agua corporal total (ACT), indicando que a niveles altos de IU hay una disminución de ACT. Además, presenta una correlación significativa con el sodio sérico, lo cual refleja la interacción entre la urea y el sodio séricos, ambos cruciales en la regulación de los mecanismos de concentración y dilución de la orina (Cruz Llanos *et al.*, 2021). Por otro lado, como modalidad terapéutica se utiliza la bien conocida hemodiálisis, esta a su vez puede ser evaluada en cuanto a la calidad de la diálisis, en la que se estima el porcentaje de reducción de urea (PRU) que debe de ser mayor a 65 % para considerarla eficiente y de calidad (López *et al.*, 2012).

La relación entre la urea y la creatinina ha sido investigada en diversas poblaciones, demostrando que valores elevados de esta relación están asociados con una mayor mortalidad tanto a corto como a largo plazo. Este uso combinado de clearance de urea y clearance de creatinina fue demostrado por Lubowitz y colaboradores, quienes evidenciaron que en pacientes con ERC, el aclaramiento de inulina debajo de los 20 mL/min estaba estrechamente relacionado al aclaramiento medio de la creatinina y urea. (Cruz Llanos *et al.*, 2021). En un paciente estable, los niveles séricos de urea y creatinina reflejarían de manera más precisa la TFG, ya que el flujo urinario estaría equilibrado y la excreción urinaria y la creatinina sérica se ajustarían mutuamente. Por lo tanto, la relación entre la urea y la creatinina séricas podría indicar de manera acertada la función renal (Cruz Llanos *et al.*, 2021).

El criterio para un biomarcador de daño renal ideal debería de incluir lo siguiente: una molécula que sea fácil de medir en sangre u orina, que sea estable en fluidos corporales, y que sea específicamente hecha por el riñón, especialmente si es producida en el sitio del daño (por ejemplo los túbulos proximales) (Edelstein *et al.*, 2008). A pesar de que la urea no es un marcador ideal de toxicidad urémica, es el marcador que mejor refleja el estado urémico del paciente, ya que sus niveles séricos se correlacionan con la supervivencia. Dentro de las ventajas que ofrece respecto a otros solutos que la avalan como una sustancia marcador excelente (por lo menos para cuantificar diálisis) son: se encuentra en niveles elevados en sangre, es de fácil medición, su concentración sérica se ha correlacionado con la intensidad



de la sintomatología urémica, su distribución es muy uniforme en el organismo, y es el principal producto nitrogenado del catabolismo proteico (López *et al.*, 2012).

4.8. Biosensores

Un biosensor, anteriormente conocido como sensor bio-selectivo, pertenece a un subgrupo de sensores químicos, y se define como un dispositivo de análisis que incorpora un elemento de detección biológica o biomimético, asociado a un sistema de transducción (Diezma *et al.*, 2018; Cortón, 2000; González-Rumayor *et al.*, 2005; Martín-Pacho, 2015; Jiménez C. *et al.*, 2009; Castro-Ortíz *et al.*, 2007). La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define un biosensor como *un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, organelos o aquellas células que detectan compuestos químicos usualmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas, discretas o de carácter continuo, proporcionales a la cantidad (concentración) de analito presente* (Prickril *et al.*, 2017; Ortega 2006). A *grosso modo* se puede decir que es un dispositivo autónomo e integrado, capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica, empleando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) en contacto directo con un elemento de transducción (Manquiera, 2010; Castro-Ortíz *et al.*, 2007). Todos los biosensores se basan en un sistema de dos componentes: un elemento de reconocimiento biológico que facilita la unión específica o la reacción bioquímica con el analito diana; y una unidad de conversión de la señal conocido como transductor (Prickril *et al.*, 2017). El principio de detección de un biosensor se fundamenta en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo objetivo y el elemento de reconocimiento (González-Rumayor *et al.*, 2005). En la actualidad, el avance de los biosensores abarca diversas áreas de investigación que se centran en tres aspectos principales: las metodologías y herramientas para su fabricación, los elementos de reconocimiento molecular, y la concepción básica del dispositivo (Ortega 2006).

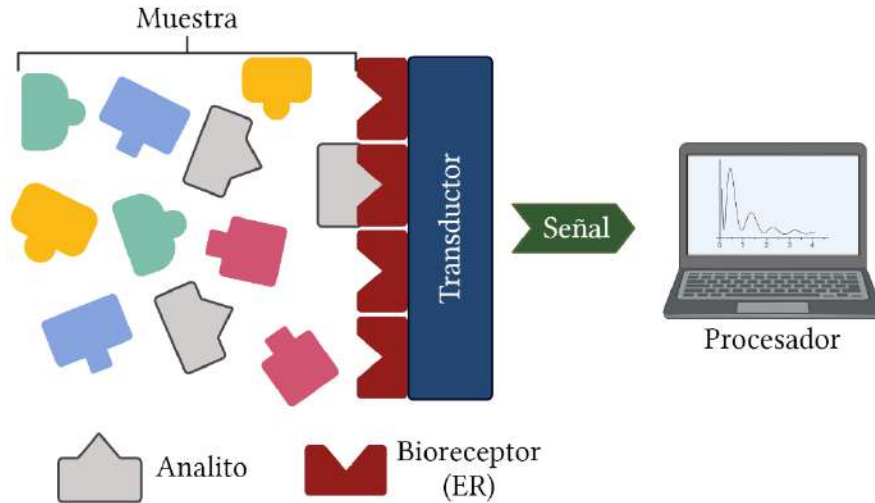


Fig. 10. Esquema básico de los componentes de un biosensor (Imagen generada en BioRender.com).

Los biosensores pueden clasificarse en función de: el mecanismo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito, teniendo biocatalíticos y por bioafinidad; el método utilizado para detectar dicha interacción, entre ellos directa o indirecta; la naturaleza del elemento de reconocimiento, dentro de los cuales tenemos las enzimas, orgánulos, tejidos o células, receptor biológico, anticuerpo, ácidos nucleicos, PIM (Polímeros de Impresión Molecular), PNA (ácidos nucleicos peptídicos) y aptámeros; y por sistema de transducción entre los cuales tenemos: electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos, magnéticos y nanomecánicos (Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009). De modo general se pueden dividir los biosensores en dos grupos, los de detección directa y los de detección indirecta. En los primeros la interacción biológica es directamente medida y se da por cambios ópticos, mecánicos o en propiedades eléctricas, y en los segundos las mediciones dependen de elementos secundarios (a menudo catalíticos o mediadores electrónicos), tales como las enzimas o marcadores fluorescentes (Prickril *et al.*, 2017; Martín-Pacho, 2015). Hay numerosos tipos de biosensores en ambas categorías, y la elección de un detector adecuado es complejo y basado en diversos factores, estos incluyen la naturaleza de la aplicación, tipo de molécula marcada o características del compuesto a analizar, sensibilidad requerida, número de canales (o área), conocimientos técnicos, y velocidad de detección (Prickril *et al.*, 2017; González-Rumayor *et al.*, 2005). Es importante resaltar que las características fisicoquímicas del analito de interés son cruciales para



seleccionar el material biológico o biomimético, mientras que el tipo de elemento de reconocimiento define el sistema transductor (Jiménez C. *et al.*, 2009).

Los biosensores cuentan con algunas ventajas potenciales respecto a otros métodos de biodetección debido a su amplia gama de características incluyendo: el incremento en la velocidad de ensayo y flexibilidad, análisis rápidos y/o en tiempo real, capacidades de detección en el lugar de atención, análisis de flujo continuo, miniaturizables, con capacidad de control y automatización fácil, especificidad, alta sensibilidad, alta selectividad, alta fiabilidad, reproducibilidad, tiempo de vida largo, bajo costo, portátiles, pretratamiento de la muestra innecesario, pocos requerimientos operativo y de almacenamiento, manejo sencillo, y con capacidad de multi-análisis (Prickril *et al.*, 2017; Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009; Castro-Ortíz *et al.*, 2007). Un análisis rápido y en tiempo real puede proveer información interactiva inmediata para los proveedores del cuidado de la salud que puede ser incorporado dentro de la planeación del cuidado del paciente. Además, los biosensores permiten análisis de objetivos múltiples, automatización, y costos de testeo reducidos (Prickril *et al.*, 2017).

El elemento de reconocimiento biológico de un biosensor se puede clasificar en dos clases principales: biocatalizadores, como las enzimas, tejidos, células, microorganismos y orgánulos subcelulares, que al llevar a cabo reacciones de catálisis con el analito generan un producto detectable y medible; y bioligandos como anticuerpos, ácidos nucleicos, lectinas, PNAs, PIMs, aptámeros, receptores y canales iónicos (Diezma *et al.*, 2018; Ortega 2006). Algunos materiales básicos empleados son: fibras ópticas, electrodos, nanotubos y nanocables (Ortega 2006; Castro-Ortíz *et al.*, 2007). Los elementos biológicos fundamentales empleados en la tecnología de biosensores incluyen los pares de enzima/sustrato, anticuerpo/antígeno y ácidos nucleicos/secuencias complementarias. La selectividad del componente de detección biológica ofrece la posibilidad de desarrollar dispositivos altamente específicos para analizar en tiempo real mezclas compleja (Diezma *et al.*, 2018).

Los transductores tradicionales son de tipo electroquímico, óptico y térmico. Los biosensores de última generación integran los principios de medición tradicionales con transductores piezoeléctricos y magnéticos (Diezma *et al.*, 2018; Castro-Ortíz *et al.*, 2007)



Los transductores electroquímicos aprovechan las propiedades electroanalíticas que surgen o se modifican por la interacción entre el analito y el sistema de reconocimiento. Estos transductores transforman la señal generada por esta interacción en una señal eléctrica, ofreciendo información cuantitativa o semicuantitativa. Para un funcionamiento óptimo, es crucial que el elemento de reconocimiento (ER) y el sistema de transducción (ST) estén en contacto directo. De acuerdo a este tipo de ST existen cuatro tipos de biosensores: potenciométricos (cambios en el potencial del electrodo), amperométricos (cambios en la corriente eléctrica generada o consumida), conducimétricos e impedimétricos (cambios en la conductividad y resistencia eléctrica o impedancia), y de carga iónica o de efecto de campo (cambios en la densidad de carga en un transistor ISFET; Ion Sensitive Field Effect Transistor) (Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009; Gonzalo-Ruiz, 2006).

En cuanto a los transductores ópticos, éstos se fundamentan en la detección de alteraciones en las propiedades de una radiación electromagnética, como la luz, como resultado de la interacción física o química entre el analito y el elemento de reconocimiento (ER) del biosensor. Esta interacción puede provocar cambios en las características de absorción, emisión, dispersión, polarización, refracción o reflexión de la radiación cuando incide sobre la superficie que alberga el ER. Entre estos sistemas de transducción se incluyen los sensores de fibra óptica (optrodos), los de resonancia de plasmones superficiales (SPR), los sensores de onda evanescente, los interferómetros, los de resonancia de espejos, y los de reflexión interna total de fluorescencia (Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009; Gonzalo-Ruiz, 2006; Mehrotra, 2016). La mayoría de los biosensores ópticos están diseñados para medir fluorescencia, sin embargo, también pueden medir cambios colorimétricos y densitométricos al igual que quimioluminiscencia (Prickril *et al.*, 2017)

Por otro lado, los transductores másicos incluyen a los ST que detectan pequeños cambios de masa producidos entre la superficie sensora, debidos a la interacción analito-sistema de reconocimiento. Se denominan también piezoeléctricos, gravimétricos o acústicos, dado que en su diseño se utilizan cristales piezoeléctricos que entran en resonancia cuando se aplica una corriente eléctrica alterna. La frecuencia de oscilación viene determinada por la masa del cristal, que varía cuando se produce la interacción entre el ER y el analito, y da lugar a una



variación en la frecuencia de oscilación. Dentro de estos tenemos a los denominados SAW (Surface Acoustic Wave) donde la resonancia ocurre solo en la superficie del cristal, al tratarse de ondas transversales superficiales. El otro modo corresponde a los tipo BAW (Bulk Acoustic Wave) que son ondas de volumen que atraviesan el cristal y por tanto la resonancia ocurre en toda la masa del mismo (Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009; Gonzalo-Ruiz, 2006; Mehrotra, 2016).

Los transductores termométricos se fundamentan en el principio de que la mayoría de las reacciones bioquímicas, en mayor o menor medida, son exotérmicas. La calorimetría proporciona un método de detección para numerosos analitos, especialmente aquellos que implican catálisis enzimática, ya que estas reacciones conllevan cambios considerables en la entalpía molar. No obstante, presentan desafíos, como posibles pérdidas de calor por conducción, irradiación, o convección (Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009; Gonzalo-Ruiz, 2006).

Por su parte los transductores magnéticos utilizan fundamentalmente dos instrumentos, los magnetómetros y los microscopios basados en el dispositivo SQUID (Superconducting Quantum Interference Device), mediante un proceso puramente cuántico puede usarse para medir variaciones caso infinitesimales en los campos magnéticos (Ortega 2006; Mehrotra, 2016).

Y finalmente los transductores nanomecánicos, donde su estructura está fabricada mediante nanotecnología, simulando ménsulas o trampolines en miniatura, las cuales experimentan una deflexión en su extremo como consecuencia de la incorporación del analito de interés, permitiendo medidas de gran sensibilidad de menos de un angstrom de variación en su curvatura con respecto a la posición inicial. La identificación del analito puede realizarse utilizando diferentes métodos, como dirigir un haz de luz láser hacia el extremo de la estructura. Esto permite evaluar el grado de desviación del dispositivo mediante cambios en la reflexión del láser, lo que influirá en el rendimiento de un fotodiodo alineado con él. La interacción entre el analito y el ER produce un cambio diferencial en la tensión superficial del líquido sobre el cual se sumerge una micropalanca (regularmente de silicio) sufriendo una respuesta de tipo nanomecánico que consiste en ese cambio de la deflexión y/o de la

frecuencia de resonancia (Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009).

Tabla 2. Aspectos básicos destacables para la comprensión del funcionamiento de los biosensores

Mecanismo de interacción ER-An	Biocatalíticos
	Por bioafinidad
Detección de la interacción	Directa
	Indirecta
Elemento de reconocimiento	Enzimas
	Orgánulos
	Tejidos o células
	Anticuerpos
	Ácidos nucleicos
	Polímeros de Impresión Molecular (PIM)
	Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNA)
	Aptámeros
Sistema de transducción	Electroquímicos
	Ópticos
	Piezoeléctricos
	Termométricos
	Magnéticos
	Nanomecánicos

ER = elemento de reconocimiento, An = analito

Dentro de los métodos de fabricación o construcción de los biosensores se incluyen tecnologías húmedas, como la fotolitografía, galvanizado y grabado al aguafuerte, o tecnologías secas como el grabado convencional, el serigrafiado (screen-printing) y la electrodeposición anódica. Es esencial que el elemento biológico de cualquier biosensor se integre en el dispositivo de manera que su actividad esté asegurada. Por lo tanto, la manera en que se inmoviliza el componente biológico es crucial para el desarrollo efectivo del biosensor. Se pueden recurrir a varias alternativas, entre las que podemos distinguir métodos físicos y químicos. Dentro de los métodos de inmovilización física podemos encontrar la adsorción, microencapsulación, y el atrapamiento, y dentro de los métodos de inmovilización química podemos encontrar la inmovilización por medio de enlace covalente y entrecruzamiento (cross-linking), y a través de una capa intermedia (Ortega 2006; González-Rumayor *et al.*, 2005; Gonzalo-Ruiz, 2006). Nuevas técnicas de inmovilización se están trabajando como los son la tecnología sol-gel, las películas polimerizada por plasma, las



monocapas autoensambladas, las membranas de bicapas lipídicas y las partículas magnéticas bacterianas (González-Rumayor *et al.*, 2005).

El desarrollo de sistemas integrados que empleen un conjunto de biosensores para crear autoanalizadores altamente específicos demanda mejoras o la creación de nuevas tecnologías tanto en los sensores (receptores y transductores) como en las técnicas de fabricación automatizada. Estas mejoras buscan eliminar la variabilidad entre lotes y adaptar los dispositivos para su producción en masa comercial. Además, es crucial integrar estos sistemas con métodos adecuados de extracción de muestras (Diezma *et al.*, 2018). Nuevas tecnologías de biosensado y modalidades se han desarrollado, incluyendo el uso de nanomateriales para biosensores, nuevas metodologías de fluidos y fabricación, biosensores basados en fibra óptica, sensores basados en código genético, y transistores de efecto de campo y el uso de biosensores basados en dispositivos de comunicación móvil (Prickril *et al.*, 2017). Las principales aplicaciones de los biosensores se han desarrollado en los últimos años con especial referencia a tres áreas: ambiental, agroalimentaria y clínica (Ortega 2006; Gonzalo-Ruiz, 2006). Aunque también existe un interés grande en el campo químico, farmacéutico, cosméticas, militar, biodefensa, biología vegetal, entre otras (González-Rumayor *et al.*, 2005; Jiménez C. *et al.*, 2009; Mehrotra, 2016).

4.9. Biosensores colorimétricos

Los biosensores colorimétricos exhiben unas cuantas ventajas en comparación con otros biosensores tradicionales como los electroquímicos, fluorescentes, y ópticos, tales como la determinación a simple vista y su detección rápida (en tiempo real), sin la necesidad de instrumentos complicados y con un bajo precio, simplicidad, y alto sentido práctico, lo que ha atraído mucho la atención en los últimos años (Zhu *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2018; Senthamizhan *et al.*, 2020). Desde que los cambios de color se pueden leer a simple vista (análisis cualitativo), el biosensado colorimétrico no requiere instrumentación sofisticada o entrenamiento tedioso, y puede aplicarse al análisis de campo y al diagnóstico en el lugar de atención, aunque también se puede hacer el análisis cuantitativo con el uso de softwares y procesamiento (Song *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020; Luka *et al.*, 2021). Por ello, los biosensores colorimétricos han sido ampliamente usados para la rápida detección de varios analitos tales como ADN, proteína, virus, pequeñas moléculas, cationes

metálicos, iones de metales óxidos, oligonucleótidos, entre otros (Zhu *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2019).

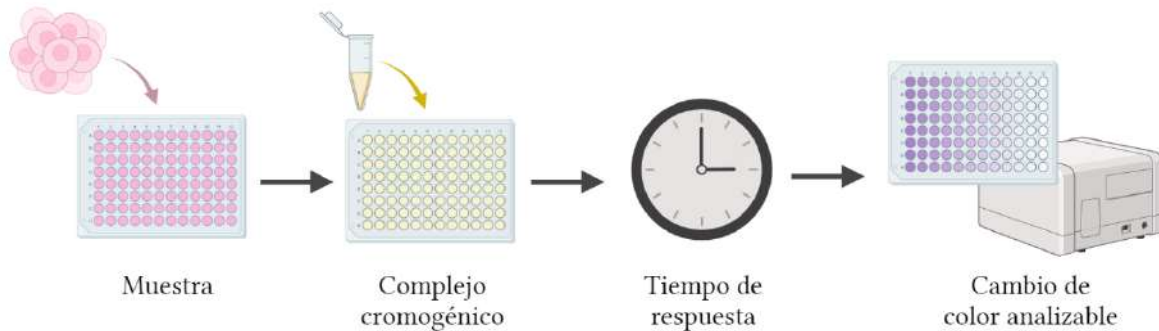


Fig. 11. Esquema básico general de un biosensor colorimétrico. El complejo cromogénico incluye al elemento de reconocimiento biológico (Imagen generada en BioRender.com).

La colorimetría es un método común usado en la detección bioquímica. Se basa en la reacción cromogénica de los compuestos coloreados, de ese modo es que la colorimetría se puede utilizar para medir la concentración de los objetivos comparando o midiendo la profundidad de color de las sustancias coloreadas, es decir, la intensidad del cambio de color está directamente relacionada con la concentración del analito en la muestra, y se puede detectar visualmente de manera cualitativa (Qian *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2014; Luka *et al.*, 2021). El reto clave para el biosensado colorimétrico está en transformar los eventos de detección en cambios de color. Para este fin, un número considerable de materiales inteligentes se han desarrollado, incluyendo nanopartículas de oro, nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, óxido de grafeno y polímeros conjugados (Song *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2020).

Para alcanzar las funciones colorimétricas y la selectividad específica de los sensores colorimétricos fabricados, nanomateriales funcionales o pruebas ópticas son usualmente requeridas. Basados en el tipo de material o reactivos usados para la fabricación de los sensores colorimétricos, varios mecanismos de detección colorimétrica son actualmente bien conocidos, tal como: la resonancia de plasmón superficial (SPR); reacción cromogénica por catálisis mediante enzimas naturales, enzimas mímicas, enzimas artificiales o nanozimas; ajuste encendido-apagado fluorescente, unión receptor-ligando; o el cambio de color de cristales fotónicos bajo simulación, (Zhu *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2022; Nath *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2014). Con respecto a los materiales, existe también una amplia variedad de



ellos, por ejemplo, algunas nanopartículas de metales nobles como el oro (Au), plata (Ag), y cobre (Cu) (Zhu *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2019).

La SPR es la característica única de las nanoestructuras metálicas, y los cambios de SPR causados por la agregación y descomposición de las nanoestructuras metálicas pueden realizar la fabricación de sensores colorimétricos. Algunas nanopartículas metálicas tales como las nanopartículas de oro (AuNPs) y las nanopartículas de plata (AgNPs) pueden mostrar un fuerte color en la región visible, principalmente debido a la resonancia de plasmones superficiales locales (LSPR). El sensado colorimétrico usando nanomateriales SPR usualmente se basa en los cambios de diferentes propiedades ópticas cuando las nanopartículas (NPs) están agregadas y dispersas (Zhu *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020; Nath *et al.*, 2004).

En cuanto al sensado colorimétrico basado en la catálisis enzimática o mediada por nanozimas, de acuerdo a los diferentes tipos de enzimas, la reacción catalítica enzimática común puede dividirse en enzimas naturales y enzimas mímicas. Los sensores colorimétricos mediados por enzimas y por enzimas mímicas están usualmente basados en los cambios de color causados por la catálisis de la enzima y de la enzima biomimética. Las enzimas artificiales y las nanozimas muestran algunas ventajas remarcables, que incluyen una actividad catalítica simple y excelente, protocolos de síntesis controlables, estabilidad medioambiental ultra alta, de fácil modificación, bajo costo y producción a gran escala (Zhu *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2022; Jeon *et al.*, 2022).

Los biosensores colorimétricos basados en el cambio de fluorescencia basan sus principios en las propiedades de fluorescencia de algunas tintas orgánicas, polímeros fluorescentes, y nanomateriales fluorescentes (como los nanoclusteres, puntos cuánticos, y puntos de carbono). Como resultado, se fabrican los sensores colorimétricos con comportamientos de conmutación de fluorescencia inducida por analitos. Según el comportamiento del interruptor de extinción de fluorescencia, la detección colorimétrica generalmente se puede usar con los siguientes comportamientos: al agregar el analito de la fluorescencia del colorante de extinción, el cromóforo de fluorescencia se puede cambiar de encendido a apagado. En segundo lugar, el cambio de apagado a encendido puede hacerse por la emisión inducida de un polímero fluorescente (Zhu *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020; Senthamizhan *et al.*, 2020).



Para los sensores basados en la unión ligando-receptor, la interacción entre ligandos y receptores como indicadores (fluoróforo y cromóforo) y analitos (catión/anión) puede cambiar el espectro de emisión del indicador y proveer una respuesta colorimétrica a diferentes concentraciones del analito (Zhu *et al.*, 2021).

Finalmente, los sensores basados en cristales fotónicos (PCs). Los PCs son un tipo de material con un cambio periódico en el índice de refracción, que tiene la característica de una banda prohibida fotónica (PBG), que puede dificultar el paso de algunas longitudes de onda en la PBG. Por lo que, los PCs han sido usados en fibras ópticas, pantallas, sensores y otros campos. En el campo del sensado colorimétrico también pueden usarse debido a sus estructuras únicas y cambio de color. El principio de detección de los sensores colorimétricos basados en PCs es producir materiales de decoloración que influyan en el cambio del entorno en función del cambio de color de la estructura de la PCs. El sensor colorimétrico puede transformar el cambio en el entorno en un cambio visual de color (Zhu *et al.*, 2021).

Las características fisicoquímicas de los materiales los hacen candidatos prometedores para el biosensado colorimétrico (Dossier, 2022; Zhao *et al.*, 2020), por ejemplo las AuNPs muestran un tamaño único, forma, y composición dependientes de propiedades ópticas. La agregación o redispersión de las NPs resulta en cambios de color de la solución coloidal. Las AuNPs aparecen en un color rojo porque las NPs tienen una absorción óptica cerca de los 520 nm debido a la resonancia de plasmón superficial. Cuando el tamaño de las NPs aumentan, la luz no puede polarizar las NPs homogéneamente, y modos de orden altos dominan a baja energía, esto causa un desplazamiento al rojo y un ensanchamiento en la banda de plasmón superficial, por lo que se agregan y existe un cambio de rojo a púrpura, cambio que se puede observar a simple vista (Song *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2020; Luka *et al.*, 2021). Las AuNPs también son funcionalizadas para aprovechar el cambio de color causado por el efecto de la SPR. Se pueden funcionalizar con anticuerpos, péptidos, con polietilenglicol (PEG) y ácido siálico, e incluso en forma de nanorods (Zhao *et al.*, 2020).

4.10. Biosensores colorimétricos microfluídicos

Los avances en microfluídica han facilitado el diseño y desarrollo de dispositivos miniaturizados para controlar, coordinar, y modificar micro volúmenes de fluido mediante microcanales que van desde 10-100 micras, aunque actualmente también se aceptan



microcanales de 100 nm a 500 μm . La microfluídica es un área de flujo de fluido laminar a microescala para un mejor transporte de calor y masa que ha creado importantes plataformas en el diagnóstico biomédico. Es una forma de tecnología que desarrolla biosensores miniaturizados usando mecánica de fluidos, combinando química, bioquímica, ingeniería, física, microtecnología y biotecnología. Debido a la gran relación superficie/volumen, los dispositivos basados en microfluídica pueden operar el manejo de fluidos en microcanales, encargados de llevar la muestra a los sitios de reacción (eventualmente cámaras de sensado), reduciendo significativamente el volumen de reacción (Kulkarni *et al.*, 2022; Loo *et al.*, 2023; Limbut *et al.*, 2023; Prakash *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2020). Este tipo de sensores (micro y nanofluídicos) usualmente manipulan volúmenes pequeños (microlitros o nanolitros) de fluidos dando lugar a un método óptico de detección (Prakash *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2020). Se puede definir a la microfluídica como el estudio de flujos que son simples o complejos, mono o multifásicos, los cuales están circulando en microsistemas artificiales. El objetivo final es que sean capaces de detectar moléculas biológicas, y transportar, mezclar y caracterizar una muestra sin procesar, todo en un mismo dispositivo (Tabeling, 2005).

El proceso de la microfluídica incluye: actuación de un fluido de un volumen particular a una ubicación específica; separación de los componentes en el fluido de diferentes propiedades, por ejemplo, viscosidad, densidad, etcétera; mezcla de varios tipos de fluidos de manera temporal y espacial controlada, provocando biorreacciones de manera controlada (Loo *et al.*, 2023). La microfluídica ofrece varias ventajas: la habilidad de usar pequeñas cantidades de muestra y reactivos, bajo costo, corto tiempo de análisis, transparencia operativa, controlabilidad, fiabilidad, precisión, estabilidad, eficiencia espacial, multifuncionalidad, y capacidad de automatización. La tecnología es ideal para simplificar los procesos de análisis complicados en un dispositivo pequeño, haciendo portable este tipo de dispositivos. Además, ha sido intensamente desarrollada para propósitos de diagnóstico, ofreciendo exámenes rápidos, precisos, sensibles, baratos, y de plataformas automatizadas (Trinh, 2022; Kulkarni *et al.*, 2022; Tabeling, 2005; Loo *et al.*, 2023; Limbut *et al.*, 2023; Ren *et al.*, 2020; Rajasulochana *et al.*, 2022).

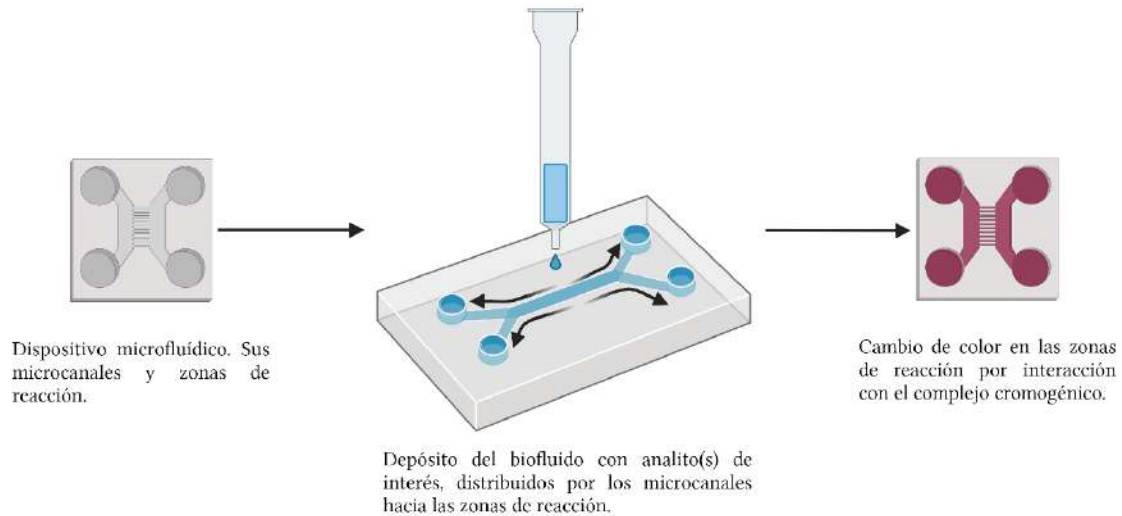


Fig. 12. Esquema del principio básico de los biosensores microfluídicos colorimétricos.

La detección colorimétrica en dispositivos microfluídicos se basa en dos métodos más usados y simples que se conocen hoy en día que son: las tintas moleculares y enzimáticas. En las zonas de reacción, una reacción química o enzimática entre el analito objetivo en la muestra y los reactivos previamente inmovilizados, se lleva a cabo. Estos reactivos pueden ser enzimas, indicadores ácido-base o tintas (Yetisen *et al.*, 2013). Éstos dispositivos aprovechan las ventajas tanto de la técnica colorimétrica como de la microfluídica, pueden producir rápidamente resultados visibles los cuales son fáciles de observar a simple vista, son prácticos, altamente específicos y compatibles, y pueden hacer una detección cuantitativa por espectrometría o aplicaciones móviles de imagen en smartphones, lo que recientemente los ha hecho muy atractivos (Man *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2017; Rajasulochana *et al.*, 2022). Basándose en la concentración del analito, la intensidad de los cambios de color pueden ser grabados y cuantificados mediante el uso de cámaras digitales, un escáner, entre otros (Kuşbaz *et al.*, 2019).

Existen también los chips microfluídicos, los cuales también suelen ser conocidos como lab-on-a-chip (LOC) sistemas de análisis total miniaturizado (μ -TAS), el cual es muy importante dentro de los biosensores debido a sus grandes méritos de bajo consumo de muestra y reactivos, detección en tiempo real, tiempo de detección reducido y plataforma analítica miniaturizada (Man *et al.*, 2021; Tabeling, 2005; Prakash *et al.*, 2012). Se pueden considerar como pequeños reactores que pueden llevar a cabo ensayos analíticos mediante el confinamiento y el control del fluido dentro de sus canales (Trinh, 2022).



La microfluídica impresa puede fabricarse desde 2D hasta 4D, dependiendo de la complejidad del biosensado de la reacción. Por ejemplo, inmunoensayos que requieren interacción simple entre las moléculas objetivo y los elementos de reconocimiento para la lectura visual se pueden realizar en 2D, como una tira de papel de flujo lateral. Para reacciones que requieren múltiples procesos, por ejemplo extracción y purificación, lavado, mezcla de reactivos, los dispositivos 3D son comúnmente empleados (Loo *et al.*, 2023). Los dispositivos en 3D son ventajosos por ciertas aplicaciones, por ejemplo acomodar más ensayos en la misma plataforma base (o huella) y en el mismo espacio que de un dispositivo 2D, permitir el fluido en tres dimensiones a través de múltiples capas de papel, lo que abre el potencial para ensayos de varios pasos en un mismo dispositivo compacto, y mover el fluido a través del grosor del papel (la dirección z) y lateralmente (el plano x,y) (Yetisen *et al.*, 2013). Por otro lado, los 4D o dinámicos poseen propiedades reversibles y responden a estímulos externos, o señales de respuesta, como la luz y el calor, aunque actualmente hay una escasez de ejemplos (Loo *et al.*, 2023).

El vidrio y el silicón fueron los primeros materiales usados en aplicaciones microfluídicas. Los biosensores microfluídicos se han desarrollado usando nuevos materiales tales como polímeros, composites, y papel. En términos generales, los dispositivos microfluídicos pueden fabricarse utilizando una amplia variedad de materiales tales como el silicón, vidrio, cerámica, papel, grafeno, polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), y combinaciones de éstos. También hay materiales emergiendo en este campo, tales como: nanomateriales de transición 2D; MXenes (que incluyen carburos, nitruros y carbonitruros de metales de transición, son una nueva clase de materiales en capas 2D que han surgido como análogos del grafeno), donde la M representa un metal de transición, y la X es un átomo de carbono o de nitrógeno; y el fósforo negro. Estos materiales tendrán que tener un alto punto de fusión y gran conductividad térmica (Kulkarni *et al.*, 2022; Tabeling, 2005; Limbut *et al.*, 2023; Ren *et al.*, 2020). El modelado por deposición fundida (FDM), la estereolitografía (SLA) y el procesamiento de luz digital (DLP) son los enfoques de impresión 3D más comunes y de igual manera que con los 2D, se tiene la impresión de cera. Para los 4D los materiales con memoria de forma, como los polímeros con memoria de forma (SMP) o los hidrogeles hinchables, pueden ser buena opción, ya que proporcionan la característica reversible de los microfluidos para ampliar la capacidad de respuesta de forma



de una sola vez a varias veces. Esto debido a su cualidad estímulo-responsiva (Loo *et al.*, 2023).

Recientemente el papel ha sido funcionalizado como un sustrato para construir dispositivos microfluídicos para usarse en exámenes de diagnóstico rápidos y semicuantitativos. El patrón de papel en regiones de canales hidrofílicos demarcados por barreras hidrofóbicas (o aire) proporciona dispositivos microfluídicos que ofrecen cuatro capacidades básicas en un mismo dispositivo analítico: la primera de ellas es la distribución de la muestra en múltiples regiones separadas espacialmente para permitir múltiples ensayos simultáneamente (o réplicas de un ensayo) en un mismo dispositivo; la segunda comprende el movimiento o flujo de la muestra por acción capilar (no se necesitan bombas o microbombas como en dispositivos convencionales); la tercera es la compatibilidad con pequeños volúmenes de muestra lo cual es fundamental en situaciones donde la cantidad de muestra es reducida (por ejemplo, lágrimas, saliva, orina de recién nacidos y gotas de sangre de pinchazos de dedos); y por último la fácil eliminación de residuos peligrosos ya que los dispositivos pueden eliminarse por incineración (Yetisen *et al.*, 2013; Kuşbaz *et al.*, 2019; Loo *et al.*, 2023; Rajasulochana *et al.*, 2022).

El impregnado de tiras de papel con materiales hidrofóbicos, tales como parafina y cera (más común) para prevenir la contaminación cruzada de las zonas de reacción data desde 1902. La formación de placas de papel en papel filtro previene que la extensión sobre una gran superficie, evitando zonas de no interés, los mismos espacios confinados permiten la uniformidad tanto en el área como en el tinte de la zona de interés cuando se trata de dispositivos microfluídicos colorimétricos, lo que a su vez permite estimar las concentraciones a partir de la intensidad de la coloración. La parafina y la cera se sugieren como para la formación de las zonas repelentes al agua en el papel filtro debido a su carácter general inerte a reactivos químicos y su practicidad para la formación de diversos patrones (Yetisen *et al.*, 2013; Loo *et al.*, 2023).

El papel debe de cumplir con ciertas características físicas para aprovechar bien su potencial en aplicaciones microfluídicas, entre ellas están: características superficiales, área superficial, tasa de flujo capilar, tamaño de poro, porosidad, grosor, y color del papel (esta última de especial cuidado cuando serán pruebas colorimétricas), las cuales dependen de la



aplicación del ensayo. En microfluídica basada en papel, la mayoría de los estudios han explotado el papel cromatográfico y el papel filtro, y se elige el papel ya que además de barato es amigable con el ambiente y se le pueden modificar sus propiedades de superficie como hidrofilia, permeabilidad, piezoelectricidad, y reactividad (Yetisen *et al.*, 2013; Loo *et al.*, 2023). Sin embargo, existen algunos inconvenientes para el papel como fuga y esparcimiento de la muestra desde y a través de los microcanales fluídicos, y el daño de papel por el fluido de trabajo tales como ácidos fuertes y dificultades en la reproducibilidad (Kuşbaz *et al.*, 2019).

Se hace énfasis en tres componentes básicos de fabricación para prevenir la contaminación entre muestras y/o zonas de reacción: el primero de ellos es la formación de barreras hidrofóbicas entre zonas de reactivos, el segundo es la absorción del líquido sobrante mediante capas absorbentes colocadas debajo de las capas portadoras de reactivos, y el tercero separar físicamente las zonas de reactivos adyacentes (Yetisen *et al.*, 2013). La técnica tradicional para la fabricación de canales microfluídicos en vidrio y PDMS es la fotolitografía, aunque también se puede usar corte láser, maquinado, tratamiento plasma, impresión de inyección de tinta, impresión de cera, hilado, entre otras para fabricar dispositivos microfluídicos basados en papel (Kuşbaz *et al.*, 2019). Por otro lado, los chips microfluídicos se pueden hacer mediante la técnica de litografía suave (Mao *et al.*, 2017).

En las últimas dos décadas, la microfluídica ha progresado desde salas limpias hasta convertirse en productos del mundo real. Debido a la falta de infraestructura moderna, las instalaciones de laboratorio central son pocas y distantes entre sí, por lo que se requieren tecnologías fáciles de usar sin necesidad de expertos, lo cual lo puede cubrir las pruebas de flujo lateral, ya que representan costos muy bajos de manufactura de entre 0.10-3 dólares por examen (de entre 1.80-53.96 pesos mexicanos) (Yetisen *et al.*, 2013). La combinación de la microfluídica con los exámenes en el lugar de atención (POTC; Point Of Care Testing) puede incrementar la eficiencia de detección y accesibilidad de los usuarios, simplificar los procesos de análisis, acortar los tiempos de ensayo, y mejorar la precisión y sensibilidad, todo ello con poca intervención humana (Trinh, 2022; Kulkarni *et al.*, 2022). A pesar de los avances, la física fundamental del transporte de masa y el tiempo de reacción imponen limitaciones a la concentración de moléculas objetivo que se pueden detectar, así como a la velocidad a la que



se pueden detectar. Las escalas de tiempo características típicas, t_c , para biosensores están limitadas por el tiempo de viaje de la molécula objetivo al sitio de detección y, en consecuencia, dependen de la difusión de las especies (Prakash *et al.*, 2012).

De manera general, los biosensores han estado bajo desarrollo por más de 50 años con mejoras sustanciales en el sector académico e industrial en las décadas pasadas, sin embargo, solo unos cuantos biosensores han alcanzado el éxito comercial global. Hay muchas razones para esto, tales como las dificultades de trasladar la investigación académica hacia prototipos comerciales viables para la industria, complicados problemas con las regulaciones en aplicaciones clínicas, dificultad con encontrar investigadores calificados con experiencia en tecnología de biosensores y colaboración con investigadores de diversas disciplinas de la ciencia y la ingeniería (Kulkarni *et al.*, 2022).

4.11. Colorimetría

El color, tema peculiar y fascinante, se ha convertido en un atributo cada vez más importante que los ingenieros y diseñadores ópticos tienen que considerar en el desarrollo de diversos sistemas. Los avances en la tecnología de detectores para sistemas de imágenes digitales requieren de una comprensión de como el sistema representará fielmente el color y la iluminación en una escena (Bunch, 2021; Logvinenko *et al.*, 2022). El color percibido de un objeto es dependiente de la fuente de iluminación así como de la reflectancia, absorción, y dispersión desde el objeto. El color que asociamos con objetos familiares proviene de la forma más habitual en que se ve el objeto, como bajo la luz del día. Un objeto autoluminoso, como un letrero neón, también puede tener una apariencia de un solo color aunque la luz surja de los espectros de emisión de la mezcla gaseosa. En física, el color se relaciona con la radiación electromagnética dentro de un rango específico de longitudes de onda que son visibles para el ojo humano. Esta radiación corresponde a la parte del espectro electromagnético llamada espectro visible, que es percibida como luz (Bunch, 2021; Nassau, 2023).

Algunas diferencias perceptuales obvias, pertinentes al color, no pueden ser representadas por nombres de color. Por ejemplo, usamos el mismo nombre de color, por decir rojo, para describir físicamente diferentes cosas: objetos sólidos opacos como una manzana roja; líquidos como un vino rojo; y objetos autoluminiscentes como un foco rojo. Creemos que el

color rojo que tiene una manzana roja, un vino tinto y una luz roja, y que podemos identificar para los tres objetos, es una noción conceptual (una idea) más que una experiencia perceptiva. No lo percibimos. Sólo podemos pensar en ello. (Logvinenko *et al.*, 2022). De ahí que la colorimetría trate de reemplazar esas respuestas subjetivas, tales como azul claro, púrpura oscuro, oro brillante, con un sistema numérico objetivo (Gilchrist *et al.*, 2017; Broadbent, 2017). Así, la percepción del color no puede ser puesta en la misma categoría como la percepción del tamaño, forma, y otras variables físicas, las cuales usualmente se les da atención en libros de texto, la percepción del color plantea un problema ya que no hay color en el mundo al que pertenezcan el tamaño y la profundidad (Logvinenko *et al.*, 2022).

Con el fin de promover una especificación estandarizada, diferentes sistemas de color son usados para definir un espacio de coordenadas tridimensionales, donde cada color es representado por un simple punto. Los espacios de color (modelos de color) comúnmente usados incluyen el RGB, CMYK, XYZ, $L^*a^*b^*$ (o CIELAB), HSV, YUV, y el modelo gris (Gray model), dentro de los cuales los sistemas de color más ampliamente usados son el RGB, HSV y el modelo gris (Fan *et al.*, 2021; Jeon *et al.*, 2022).

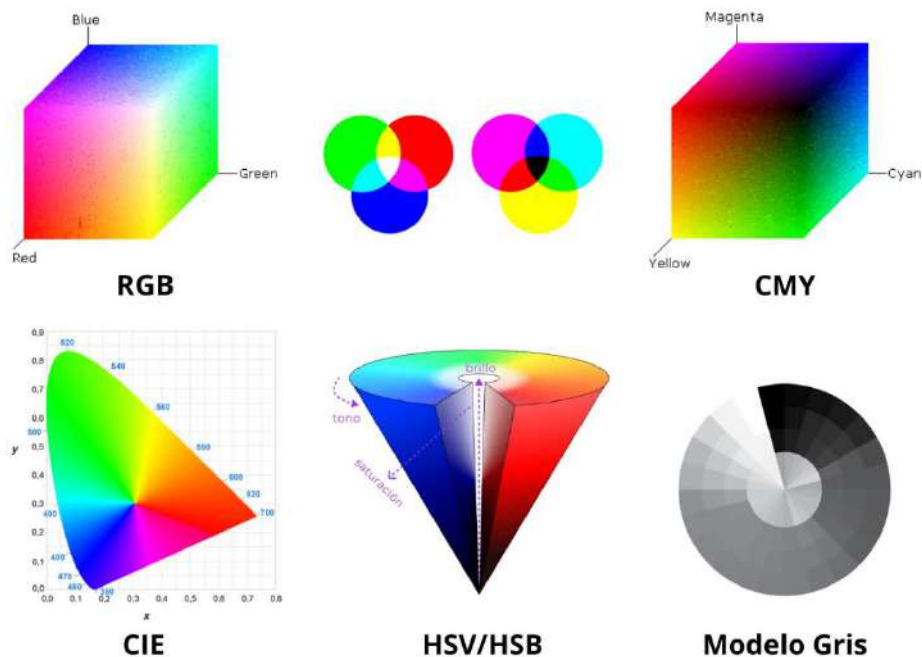


Fig. 13. Representación gráfica de los diferentes espacios de color.



El espacio de color RGB, usado en las pantallas de computadoras y basada en la teoría tricromática del color, se puede entender como una unidad en forma de cubo. Cada color: R para rojo, G para verde y B para azul, es asignado a uno de los tres ejes de coordenadas ortogonales en un espacio en 3D. A lo largo de cada eje del cubo de color los rangos de colores van desde la nula contribución de ese componente hasta un color totalmente saturado. De ese modo, cualquier punto del cubo está especificado por tres números, llamado un triple R, G, B. La diagonal del cubo desde negro (0, 0, 0) hasta el blanco (1, 1, 1) representa todos los grises. Para una proporción significativa de colores uno de los valores es negativo, lo que se considera como una desventaja distintiva (Fan *et al.*, 2021; Gilchrist *et al.*, 2017; Jeon *et al.*, 2022).

Los espacios de color CMY y CMYK son usualmente usados en impresión de color. Los colores primarios en el espacio de color CMY son: cian (C), magenta (M) y amarillo (Y). El espacio de color CMYK, variación del CMY añadiendo negro (K), cierra la brecha entre la teoría y la práctica. En teoría, el componente extra negro no es necesario, sin embargo, en la práctica con varios tipos de tintas y papeles ha mostrado que cuando cantidades iguales de tintas cian, magenta y amarillo son mezcladas, el resultado es usualmente un café oscuro, no negro, por lo que añadir el negro a la mezcla resuelve el problema y, en el caso de impresiones ahorra costes de tinta (Fan *et al.*, 2021; Jeon *et al.*, 2022).

Antes de una descripción matemática proporcionada por un sistema de medición de color, los sistemas de orden se han utilizado para representar el color, que podría usarse como una especificación en la comunicación del color. Uno de los primeros sistemas de orden es el Munsell Color System tridimensional. El modelo de color HSB define un espacio de color en términos de tres componentes: tono (H), saturación (S) y brillo (B). El tono es el tipo de color (tal como rojo, azul, o amarillo) con valores entre 0° a 360° en la mayoría de las aplicaciones cada valor corresponde a un color: 0 es rojo, 45 es un tono de naranja, y 55 es un tono de amarillo; la saturación es la intensidad del color que va desde 0-100 %, donde 0 representa que no hay color, que es un tipo de gris entre negro y blanco, y 100 significa color intenso; y el brillo o valor es el brillo del color que va de 0-100 % (0 siempre es negro, 100 podría ser blanco o un color más o menos saturado). Este modelo también puede encontrarse como HSV (representando la V como valor), y no es una transformación lineal del espacio



de color RGB, es decir, el color no es definido como una simple combinación (adición/sustracción) de colores primarios, pero si como una transformación matemática (Fan *et al.*, 2021; Bunch, 2021; Jeon *et al.*, 2022; Nassau, 2023).

En 1931, la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) estableció el primer sistema de espacio de color CIE XYZ para definir colores claros o colores aditivos, comenzando a formalizar esta ciencia. Esta fue la primera forma estándar internacional ampliamente aceptada para definir el color y hoy en día sigue siendo el gold standard. Este espacio de color no puede representarse tan fácil como el cubo de color RGB, pero puede ser probablemente muy similar al cubo de color RGB con distorsiones de color notables (Fan *et al.*, 2021; Gilchrist *et al.*, 2017; Clydesdale & Ahmed, 1978; Broadbent, 2017; Jeon *et al.*, 2022).

Con respecto al espacio de color $L^*a^*b^*$ (también conocido como CIE1976 $L^*a^*b^*$), usualmente es usado para caracterizar el color en alimentos. Este espacio de color es un estándar internacional para medidas de color, adoptado por el CIE en 1976, en el que la L^* es la componente de luminancia o luminosidad, que va desde 0 a 100, y los parámetros a^* (de verde, $-a^*$, a rojo, $+a^*$) y b^* (de azul, $-b^*$, a amarillo, $+b^*$) son dos componentes cromáticas, que van desde -120 hasta 120 (Fan *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2023; Gilchrist *et al.*, 2017; Broadbent, 2017; Jeon *et al.*, 2022).

Otro modelo es el YUV, el cual define al espacio de color en términos de una luminancia y dos componentes de crominancia. En este espacio de color Y representa el componente luma (brillo) que va de 0-100 % en la mayoría de las aplicaciones, la U y la V son las componentes de crominancia (componentes de luminancia azul y luminancia roja). Es adecuado para detectar objetos en movimiento, ya que simula la percepción humana del color de una manera más cercana que el modelo RGB (Fan *et al.*, 2021; Jeon *et al.*, 2022).

Es completamente imposible seleccionar tres colores primarios de los que existen en la naturaleza de tal manera que puedan producir componentes positivos para todos los colores infinitos presentes en el universo. Sin embargo, es factible seleccionar tres colores de modo que sean mínimos los colores que presenten componentes negativos. Esta selección fue realizada por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) en 1931. Estos tres colores primarios escogidos son los correspondientes al espacio de color RGB (Red, Green, Blue, o



Rojo, Verde, Azul). El color rojo, espectral puro, consistente en una única frecuencia correspondiente a una longitud de onda de 700 nm, el verde, también espectral puro, configurado con una única frecuencia correspondiente a una longitud de onda de 546.1 nm, y el color azul con las mismas características anteriores, correspondiente a una longitud de onda de 435.6 nm (Sistemas de TV, s. f.). La teoría tricromática se apoya en los experimentos de la mezcla de colores, puesto que la combinación de dos fuentes de color primarias producen colores secundarios, por ejemplo el cian surge de la mezcla entre azul y verde, el magenta de la mezcla de azul y rojo, el amarillo de la mezcla de verde y rojo, y la mezcla de cantidades aproximadas de los tres colores R, G, B, se obtiene el blanco (Bunch, 2021; Sistemas de TV, s. f.).

La colorimetría es el campo científico y tecnológico dedicado a la medición y descripción objetiva de la percepción humana del color. Tres cosas contribuyen a nuestra percepción del color de un objeto: la naturaleza de la iluminación, las propiedades ópticas del objeto mismo (reflexión o transmisión), y la respuesta del ojo humano (el observador). Tradicionalmente la colorimetría puede ser dividida entre colorimetría visual y colorimetría fotoeléctrica. La colorimetría visual es usada para medir concentración mediante la observación de un cambio de color de la solución objetivo a simple vista (Fan *et al.*, 2021; Gilchrist *et al.*, 2017; Broadbent, 2017; Nassau, 2023). Es difícil distinguir entre sutiles diferencias de color a simple vista, por lo que la precisión de medición de la colorimetría visual es menor que la de la colorimetría fotoeléctrica. De este modo, la colorimetría fotoeléctrica se apoya de aparatos tales como el colorímetro fotoeléctrico y el espectrofotómetro, el cual es más preciso en cuanto a resolución de cambio de color y más preciso en la determinación de concentración, y es además, ampliamente usado en varios campos. El colorímetro generalmente se usa para medir la absorbancia de solo un color particular (por ejemplo, longitud de onda) de luz para una solución específica (Fan *et al.*, 2021; Pearce, 2014). Se trata en general, de una técnica, como herramienta de análisis químico, utilizada para determinar la concentración de compuestos coloreados (o sustancias que absorben luz) en soluciones mediante la aplicación de la ley de Lambert-Beer, la cual establece que la concentración de un soluto es proporcional a la absorbancia (Pearce, 2014; Clydesdale & Ahmed, 1978; Britannica, 2023).



La colorimetría corresponde a una parte de la ciencia del color, y con ello hay que tener presente que la colorimetría no se trata de medir (especificar) el color como tal; se trata de medir estímulos de color, aunque a modo de definirla podemos mencionar que es la ciencia de la medición del color (Logvinenko *et al.*, 2022; Gilchrist *et al.*, 2017; Nassau, 2023). Una definición quizás más acertada podría ser la siguiente: la colorimetría consiste en la evaluación de la longitud de onda y la intensidad de la radiación electromagnética dentro del rango visible del espectro (Britannica, 2023). Algunas de las ventajas que presenta la colorimetría son: se realiza con luz uniforme, no depende de mediciones subjetivas humanas, es portátil y barata, las muestras pueden ser sólidas o un líquido opaco, y no depende del almacenamiento de referencias que pueden variar con el tiempo. La colorimetría es una alternativa al uso de tablas de colores de referencia, ya que brinda resultados más precisos y es más rentable (Ponnal *et al.*, 2021).

Los logros de la colorimetría en la medición del color se han hecho a costa de descuidar la percepción del color (es decir, la estructura de la apariencia del color). Realmente, la colorimetría puede predecir si dos luces aparecerán del mismo color o diferente, pero no cómo se verán exactamente. De esa manera, el éxito de un estudio colorimétrico depende en qué tan bien un ser humano se convierta, virtualmente, en un dispositivo técnico (Logvinenko *et al.*, 2022). La colorimetría ha sido la técnica más usada para la cuantificación de analitos en papel, por esa razón, la adquisición de la señal típicamente depende de equipos externos como las cámaras digitales de los smartphones (Soda & Bakker, 2019).

Ahora bien, la colorimetría de imagen digital (DIC por *Digital Image Colorimetry*) se refiere a métodos de análisis colorimétricos basados en digitalizar imágenes colectadas por algunas herramientas de adquisición de imágenes como teléfonos móviles, cámaras digitales, escáners, entre otros. La relación entre información de imágenes cuantificada y la concentración de analito se puede construir y los resultados se pueden mostrar con el uso de aplicaciones customizadas. El uso de imágenes digitales podría reemplazar a la simple vista, eliminando el error subjetivo de la observación a simple vista, la cual es influenciada principalmente por inconsistencias del observador. Se sabe que el análisis cuantitativo de imágenes es difícil en condiciones de iluminación inconsistentes, lo cual es una limitación importante para la aceptación práctica de los dispositivos analíticos basados en papel (PAD



de Paper-based analytical devices). Por lo tanto, es importante adquirir una señal colorimétrica que pueda ser correlacionada con los valores de absorbancia espectrofotométrica, esto permitiría usar datos de imágenes por medio de una cámara detectora para evaluar la ley de Beer en solución y en un sustrato de elección (Fan *et al.*, 2021; Soda & Bakker, 2019).

El estado actual de la colorimetría de imágenes digitales, debido al uso extensivo de imágenes digitales en general, provee oportunidades para el desarrollo rápido y de bajo costo de tecnologías DIC, y con ello análisis semicuantitativos y cuantitativos para metales, metales pesados, herbicidas, pesticidas, antibióticos, indicadores bioquímicos, compuestos naturales, y bacterias/virus, para control de calidad en alimentos, textiles, cosméticas, formulación de colorantes, entre otros. Se recomienda reportar los datos colorimétricos como valores de absorbancia calculando el logaritmo de la intensidad del color del sitio dividida por la intensidad de un sitio del mismo sustrato iluminado por la misma luz pero sin reactivo colorimétrico, de modo que nos de valores de absorbancia colorimétrica que deberían ser proporcionales a la concentración de colorante, de forma análoga a la espectrofotometría. El método requiere de ese espacio sin colorante denominado blanco, para la calibración (cero) y con ello reportar los resultados ya sea en unidades de absorbancia, transmitancia o en caso de que ya se encuentre calibrado, aplicar la ley de Lambert-Beer y reportar como concentración (Fan *et al.*, 2021; Soda & Bakker, 2019; Pearce, 2014; Broadbent, 2017).

4.12. Enzimas como bioreceptores en biosensores catalíticos

Las enzimas (catalizadores de la naturaleza magníficamente elaborados) y el fenómeno catalítico ocupan una posición central en biología. La vida como la conocemos no podría ser posible sin la catálisis enzimática. Más del 99 % de las reacciones relevantes en los sistemas biológicos son catalizados por catalizadores de proteínas (Punekar, 2018). Las enzimas son los receptores biológicos más empleados en la producción de biosensores, ya que son económicas, ampliamente disponibles en el mercado y fáciles de manipular. De hecho, fueron los primeros receptores biológicos utilizados con este propósito. Las enzimas, proteínas con capacidad catalítica, son esenciales para llevar a cabo reacciones químicas específicas. Aunque todas las enzimas son proteínas, no todas las proteínas tienen actividad enzimática. Las enzimas, como elementos muy específicos de bioreconocimiento, actúan de forma



selectiva con un analito o una familia de analitos, acelerando las reacciones químicas sin consumirse, lo que permite su reutilización (Gonzalo-Ruiz, 2006; Punekar, 2018; Sadani *et al.*, 2022; Serna-Cock *et al.*, 2009; Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022). Las enzimas tienen la capacidad de reducir la energía necesaria (energía de activación) para iniciar las reacciones, mostrando mejores resultados en contraste con los que sucede con catalizadores inorgánicos, esto debido a que reaccionan solamente con una sustancia específica (o grupo de sustancias) llamada sustrato. Su alta especificidad las hace capaces de diferenciar incluso entre diferentes estereoisómeros de un compuesto (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022). Las enzimas están constituidas por una estructura tridimensional compuesta de péptidos, con una región activa conocida como sitio activo o centro activo, que interactúa con el sustrato. Esta región activa, que determina la especificidad a la enzima, generalmente se encuentra en el interior de la misma (Gonzalo-Ruiz, 2006; Serna-Cock *et al.*, 2009). Las proteínas son ricas en grupos nucleofílicos, pero los electrófilos están pobremente representados. En algunos casos, el componente de proteína solo, es inadecuado para catalizar una reacción dada, por lo que la naturaleza recluta algunos componentes no proteicos llamados cofactores para generar una catálisis funcional. En tales enzimas, el componente inactivo proteico sin el cofactor es llamado apoenzima y la enzima activa, incluyendo al cofactor, holoenzima (Punekar, 2018).

En las bases de la experiencia, podríamos decir que el uso o la adaptación de las enzimas en los biosensores comenzó con el profesor Leland C. Clark Jr., que en 1962 en un simposio de la Academia de Ciencias de Nueva York, se preguntaba cómo hacer que los sensores electroquímicos fueran más inteligentes, llegando a la conclusión que agregando transductores enzimáticos como sándwiches encerrados en membranas, haciendo el primer biosensor de glucosa (Newman *et al.*, 2006). Sin embargo, hay otros autores mencionan que el primer biosensor enzimático (también para ensayos de glucosa) fue creado en 1967 por Updike y Hicks. En este sensor, un transductor y una enzima correspondiente al componente objetivo se combinan para producir una señal que puede amplificarse, procesarse o almacenarse. De modo que cuando un elemento biológico electroactivo sufre una reacción de oxidación o reducción, produce una corriente medida por un biosensor amperométrico (Reena *et al.*, 2023; Blum *et al.*, 2009).



Una de las grandes ventajas de utilizar enzimas, además de su alta selectividad, es su menor tiempo de respuesta en relación con otros tipos de bioreceptores, la posibilidad de regenerarse, y la simplicidad con que se pueden construir los dispositivos. Los biosensores basados en enzimas, son más específicos que los biosensores basados en células. Como desventajas, es importante considerar que las enzimas pierden actividad al ser inmovilizadas en la superficie del electrodo y tienen una vida útil relativamente corta (Gonzalo-Ruiz, 2006; Kaur *et al.*, 2019; Serna-Cock *et al.*, 2009).

La actividad enzimática está regulada, es decir, esta propensa a la inactivación como cualquier otra proteína, por ciertas condiciones como el pH del medio, la fuerza iónica, la temperatura y, requiere en algunos casos, la presencia de un cofactor. El cofactor se trata de un producto químico no proteico necesario para que la reacción enzimática se lleve a cabo. Aparte del posible efecto de esas condiciones, la inactivación de una enzima puede ser posible debido a la proteólisis (por contaminación de la actividad de la proteasa) de la proteína enzimática (Gonzalo-Ruiz, 2006; Punekar, 2018; Mani *et al.*, 2016). Son óptimamente estables bajo condiciones específicas de las condiciones ya mencionadas. Estos parámetros difieren de enzima a enzima. Además, las condiciones no son necesariamente las mismas para una estabilidad óptima en comparación con la actividad enzimática óptima. Las enzimas son mejor almacenadas a bajas temperaturas, pero sin congelar y descongelar repetidamente. (Punekar, 2018; Rocchitta *et al.*, 2016).

La actividad enzimática es profundamente dependiente del pH y la temperatura. Ya que los valores de pH van de 0 a 14 en ambientes acuosos, más de un tipo de buffer podría requerirse para un experimento. Además del pH, y por ende su pKa, la elección de un buffer depende de muchos factores, ya que algunos buffer pueden tener efectos adicionales sobre la enzima. La determinación experimental del valor de pH óptimo se puede obtener con una gráfica de pH contra actividad, diferentes enzimas tienen diferentes pH óptimos, y esto puede ser debido al pH fisiológico en el que la enzima funciona (Punekar, 2018; Rocchitta *et al.*, 2016).

Al igual que otras proteínas, una enzima experimenta desnaturalización térmica a altas temperaturas. Por encima de cierta temperatura, la tasa de catálisis enzimática empieza a disminuir. A la temperatura óptima, la actividad enzimática y la inactivación compiten, lo que lleva a un punto máximo en la curva temperatura contra actividad. De modo que la



temperatura óptima (T_{opt}) es una consecuencia de estos dos procesos. Además, esta T_{opt} puede variar para una misma enzima dependiendo de la presencia de estabilizadores, pH, entre otras (Punekar, 2018).

Existen diferentes tipos de enzimas según el tipo de reacción que llevan a cabo, de acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, la clasificación consiste de seis grupos principales: las transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas, y oxidorreductasas (Gonzalo-Ruiz, 2006; Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022). El sufijo –asa (derivado de la diastasa, nombre que se adoptó allá por 1833 para cualquier catálisis de origen biológico) se recomendó para todos los nombres de las enzimas por Declaux en 1898, ese sufijo se añade al nombre del sustrato cuya reacción catalizan. Las enzimas proteolíticas son una excepción significativa a esta *norma* generalmente aceptada, algunas de ellas han conservado la tradición más antigua de terminar generalmente con –ina, por ejemplo: tripsina, quimotripsina, papaína, y subtilisina (Punekar, 2018; Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022).

Las transferasas se encargan de catalizar la transferencia de un grupo funcional (amino, carboxilo, metilo, etc.), de un sustrato a otro. Las hidrolasas catalizan reacciones de hidrólisis y la escisión de enlaces como el C-O, C-S, C-N, u O-P. Las liasas catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos, catalizan la escisión de enlaces como C-C, C-S o C-N, excluyendo los enlaces peptídicos. Las isomerasas catalizan la conversión de isómeros, que interconvierten cualquier tipo de isómero, tanto óptico como geométrico o posicional. Las ligasas catalizan la unión de dos moléculas diferentes, formando enlaces como C-C, C-S, C-O, y C-N por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP. Y las oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidorreducción (o redox), es decir, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro. Dentro de éstas, hay una subclase donde podemos encontrar las oxidasas, las deshidrogenasas, las peroxidasas y las oxigenasas, las cuales requiere de coenzimas durante la catálisis (por ejemplo, NAD^+ , $NADP^+$, $NADH$, ATP FAD , $FADH$). En las enzimas oxidasas, el cofactor más común es el flavín adenín dinucleótido (FAD) (Gonzalo-Ruiz, 2006; Rocchitta *et al.*, 2016; Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022).

Tabla 3. Clasificación de las enzimas de acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.

Enzima	Función general
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales como amino, carboxilo, metilo, entre otros, de un sustrato a otro.
Hidrolasas	Catalizar hidrólisis de enlaces como C-O, C-S, C-N, O-P.
Liasas	Catalizar adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces.
Isomerasas	Catalizar la conversión de isómeros.
Ligasas	Catalizar la unión de dos moléculas diferentes por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP.
Oxidorreductasas	Catalizar reacciones óxido-reducción (redox). Transferencia de hidrógeno o de electrones de un sustrato a otro.

En la actualidad, podemos ver la aplicación de las enzimas en biosensores electroquímicos, dentro de los cuales están los: amperométricos (y sus tres clases o generaciones, que miden el cambio en la corriente); los potenciométricos (cambio de potencial); conductimétricos e impedimétricos (cambio de la conductividad o resistividad eléctrica). También en biosensores ópticos, electroquimioluminiscentes (ECL), piezoeléctricos, y calorimétricos (Rocchitta *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2019).

La confianza con enzimas a partir de nuestra experiencia es tan fuerte que en la actualidad podemos gozar de este tipo de tecnologías aplicadas en diferentes sectores como lo son: en sector médico, medioambiental, industria alimentaria, farmacéutica, textiles, análisis de agua, seguridad, bioterrorismo, entre otras, introduciendo la tecnología por ejemplo: para detectar glutamato usando múltiples pruebas neuroquímicas, incluyendo micro sensores de fibra de carbono basados en enzimas o micro diálisis, en los que el biosensor enzimático utiliza glutamato oxidasa y glutamato deshidrogenasa como componentes de reconocimiento para detectar el glutamato; para determinación de glucosa (posiblemente el más estudiado y comercializado); para determinación de urea, fructosa, etanol, lactosa; monitorizar la concentración de contaminantes; análisis de carbohidratos, entre muchas otras más (Atilgan *et al.*, 2023; Gonzalo-Ruiz, 2006; Punekar, 2018; Kaur *et al.*, 2019; Serna-Cock *et al.*, 2009).



Sin embargo, a pesar de que en la mayoría de las aplicaciones, los límites de detección (LOD) son satisfactorios o incluso excesivos, hay aún problemas en el desarrollo de biosensores enzimáticos, relacionados con la estabilidad y reusabilidad de las enzimas durante el proceso de inmovilización, durante la reacción catalítica, y con respecto al almacenamiento. El costo, la estabilidad y la facilidad de fabricación de cada componente del biosensor también son preocupaciones importantes en el desarrollo de biosensores enzimáticos, y los peligros y la ética asociados a su desarrollo pueden inhibir su potencial uso comercial (Kaur *et al.*, 2019; Serna-Cock *et al.*, 2009).

4.13. Creatinasa

La creatinasa, también puede encontrarse con los nombres de creatina amidinohidrolasa (CI), o con un identificador que es el EC 3.5.3.3, y se trata de un homodímero con pesos moleculares de subunidades de aproximadamente 45 a 51 KDa. Los dos sitios activos de la proteína están en la interfaz de los monómeros que comparten cada monómero y solo el dímero está activo. La enzima es parte de la familia de las hidrolasas, específicamente de aquellas que actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno que no son peptídicos, y más concretamente sobre amidinas lineales (Serafín *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006; Berberich *et al.*, 2005; Sugita *et al.*, 1992; Killard *et al.*, 2000; Sigma, 1996; Bai *et al.*, 2020; Kha *et al.*, 1997). Tiene su punto óptimo de funcionamiento en un pH de 8, y resulta más estable en un periodo de 24 horas si se encuentra a pH comprendidos entre 6-8 y a temperatura de 37 °C (Yoshimoto *et al.*, 1976).

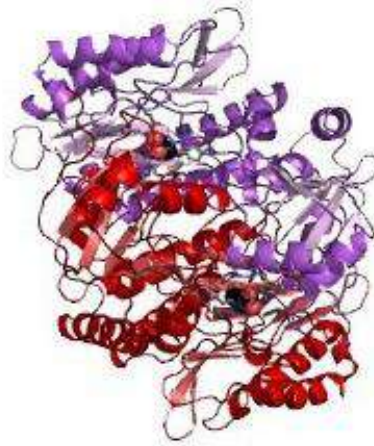


Fig. 14. Estructura tridimensional de la enzima creatinasa.

Las creatinasas han sido encontradas en bacterias tales como *Micrococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Paracoccus* y *Bacillus*. De entre ellas, la creatinasa de *Alcaligenes* y *Paracoccus* (con rango de estabilidad de pH entre 5.5-9.5) son adecuadas para el uso en diagnóstico debido a su superior afinidad de unión al sustrato (Jiang *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2020).

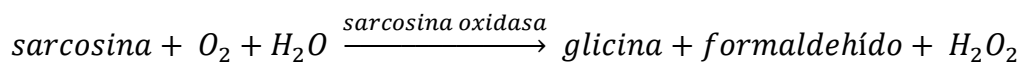
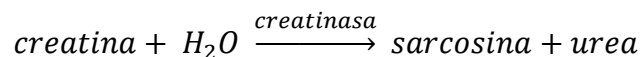
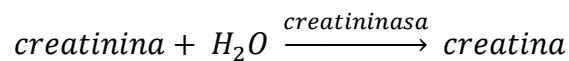
Es altamente deseable tener una enzima con gran actividad y buena termoestabilidad (Jiang *et al.*, 2023). La creatinasa es una enzima producida por microorganismos y tiene un papel muy importante en la detección de la función renal en humanos, cuyo interés se centra en que para 2040 se estima que la ERC sea la quinta causa de muerte a nivel mundial (Jiang *et al.*, 2023; Kha *et al.*, 1997). La creatinina, uno de los indicadores de salud metabólicos más importantes, es una sustancia de importancia en los ensayos de diagnóstico renal, tiroideo, y de funciones musculares, por lo que la evaluación de su clearance podría ser funcional para el diagnóstico biomédico, de ahí que la determinación de creatinina en fluidos biológicos sea de gran interés en la diagnóstica clínica (Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2021; Delgado *et al.*, 2021). Y con ello, la prevención y tratamiento del daño renal, seguido requiere de la detección de creatinina sérica. Los kits de detección y los sensores basados en la denominada cascada enzimática, comúnmente requieren de creatinasa (Jiang *et al.*, 2023).

Actualmente, hay reportados biosensores amperométricos y voltamétricos que incluyen las enzimas creatininasas (creatinina amidohidrolasa, CA), creatinasa (CI), y sarcosina oxidasa (SO), y la subsecuente detección del peróxido de hidrógeno generado. Entre estas enzimas,



la creatinasa es una de las más importantes, ya que es la que cataliza la hidrólisis de creatina para formar sarcosina y urea (Serafín *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2017; Berberich *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2021; Sugita *et al.*, 1992; Killard *et al.*, 2000).

En la actualidad, la determinación de creatinina en laboratorios clínicos se basa en la reacción de Jaffe en la que el grupo activo metileno de la creatinina reacciona con picrato de sodio alcalino para dar un complejo entre rojo-amarillo. (Wang *et al.*, 2006; Tabata *et al.*, 1992; Yadav *et al.*, 2012; Syme *et al.*, 2020; Killard *et al.*, 2000). La creatina puede ser hidrolizada en urea y sarcosina por la creatinasa, y la urea resultante reaccionará con p-dimetilaminobenzaldehído para producir ese tinte amarillo. De manera que se puede determinar la concentración de urea a través de la medición de la concentración del tinte amarillo con un lector de microplacas a 435 nm, o bien podría seguirse el sistema de reacción y degradar hasta formar la glicina, el formaldehído y el peróxido de hidrógeno, este último que en presencia de 4-aminoantipirina y fenol y catalizado por peroxidasa, podría formar un tinte rojo, con una máxima absorbancia en 500 nm. Sin embargo, esta reacción no es específica para la creatinina y varias sustancias podrían interferir en este ensayo, lo que limita su aplicación (Wang *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2023; Kha *et al.*, 1997). El principio de determinación y proceso de degradación de la creatinina es el siguiente (Wang *et al.*, 2006; Serafín *et al.*, 2013; Tabata *et al.*, 1992; Sigma, 1996; Killard *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2020):

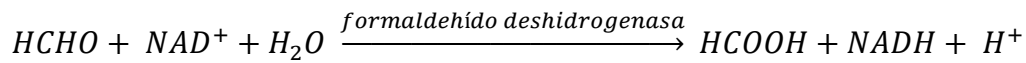


Las tres reacciones sucesivas pueden llevarse a cabo óptimamente a un pH de 8.5, a pesar de los perfiles de pH diferentes de las tres enzimas en solución (Tabata *et al.*, 1992). Otro sistema consta de dos reactivos a partir de la obtención de peróxido de hidrogeno que son el 2,4-diclorofenol sulfonato (2,4-DCPS) y 4-aminoantipirina (4-AA), como se muestra a continuación (Masaru *et al.*, 1984):





O bien, la determinación de la creatinina con el formaldehído (HCHO) formado al final de la cascada de reacción, como se describe a continuación (Sugita *et al.*, 1992):



Como enzima esencial en el ensayo enzimático en cascada, la estabilidad de la creatinasa es menor que de la creatinasa y de la sarcosina oxidasa, por lo que, diseñar una creatinasa con excelente estabilidad y alta actividad a sus temperaturas ambiente de trabajo (25-37 °C) es de gran importancia práctica (Jiang *et al.*, 2023). Además, la creatinasa ha sido ampliamente usada en la determinación del contenido de creatinina, ya que su producción y excreción en suero es relativamente estable, por lo que suele considerarse más precisa en cuanto al reflejo de la función glomerular que la concentración sérica de urea (Kha *et al.*, 1997).

4.14. Creatinasa

La creatinasa también conocida como creatinina amidohidrolasa (EC 3.5.2.10), cataliza la conversión reversible de creatinina a creatina (Ito *et al.*, 2002; Wyss *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000). La enzima fue encontrada por primera vez en *Pseudomonas Putida* por Tsuru y colaboradores en 1976, aunque más recientemente se ha detectado actividad de creatinasa en *Alcaligenes*, *Arthrobacter* y especies *Flavobacterium*, y además, es miembro de la superfamilia de las amidohidrolasas relacionadas con la ureasa, es decir, se encuentra dentro del grupo de enzimas clasificadas como hidrolasas, específicamente en aquellas que actúan en enlaces Carbono-Nitrógeno en amidas cíclicas, y cuyo identificador es EC 3.5.2.x (Ito *et al.*, 2002; Wyss *et al.*, 2000).

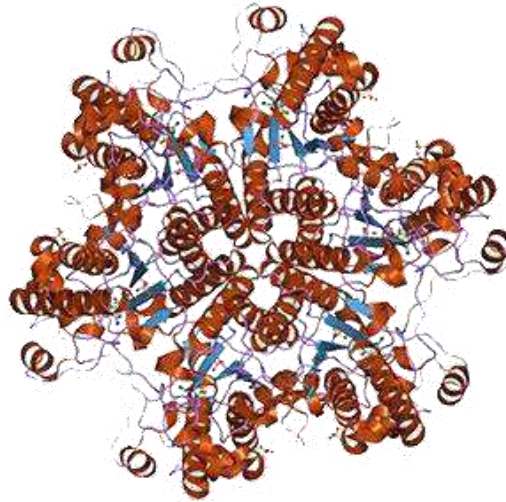


Fig. 15. Estructura tridimensional de la enzima creatinasa.

Las creatininasas son estables en un amplio intervalo de pH y temperatura, presentando un pH óptimo entre 7 y 9 en ambas direcciones de la reacción, y una temperatura óptima de 70 °C. El peso molecular de la enzima se ha estimado en 175000 Da con un peso molecular de subunidad de 23000 Da, sugiriendo que la enzima se compone de ocho monómeros de subunidades, es decir, una molécula octamérica. De igual manera se sabe que cada subunidad o monómero contiene un átomo de zinc, los cuales indican la ubicación del sitio activo (Wyss et al., 2000; Sorachim, 2021; Rikitake et al., 1979).

Se ha usado como enzima clave en la medición enzimática de creatinina por acoplamiento con creatina aminohidrolasa y sarcosina oxidasa. El mecanismo de reacción se mostró en la sección anterior, en el apartado de la creatina. Su análisis diagnóstico de creatinina en suero y orina es crucial para evaluar la función renal (Ito et al., 2002; Tang et al., 2000). Como la creatinina es aclarada exclusivamente por FG, la concentración de SCr, frecuentemente se emplea como biomarcador, y es aceptada como la medida más indicativa de función renal (Schoenmakers et al., 1993; Ou et al., 2015). Incluso, su determinación junto con la determinación de creatina, ya sea en orina o suero, es de importancia, además de lo ya mencionado, para el diagnóstico de función muscular y funciones tiroideas (Tang et al., 2000; Yadav et al., 2012). Además, se sabe que esta enzima participa en el metabolismo tanto de la arginina como de la prolina (Jitonnom et al., 2017).



4.15. Ureasa

La ureasa también llamada urea amidohidrolasa o E.C. 3.5.1.5, es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a amonio(o amoniaco) y carbamato (o ácido carbámico), el cual es el paso final del metabolismo del nitrógeno en organismos vivos. El carbamato se descompone rápida y espontáneamente, produciendo una segunda molécula de amonio y bicarbonato. Estas reacciones causan un significativo incremento del pH de la solución, cambio que es notorio al tener en la solución rojo-fenol, para de esa manera observar un cambio de color de amarillo a rosa brillante. Estas variaciones en la intensidad podrían medirse por espectrofotometría (Vassiliou *et al.*, 2008; Torres-Rodríguez *et al.*, 2008; Shaba *et al.*, 2023; Reyes É. *et al.*, 2012; Kretsinger *et al.*, 2013; Benini *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2016; Sujoy *et al.*, 2013; Zimmer, 2000). Se trata de una metaloenzima (dependiente de níquel), que junto a otras enzimas (proteinasas, fosfolipasas y lacasas) se considera como un importante factor de virulencia en muchos microorganismos como *Proteus mirabilis* y *Helicobacter* (Torres-Rodríguez *et al.*, 2008; Kretsinger *et al.*, 2013; Benini *et al.*, 2013). Las ureasas son metaloenzimas ubicuas que contienen níquel y son producidas por plantas, hongos y bacterias, pero no por animales, que catalizan la hidrólisis de urea. La ureasa que más se extrae es la del frijol Jack y tiene una actividad máxima en pH de 7.4-8 y una temperatura óptima de 60 °C. Si la enzima se añade a una solución ácida, un cambio rápido de ácido a base ocurre después de un periodo de tiempo controlable (Shaba *et al.*, 2023; Bujanja *et al.*, 2018; Kretsinger *et al.*, 2013; Benini *et al.*, 2013; Sigma-aldrich, 2013). Las ureasas pertenecen a la súper familia de amidohidrolasas y fosfotriesterasas (Sujoy *et al.*, 2013). Los organismos que producen ureasa suelen ser patógenos del tracto gastrointestinal o urinario, por ejemplo: *Helicobacter pylori*, bacterias entéricas (*Proteus*, *Kiebsiella* y *Morganella*), *Nocardia*, *Ureaplasma urealyticum*, *Cryptococcus*, y *Coccidioides* (Zimmer, 2000).

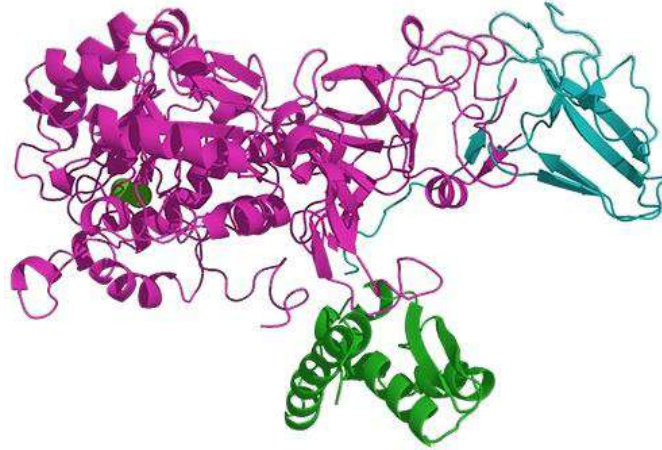
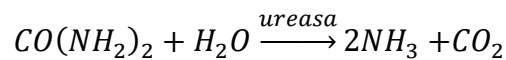
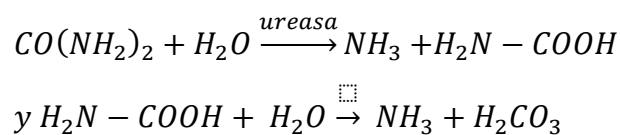


Fig. 16. Estructura tridimensional de la enzima ureasa.

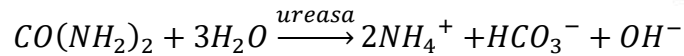
Las ureasas de bacterias son grandes metaloproteínas heteropoliméricas con iones de níquel (II) presentes en sus sitios activos. Uno de los mecanismos de reacción enzimática más confiable se describe a continuación. El sitio activo de la enzima nativa se une a tres moléculas de agua y un ion de hidróxido unido entre dos iones de níquel. La urea reemplaza estas tres moléculas de agua y está unida por una red de enlaces de hidrógeno, así como por los iones de níquel. Un átomo de carbono activado de urea es atacado por el ion hidróxido puente de Ni, formando un estado de transición tetraédrico. Posteriormente, se libera amoníaco del sitio activo seguido de carbamato cargado negativamente (Vassiliou *et al.*, 2008; Kretsinger *et al.*, 2013). Luego el carbamato se descompone para formar dióxido de carbono y otra molécula de amoníaco, lo que permite que la velocidad de reacción sea por al menos un factor de 10^{14} (otros señalan que de 10^{15}) más rápida en comparación con la descomposición de urea por reacción de eliminación (sin catálisis) (Shaba *et al.*, 2023; Reyes *É. et al.*, 2012; Benini *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2016). El mecanismo de reacción se muestra a continuación (Bubanja *et al.*, 2018; Sujoy *et al.*, 2013; Sigma-aldrich, 2013):



Con formación de bicarbonato (Reyes *et al.*, 2016):



O bien, en plantas (Kretsinger *et al.*, 2013):



Las ureasas provenientes de plantas, mantienen una posición especial en la historia de la ciencia, participando en algunos eventos bioquímicos importantes. Por ejemplo, contribuyó con tres hitos en la historia de la bioquímica. El primero de ellos, la ureasa de las semillas *Canavalia ensiformis* (Jack bean o frijol Jack) se aisló y cristalizó, demostrando la naturaleza proteicas de las enzimas. El segundo, el reconocimiento de la importancia biológica del níquel (Ni^{2+}) como obligatorio para la actividad catalítica de la ureasa. Y el tercero, la identificación de una toxina en una planta como una ureasa en 2001 puede considerarse como otro avance relacionado con las ureasas, lo que llevó al descubrimiento de propiedades de estas enzimas que no son catalíticas. Dentro de estas destacan la actividad insecticida, principalmente de las ureasas de plantas como la *G. max* (frijol de soya) y del frijol Jack. Las ureasas de plantas y hongos son homo-oligómeros de unidades de 90 kDa, mientras que las bacteriales son proteínas heterodiméricas o triméricas. Y se sabe que las ureasas de plantas pueden aplicarse al tratamiento de desórdenes de salud como infecciones gastrointestinales e hipertensión (Shaba *et al.*, 2023; Kretsinger *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2016; Sujoy *et al.*, 2013; Sigma-aldrich, 2013).

Las ureasas están presentes en diversos ámbitos, por ejemplo en la salud oral, ya que están involucradas en la alcalinización de la placa, a través de la generación de amonio mediante la vía de la deiminasa y la ureasa (por hidrólisis de la urea) por parte de microorganismos como *Streptococcus sanguinis* o *Streptococcus gordonii*. O en la colonización de ambientes ácidos del estómago para proveer un microambiente alcalino por la actividad de la ureasas de *H. pylori*, aunque la colonización de la mucosa gástrica en humanos por especies *Helicobacter*, regularmente causan gastritis, úlceras, e incluso cáncer gástrico. El cambio de pH inicialmente es lento debido a que se neutraliza con el ácido del medio, y en la reacción urea-ureasa se puede observar una aceleración en la tasa de consumo del reactivo, la urea (Reyes *et al.*, 2012; Eaton *et al.*, 1991; Bubanja *et al.*, 2018; Kretsinger *et al.*, 2013; Benini *et al.*, 2013; Morou-Bermudez *et al.*, 2015). La actividad de la ureasa de microorganismos infecciosos, por ejemplo el caso de *U. ureolyticum*, puede contribuir al desarrollo de cálculos de infección, pielonefritis, encefalopatía hepática, piedras en los riñones, infecciones en el tracto urinario, entre otros problemas (Sujoy *et al.*, 2013; Morou-Bermudez *et al.*, 2015).



Entre algunos inactivadores de ureasa se encuentran los fosforamidatos, dipéptidos hidroxámicos, compuestos de azufre, y existen moléculas además de la urea, que también pueden funcionar como sustratos de la ureasa, como la formamida, acetamida, N-metilurea, hidroxiiurea y diferentes tipos de amidas de ácido fosfórico (Vassiliou *et al.*, 2008; Benini *et al.*, 2013; Sigma-aldrich, 2013). Además, niveles de pH bajo 4 o 5 también podrían inactivar la enzima, así como desnaturalizarse a temperaturas mayores a 45 °C por más de 60 minutos (Reyes É. *et al.*, 2012; Benini *et al.*, 2013; Sigma-aldrich, 2013).

4.16. Sarcosina oxidasa

La sarcosina, también conocida como N-metilglicina, es un aminoácido natural que puede encontrarse en músculos y otros tejidos. También puede considerarse como un metabolito intermedio involucrado en la síntesis y degradación de la glicina. Su suplementación puede usarse para aliviar síntomas de depresión y esquizofrenia. Además, actualmente una de las mayores aplicaciones de este analito es con relación a niveles elevados en suero asociados con cáncer de próstata, además, se sabe que puede encontrarse en tejido de la próstata, sangre y orina, este último biofluido de interés para este trabajo (Hroncekova *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2018; Narwal *et al.*, 2018; Jornet-Martínez *et al.*, 2019). Niveles significativos de sarcosina están presentes en la orina y existe una problemática con estos ya que, de acuerdo a diversos autores, estos pueden variar de 20 nM a 5 µM (Hroncekova *et al.*, 2023), o bien de 1-20 µM (Rebelo *et al.*, 2014), pero los valores de referencia para orina que usaremos son de 80.1-1975.8 ng/mL (Fernández-Puig, 2019). En sangre los valores de concentración van de 1.4 ± 0.6 µM en personas sanas, y de 2-10 µM en pacientes con cáncer de próstata (Kumar *et al.*, 2018; Narwal *et al.*, 2018).

Ahora bien, la sarcosina oxidasa (SOx), que también puede encontrarse como EC 1.5.3.1, y sarcosina: oxígeno oxidoreductasa, es una enzima que puede producirse a partir de diferentes bacterias incluyendo *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* y *Pseudomona* y que contiene residuos de flavina adenina dinucleótido (FAD). Se ha reportado que su pH óptimo de actividad está en el rango de 7.5-9 (pero se toma 8.3) y su temperatura óptima de actividad en un rango de 28-80 °C (pero se toma 37 °C), esto por las variedad de enzimas de la familia (Shi *et al.*, 1997; Santos-Damião, 2019; Tong *et al.*, 2014; Mukouyama *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 1996; BRENDA-Enzymes, 2023; IUBMB, 2022). La SOx se

encarga de catalizar la desmetilación oxidativa de la sarcosina y como resultado produce cantidades equimolares de formaldehído, glicina, y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Santos-Damião, 2019; Rebelo *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2014; Matsuda *et al.*, 1987). Generalmente, todas las SOx son enzimas oxidorreductasas que pertenecen a la clase enzimática (EC) 1.5 y oxidan el enlace N-metil de varias aminas, de ahí, la mayoría de las enzimas usan oxígeno como aceptor de electrones (perteneciendo así a la EC 1.5.3) (Lahham *et al.*, 2021).

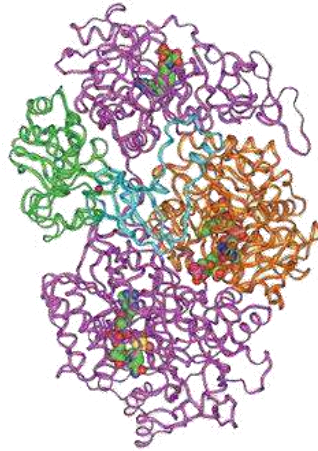


Fig. 17. Estructura tridimensional de la enzima sarcosina oxidasa.

Existen diferentes tipos de SOx, éstas a su vez pueden agruparse en tres subclases de acuerdo con su estructura cuaternaria: monómeros, heterodímeros, y heterotetrámeros (Santos-Damião, 2019). Aunque, generalmente, es la monomérica (MSOx) la que puede y la que se usa como herramienta de diagnóstico para evaluar la función renal dado que tiene la capacidad trabajando en conjunto con la creatinasa y creatinina, y su estructura monomérica sólo contiene flavina unida covalentemente (Santos-Damião, 2019; Suzuki, 1994). La familia SOx es un grupo de flavoenzimas bien conocidas por oxidar aminas secundarias y terciarias. El nombre de la familia se origina de la MSOx de *Bacillus* que fue la primera enzima del grupo en ser estudiada extensivamente como modelo para esta familia. Actualmente, dentro de la familia se incluyen varias enzimas como la SOx tetramérica (TSOx), N-metil triptófano oxidasa (MTOx), pipecolato oxidasa (PIPOx), L-prolina deshidrogenasa (LPDH), fructosil aminoácido oxidasa (FAOx), sacaropina oxidasa, NikD y FsqB, las cuales tienen diferencias estructurales y bioquímicas, denerando así diferentes reacciones, trabajando con diferentes sustratos y generando diversos productos (Lahham *et al.*, 2021).



4.17. pH en orina

La orina, que se produce continuamente en las nefronas, actúa como el medio para eliminar muchos productos de desecho del metabolismo. Su formación implica tres procesos: la filtración del plasma sanguíneo en los glomérulos, la reabsorción tubular, y la secreción de ciertos componentes en los túbulos renales. El principal componente de la orina es el agua y los principales solutos son urea, cloruro, sodio y potasio; a continuación, fosfato, sulfato, creatinina, y ácido úrico. Desde un enfoque funcional, la formación de orina es un proceso de purificación selectiva que evita la pérdida de elementos esenciales para el cuerpo, elimina componentes tóxicos y excedentes acumulados en el plasma, y mantiene la homeostasis (De Buitrago, 2010; Ávila *et al.*, 2021).

El análisis de la orina, uroanálisis, o también conocido como examen general de orina (EGO), ha proporcionado mucha información desde épocas muy antiguas. Se podría datar de estos análisis desde el siglo V a. C., con el libro que Hipócrates escribió sobre uroscopia, en los que diagnosticaban la diabetes, si al orinar el paciente sobre el suelo, al poco tiempo abundaban las hormigas, o más reciente en 1850 con las primeras nociones de la tira reactiva por parte de Jules Maumené, por poner ejemplos. Inicialmente, una evaluación meticulosa del aspecto y algunas cualidades organolépticas de la orina permitió diagnosticar enfermedades como la diabetes mellitus y la diabetes insípida. Este análisis comprende diversas pruebas que identifican las distintas sustancias eliminadas por el riñón, proporcionando resultados que, si se interpretan correctamente, pueden ofrecer información tan detallada como una biopsia renal (De Arriba de la Fuente *et al.*, 2011; Lozano-Triana, 2016; Arispe-Quispe *et al.*, 2019; Campuzano-Maya *et al.*, 2006).

Las recolecciones para los análisis de la orina se recomienda hacerlos en la primera micción de la mañana, y debe de mantenerse a temperatura ambiente antes de ser estudiada, ya que a 4 °C de temperatura se favorece su estabilidad pero facilita la precipitación de algunas sales como uratos o fosfatos. Se podría clasificar en características físicas, como el color, olor, apariencia, y presencia de cristales, y características químicas como es el pH (De Arriba de la Fuente *et al.*, 2011).

El color de la orina es un color ámbar-amarillo de una intensidad variable, dependiendo de la cantidad de pigmentos (urocromos como porfirinas, bilirrubina, uroeritrina y urobilina),



que contiene y de la cantidad de agua en la que estén disueltos. El color amarillo de la orina varía desde tonalidades claras hasta oscuras, dependiendo de su grado de concentración. El color mismo podría verse alterado por razones como: la presencia de células y sustancias endógenas patológicas como hemoglobina, mioglobina, bilirrubina conjugada, porfirinas o ciertos aminoácidos; por la eliminación de algunos fármacos; y por la eliminación de derivados de alimentos como remolacha o zanahoria (De Arriba de la Fuente *et al.*, 2011; Lozano-Triana, 2016; Campuzano-Maya *et al.*, 2007; De Buitrago, 2010; Ávila *et al.*, 2021; Arispe-Quispe *et al.*, 2019). La orina puede tener tonalidades roja, naranja, parda, verde, azul e incluso negra. Algunos colores en la orina podrían ser útiles y específicos para probables diagnósticos, por ejemplo: rojo en hematuria no glomerular, hemoglobinuria, mioglobinuria e infecciones por *Serratia marcescens* (Lozano-Triana, 2016; De Buitrago, 2010; Laso, 2002; Campuzano-Maya *et al.*, 2006).

En cuanto al olor, la orina normal suele estar débilmente aromatizado y predominan los elementos derivados del nitrógeno (como el amonio). El olor normal de la orina se denomina *sui generis*, y se describe como urinoide. En presencia de patologías, puede modificarse presentando un olor característico, por ejemplo cuando existe un aumento de cuerpos cetónicos (olor dulce), o en presencia de algunas infecciones, olor a fruta dulce cuando se tiene diabetes mellitus (DM), a azúcar quemada cuando se tiene leucinosis, a ratón con fenilcetonuria, a pescado con hipermetionemia, o a sudor de pies con aciduria por ácido butírico o hexanoico (De Arriba de la Fuente *et al.*, 2011; Lozano-Triana, 2016; Campuzano-Maya *et al.*, 2007; Campuzano-Maya *et al.*, 2006).

Respecto a su aspecto, la orina generalmente es clara y transparente. Sin embargo, puede volverse turbia debido a la presencia de diversos elementos como células, cristales, cilindros, detritus, proteínas, grasas y moco. Esta turbidez puede ser indicativa de ciertas enfermedades, como el síndrome nefrótico, que se manifiesta con orina espumosa y lechosa debido a la presencia de proteínas y colesterol (Lozano-Triana, 2016; Arispe-Quispe *et al.*, 2019).

En la orina normal aparecen cristales sobre todo en determinadas condiciones de pH y sobresaturación de sales (relacionado también con la formación de piedras). Así, puede contener cristales de oxalato cálcico, ácido úrico, urato sódico, uratos amorfos, fosfato cálcico, carbonato cálcico y magnesio. En las orinas alcalinas los principales son los de



fosfato triple y carbonato cálcico (De Arriba de la Fuente *et al.*, 2011; Lozano-Triana, 2016; De Buitrago, 2010; Campuzano-Maya *et al.*, 2006). Tienen poca importancia clínica y sólo tienen importancia patológica en determinadas situaciones, especialmente en trastornos metabólicos y formación de cálculos. La interpretación de los cristales depende del pH de la orina, ya que algunos de estos precipitan a valores distintos (Lozano-Triana, 2016). Los cristales de ácido úrico (acidez menor a pH 5.5) se han encontrado en leucemias, fiebre, y gota, los de uratos amorfos presentes en estados febriles, los de oxalato cálcico están relacionados con dietas con ajo, naranja, tomate, y en patologías como DM, hepatopatías y litiasis, los de carbonato cálcico asociados a dieta vegetariana e infecciones urinarias, los de fosfato-ácido cálcico (pH superiores a 6.2) aparecen en hiperfosfaturia, hipercalciuria, y obstrucciones urinarias, y los de fosfato-amonio-magnesio cuando existe infección urinaria por bacterias productoras de amonio con probabilidad de cálculos coraliformes de fosfatos triples o estruvita (Lozano-Triana, 2016; Romero-Salas *et al.*, 2021). Los cristales que se consideran anormales y tienen relevancia clínica son los de leucina (indicativos de leucinosis y hepatopatías graves), cistina (que señalan cistinuria), tirosina (presentes en tirosinosis y hepatopatías graves), colesterol (asociados al síndrome nefrótico y quiluria), bilirrubinas (característicos de hiperbilirrubinemias), sulfonamidas e indinavir (observados en pacientes con VIH tratados con dicho fármaco) (Lozano-Triana, 2016).

Respecto a las características químicas, el pH de la orina es un parámetro de interés significativo, ya que indica la presencia de iones hidrógeno y, en individuos sanos, puede variar considerablemente, principalmente en función de la dieta.. Las dietas con más proteínas, ceto-acidosis diabética, infecciones por *E. Coli*, fiebre, acidosis respiratoria, entre otras, condicionan un pH urinario más bajo o ácido (<6), cosa contraria sucede en dietas vegetarianas, ingesta de diuréticos, alcalosis respiratoria, vómito, acidosis tubular renal distal o tipo I y en casos en que la urea se convierte en amoniacó, generando un pH alcalino (cuando es >6.5). Estos análisis se pueden realizar con tiras reactivas generando resultados en segundos, las cuales se basan en el cambio de color, por reacciones químicas entre sustancias de la tira y la orina, proporcionales a la concentración de las sustancias y expresadas en resultados cualitativos o semicuantitativos, o bien con el uso de un instrumento llamado pH-metro (De Arriba de la Fuente *et al.*, 2011; Lozano-Triana, 2016; Cochat *et al.*, 2016; De Buitrago, 2010; Zopfi-Rubio., 2019).



El pH urinario varía desde 4.5-8, que son los valores conocidos con los que los riñones normales producen la orina, proceso que se realiza para mantener el equilibrio ácido-base del organismo. Se entiende por niveles normales de pH urinario normales entre 5-6.5 en la orina de la primera muestra de la mañana, parámetro que varía de acuerdo al equilibrio ácido-base sanguíneo, a la función renal, y en menor medida a la dieta, fármacos, y al tiempo de exposición de la muestra. A lo largo del día es donde varía de 4.8-7.4. Por ello, esta medición es muy útil, especialmente en situaciones en las que el riñón tiene una dificultad inherente para eliminar protones, como en algunas acidosis tubulares renales. Pacientes con $\text{pH} < 7$ debido a acidosis metabólica por ayuno prolongado, insuficiencia renal, o acidosis tubular renal. Pacientes con $\text{pH} > 7$ debido a alcalosis metabólica por deficiencia grave de potasio, ingestión excesiva de álcalis o diuréticos (De Arriba de la Fuente *et al.*, 2011; Lozano-Triana, 2016; Campuzano-Maya *et al.*, 2007; De Buitrago, 2010; Arispe-Quispe *et al.*, 2019; Laso, 2002; Manzanares, 2015; Bueno *et al.*, 2007; Campuzano-Maya *et al.*, 2006; Parrales *et al.*, 2023).

4.18. Inmovilización de enzimas

La inmovilización es un proceso en el que las moléculas de enzima se limitan a un soporte sólido o sustrato de conversión de matriz en el producto deseado, facilitando la producción de compuestos por reacciones catalíticas enzimáticas. Por lo tanto, la inmovilización de una enzima se denomina aprisionamiento de un catalizador en un soporte o matriz, por ejemplo inorgánicos como silicón, vidrio, o materiales orgánicos como polímeros o hidrogeles. Para que un biosensor sea viable, la enzima debe adherirse al modelo para mantener la actividad. La etapa de inmovilización, tomando en cuenta la metodología para ello, es de lo más crucial en la fabricación de un biosensor, ya que determina aspectos fundamentales como la durabilidad y la sensibilidad del dispositivo. Las ventajas del uso de biomateriales inmovilizados incluyen: estabilidad mejorada de los bioreceptores preservando en gran medida su eficacia haciéndolas más resistentes a los entornos circundantes (optimizando pH, temperatura y parámetros cinéticos), una fácil recuperación tanto de la enzima usada como del material de soporte, disminuyendo el coste del proceso, fácil transporte de la enzima de un lugar a otro, y que se hace un proceso completo más viable económicamente. Aunque como inconvenientes, se puede tener: la posible modificación de la estructura del material

biológico en comparación con su estado natural, y posibles pérdidas de su actividad catalítica. Una alta eficacia de la técnica de inmovilización se puede atribuir en parte a las condiciones suaves con que se haga, minimizando la desnaturalización de la enzima (Kaur *et al.*, 2019; Gonzalo-Ruiz, 2006; Luckarift *et al.*, 2004; Pierre *et al.*, 2006; Ong *et al.*, 1989; Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016; Fernandez-Lafuente, 2023; Guzik *et al.*, 2014; Mateo *et al.*, 2007; Motta *et al.*, 2023).

Los diferentes métodos de inmovilización utilizados para desarrollar biosensores enzimático son: por adsorción, atrapamiento, cross-linking, encapsulación, reacciones de afinidad y por enlaces covalentes. La selección de la técnica o método de inmovilización está condicionada por diversos factores como: la naturaleza del elemento biológico, el tipo de transductor utilizado, el entorno operativo del biosensor, las propiedades físicas y químicas del analito, etcétera. Dentro de estos métodos se pueden dividir en reversibles entre ellos la adsorción, enlace iónico, y por afinidad, e irreversibles entre ellos enlace covalente, atrapamiento, encapsulación, y cross-linking (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2019; Sadani *et al.*, 2022; Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016; Morshed *et al.*, 2019).

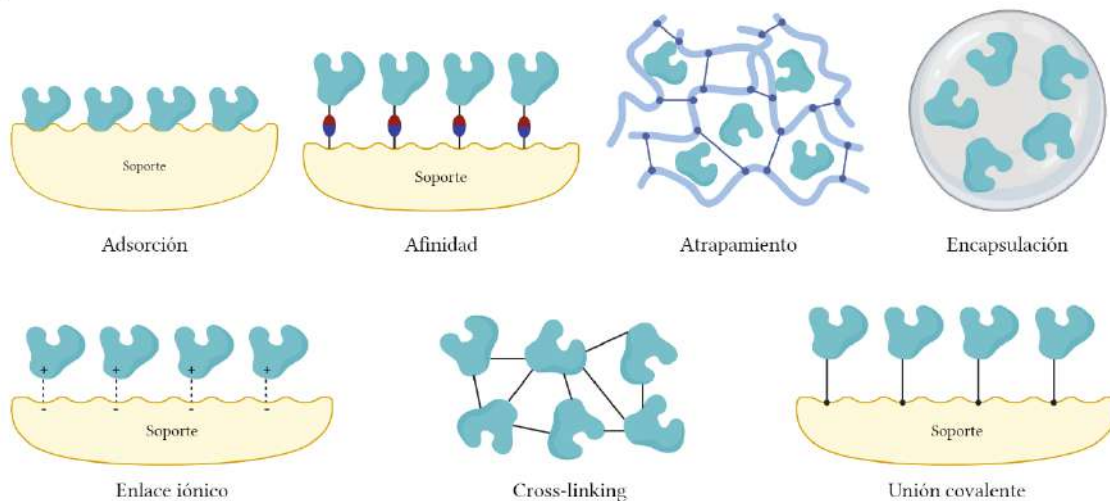


Fig. 18. Representación gráfica de los métodos de inmovilización de enzimas (Creada en BioRender.com).

La adsorción es el método más simple de inmovilización. Generalmente se realiza disolviendo las enzimas en una solución tampón y poniéndola en contacto con el soporte sólido durante un tiempo. Los enlaces formados en este enfoque de inmovilización son débiles, como las fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces salinos y las



interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, entre el transportador y la enzima. El principal inconveniente de esta estrategia es que cualquier cambio en las condiciones del medio, como pH, temperatura o fuerza iónica, puede producir la desorción de la enzima, afectando la estabilidad del biosensor. Es una técnica de preparación fácil y económica, que no altera la especificidad enzimática, pero su inconveniente radica en su limitada estabilidad mecánica debido a la débil unión al soporte (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2019; Sadani *et al.*, 2022; Gonzalo-Ruiz, 2006; Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016).

El atrapamiento puede llevarse a cabo por diferentes métodos, pero el más utilizado es la polimerización electroquímica. La inmovilización de enzimas puede realizarse dentro de una matriz tridimensional, mediante una sencilla metodología en la que enzimas, mediadores y aditivos pueden depositarse simultáneamente en la superficie del electrodo. Implica la captura física de la enzima dentro de los poros de una matriz sólida. Es un proceso experimental simple y no demanda una cantidad significativa de material biológico. Como ventajas, la estructura de la enzima no se ve afectada, permite altas cargas de enzima, bajo costo de fabricación, mejora la estabilidad mecánica, hay menor transferencia de masa, y la actividad de las enzimas se conserva ya que no hay modificación de los elementos biológicos (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2019; Sadani *et al.*, 2022; Gonzalo-Ruiz, 2006; Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016).

Otro enfoque útil para la inmovilización de enzimas es la reticulación (entrecruzamiento intermolecular o cross-linking), estrategia en la que las enzimas están interconectadas a través de enlaces covalentes sin transportistas. Es un método muy simple que permite una fuerte unión química mediante la presencia de agentes enlazadores, utilizados como puentes entre dos moléculas de enzimas adyacentes. En este método, se usan dos o más grupos funcionales junto con una matriz que es capaz de unirse a dos materiales diferentes en diferentes condiciones. El biomaterial se une químicamente al soporte o a un agente de reticulación; el más utilizado es el glutaraldehído. Este método se utiliza para estabilizar moléculas adsorbidas pero aumentando la unión. La ventaja es que, dado que las biomoléculas están unidas a la matriz, las posibilidades de desorción son mínimas o nulas (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2019; Gonzalo-Ruiz, 2006; Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016).



La encapsulación de enzimas en liposomas es otro enfoque utilizado en sensores enzimáticos. Las enzimas se inmovilizan encerrándolas dentro de membranas poliméricas semipermeables esféricas con porosidad controlada. Esta estrategia permite la estabilización de la enzima, manteniendo su actividad por más tiempo y, en consecuencia, mejorando el rendimiento y la estabilidad del sensor. Involucra el atrapamiento de varias biomoléculas dentro de diferentes matrices poliméricas. Es un análogo al atrapamiento en el sentido en que tanto la enzima y las celdas están libres en las soluciones aún controladas en un espacio. La encapsulación mantiene los sistemas biológicos en una fina película para evitar que los biocatalizadores entren en contacto con el medio ambiente, lo que podría dañar su eficiencia (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022; Gonzalo-Ruiz, 2006; Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016).

La inmovilización orientada de enzimas se puede realizar creando enlaces de afinidad entre soportes activados y grupos específicos de la secuencia peptídica de la enzima. La enzima puede contener etiquetas de afinidad (ligandos) de forma natural dentro de su secuencia, o puede insertarse antes usando métodos de ingeniería genética o química (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022; Dwevedi *et al.*, 2016). Por otro lado, el enlace iónico es una técnica de inmovilización sencilla, económica y reversible que implica la interacción iónica entre las enzimas y los materiales de soporte. Esto se basa en interacciones iónicas entre moléculas de enzima con una matriz cargada. Aquí, cuanto mayor sea la densidad de carga superficial en la matriz, mayor será la cantidad de enzima unida a la matriz. La naturaleza de esta inmovilización no covalente es que el procedimiento simplemente se invierte alterando la temperatura y la fuerza iónica. (Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016).

El acoplamiento covalente entre enzimas y sustratos poliméricos es muy popular en el desarrollo de biosensores enzimáticos. Consiste en la unión de las enzimas a la superficie mediante grupos funcionales que no intervienen en la actividad catalítica. Para realizar una inmovilización covalente se suele realizar una activación previa de la superficie utilizando reactivos multifuncionales, como el glutaraldehído o la carbodiimida. La enzima reacciona con el soporte activado, uniéndose covalentemente a la superficie del transductor o a una membrana activada hecha de polímeros sintéticos. Una reacción tiene lugar en condiciones suaves, como un rango de pH, temperatura y fuerza iónica bajos. Para la unión se utilizan grupos nucleofílicos tales como cadenas laterales de proteínas que tienen un grupo amino,



carboxílico, tiol, hidroxilo, fenólico, etc. La desventaja durante el enlace covalente es que puede alterar la estructura conformacional, lo que resulta en una pérdida de actividad. Pero también hay varias ventajas como la producción de enzimas durables y la obtención de suficiente cantidad de enzima para reusarse, además de que gracias a este tipo de enlace, se incrementa la estereoespecificidad de la enzima, elevando así su estabilidad (Amor-Gutiérrez *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2019; Sadani *et al.*, 2022; Gonzalo-Ruiz, 2006; Maghraby *et al.*, 2023; Dwevedi *et al.*, 2016).

La mayoría de las enzimas, a excepción de algunos ácidos nucleicos, son moléculas funcionalmente activas y su funcionalidad se conserva en un rango predefinido de pH, temperatura y solvente de concentración de iones específicos como se especifica en la hoja de datos. Sin embargo, para el diseño de biosensores de punto de uso que utilizan enzimas como elemento de bioreconocimiento, esto es una limitación. Algunas consideraciones genéricas para el diseño de interfases incluyen una alta relación superficie/volumen que permite una gran superficie de biocatálisis; alto punto isoeléctrico de la interfase de manera que las enzimas de puntos isoeléctricos más bajos pueden capturarse electrostáticamente; facilitar el proceso rápido de transferencia de electrones; permitir una fácil funcionalización e integración con el transductor de manera repetible. Algunos de los materiales más usados para la inmovilización son: materiales plasmónicos, MOFs, materiales fluorogénicos, polímeros conductores, y materiales híbridos (Sadani *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2019).

4.19. Nanoesferas de quitosano

La quitina es el segundo polisacárido natural más común a nivel mundial, justo detrás de la celulosa (Bashir *et al.*, 2022; Safari *et al.*, 2015). La calidad del quitosano es determinada por la fuente de la quitina, su preparación y el grado de desacetilación. Varias especies tanto acuáticas como terrestres, tan bien como ciertos microbios, son las fuentes principales de quitina y quitosano. Está disponible en bajos y altos pesos moleculares, comprendidos entre 3800 y 20000 Da, y tanto la quitina como el quitosano son un recurso sostenible. En cuanto a formas de presentación se tienen: películas, esferas, nanopartículas y partículas de tipo amorfo (Bashir *et al.*, 2022; Grenha, 2012; Chandran *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2015).

El quitosano es un biopolímero biodegradable y biocompatible derivado de la desacetilación de la quitina, tiene una estructura base de carbohidrato similar a la celulosa con dos tipos de



unidades repetitivas alternas, unidades de glucosamina y N-acetil glucosamina (específicamente β -D-glucosamina y N-acetil- β -D-glucosamina), unidas por un enlace glucosídico 1-4, y es un polisacárido lineal catiónico blanquecino e inelástico semicristalino (Bashir *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2015; Safari *et al.*, 2015; Tree-udom *et al.*, 2011; Cavalli *et al.*, 2014; Léost *et al.*, 2018). La presencia de grupos amino ($-\text{NH}_2$) en su estructura, le confiere una naturaleza catiónica, por otro lado, la presencia del grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) atrae moléculas cargadas positivamente para mejorar el enlace, estos grupos (OH y NH_2) pueden activar los componentes nucleofílicos y electrofílicos de las reacciones mediante enlaces de hidrógeno y pares solitarios, respectivamente; esto facilita la formación de enlaces de hidrógeno con otros polímeros con grupos COOH (carboxilo) y NH_2 . Es insoluble en la mayoría de los componentes orgánicos y agua pura, y soluble en la mayoría de soluciones que contengan ácidos minerales y orgánicos, tales como el ácido cítrico, ácido tartárico, y ácido acético (Bashir *et al.*, 2022; Safari *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2013).

Es uno de los polímeros naturales más comúnmente usados. Se utiliza en agricultura para producir fertilizantes, en industria alimentaria como recubrimientos, en aplicaciones biomédicas, en medicina para cicatrización y sistemas de liberación de medicamentos, en tratamiento de agua, en control de la contaminación, en fotografía, en fabricación de papel, en cosmética para hidratación de piel, membranas, celdas de combustible, hidrogeles, adhesivos, y muchos otros usos (Bashir *et al.*, 2022; Grenha, 2012; Ikono *et al.*, 2018; Safari *et al.*, 2015).

Las diferentes propiedades y características del quitosano lo hacen un excelente biomaterial para varias aplicaciones biomédicas, estas son: es biodegradable, biocompatible, no tóxico, antiinflamatorio, hemocompatible, antioxidante, anticancerígeno, antimicrobiano, de bajo costo, amigable para el ambiente, hidrofilia, química y térmicamente estable. Dentro de estas se podría destacar que no causa inflamación severa o estimulación del sistema inmune (Bashir *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2015; Grenha, 2012; Ikono *et al.*, 2018; Safari *et al.*, 2015; Cavalli *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2022). Además, se sabe que con varios grados de desacetilación y pesos moleculares tiene baja toxicidad, además de sus propiedades bactericidas debido a la naturaleza catiónica. De igual forma, cuando se tiene un quitosano



con baja desacetilación y bajo pH se mejora la actividad antibacterial (Bashir *et al.*, 2022; Grenha, 2012).

Las nanopartículas en general son hechas de diferentes materiales, con un rango de tamaños de 1-1000 nm considerados para nanomedicina y aplicaciones biomédicas. En cuanto a las nanopartículas de quitosano (ChNP), existen diferentes métodos de síntesis, una de las primeras descritas fue a través de emulsificación y entrecruzamiento (cross-linking), de hecho, el método más reciente usa el tripolifosfato (TPP) aniónico como reticulante (o cross-linker). Sin embargo hay otros, hoy en día más comunes, como pueden ser: la gelificación ionotrópica, la complejación de polielectrolitos, método micelar inversivo, desolvatación, nano precipitación (o técnica de desplazamiento del disolvente), secado por pulverización, coalescencia de emulsiones y gotas, difusión del disolvente en emulsión, todas estas comprenden procesos de fabricación bottom-up, ya que son sencillas (Bashir *et al.*, 2022; Grenha, 2012; Ikono *et al.*, 2018; De Gaetano *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2015; Léost *et al.*, 2018).

La formación y propiedades de las nanoesferas de quitosano se ve dependiente de varios factores como por los tipos de solventes, concentraciones de los reactivos, tiempos de reacción, mientras que su auto ensamblaje se confirman con los disolventes polares (Choochottiros *et al.*, 2009; Grenha, 2012). En el trabajo de Choochottiros y sus colaboradores se reportó nanoesfera monodispersa con un tamaño de 150-160 nm, principalmente influenciada por el peso molecular del metoxi polietilenglicol usado (mPEG). También se sabe que los ácidos en los métodos de síntesis se añaden con el fin de mejorar la solubilidad del quitosano en la formación de esas nano/microesferas (Wang *et al.*, 2020). En ese mismo trabajo de Wang se cita que gracias a estos ácidos se pueden manejar tamaños de nanoesferas de hasta 65 nm. Por su parte, en el trabajo de Ikono, se reportaron nanoesferas con tamaños promedio de 32.97 ± 17.72 nm, y en el trabajo de Chang se reportaron nanoesferas con dimensiones de 159.64 ± 19.87 nm (Chang *et al.*, 2020). Lo que claramente nos indica cómo es posible obtener diferentes tamaños de nanopartículas.

Las NP de quitosano tienen diversas aplicaciones en la entrega de medicamentos no parenterales para tratar infecciones oculares, cáncer, enfermedades gastrointestinales, enfermedades respiratorias, entre otras. Con respecto a las nanoesferas de quitosano, éstas



han recibido más atención debido a su buena biocompatibilidad, capacidad de ser un acarreador y su capacidad de liberación (Kong *et al.*, 2013; Bashir *et al.*, 2022). Las nanoesferas, además, tienen como ventaja el contar con una estructura geométrica estable, una gran superficie específica, alta porosidad, buena estabilidad química, y buena capacidad de diseño (Yang *et al.*, 2022).

Hablando específicamente de las ChNP, estas incluyen características y ventajas de ambas partes, es decir, tanto del quitosano como de las nanopartículas (Bashir *et al.*, 2022). Las ChNP tienen características únicas que le permiten un mayor afinidad por las membranas biológicas cargadas negativamente, así como una orientación específicas del sitio in vivo, como resultado, se pueden usar para cargar eficazmente fármacos, enzimas y ácidos nucleicos. Esta característica es propia del quitosano que puede ser fácilmente modificado química o físicamente, además, el número de grupos hidroxilo y amino activos son mayores en las ChNP que en el quitosano normal, lo que le permite llegar a ser un versátil material de soporte, para diferentes especies catalíticas (Bashir *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2015; Safari *et al.*, 2015). Estas ChNP aumentan la capacidad de los compuestos bioactivos para disolverse, atrapar, encapsular y/o adherirse a la matriz de NP, y estos sistemas poseen grandes áreas superficiales donde se pueden absorber bioactivos (Bashir *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022).



5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. Hipótesis

El uso de nanoesferas de quitosano y su funcionalización con enzimas, en conjunto con un sistema cromogénico, será capaz de detectar analitos asociados a problemas renales mediante la detección colorimétrica.

5.2. Objetivos

Mediante el sensado de urea en un rango de 0.1321-0.4324 mg/mL y creatinina de 0.7-1.75 mg/mL, por medio de procesamiento de imagenología en ensayos de colorimetría podrán brindar una herramienta auxiliar de análisis clínico para la detección de problemas renales en adultos mayores de manera no invasiva implementando el sistema en pañales para adultos.

5.2.1. *Objetivo General*

Desarrollar un multi-sensor microfluídico colorimétrico no invasivo para detección de urea y creatinina.

5.2.2. *Objetivos específicos*

- Desarrollar la fase sensora utilizando las enzimas para detección colorimétrica de urea y creatinina, esta última mediante medición directa e indirecta (con creatina y sarcosina).
- Evaluar los parámetros cinéticos de inmovilización de las enzimas en las plataformas utilizadas.
- Construir curvas de calibración para detección de urea y creatinina por medio de procesamiento de imágenes.
- Diseñar y construir el prototipo del dispositivo microfluídico, de modo que pueda ser implementado en pañales para adultos.
- Diseñar e implementar una aplicación para el reconocimiento óptico a partir de dispositivos móvil para detección de los biomarcadores en tiempo real.



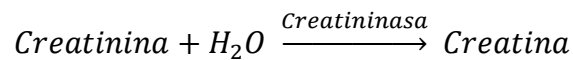
6. METODOLOGÍA

6.1. Ensayos enzimáticos

A continuación, se presentan los ensayos enzimáticos para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa a primera instancia, de la cantidad de analito de interés presente en las muestras a analizar, dichos analitos son específicos a cada una de las enzimas respectivas de cada ensayo. Los ensayos se obtuvieron de Sigma-Aldrich, misma compañía de la cual se obtuvieron los reactivos necesarios para llevar a cabo cada una de las pruebas.

6.1.1. Ensayo enzimático de la creatininasasa

El principio en el que se basa es el siguiente:



Considerando las condiciones de temperatura a 37 °C y pH de 6.5.

El método en el que se basa este ensayo es colorimétrico.

Ahora bien, el procedimiento del ensayo Sigma-Aldrich para la determinación colorimétrica de creatininasasa se divide en dos pasos y se describen enseguida, tanto para la prueba como el blanco:

Para el primer paso, en tubos de ensayo pipetear 100 µL de solución Buffer de fosfato de potasio 300 mM, pH 6.5 a 37 °C y 800 µL de solución de creatinina 100 mM, mezclando por agitación a 37 °C. A continuación, se añaden 100 µL de solución de enzima creatininasasa (5-10 unidades/mL), la cual debe de ser preparada inmediatamente antes de usarse en buffer de fosfato de potasio 10 mM, pH 8.0 frío (esta parte no aplica para el tubo de ensayo del blanco). Inmediatamente se mezcla por agitación y se equilibra a una temperatura de 37 °C, incubándola durante 10 minutos. Después, se añaden 2 mL de solución de carbonato de sodio 189 mM y cloruro de mercurio 0.1 mM; y solo al blanco se le añaden 100 µL de solución de enzima de creatininasasa. Se deja mezclar bien por agitación.

Para le segundo paso, es necesario construir una curva de estandarización, para ello se pipetea en tubos de ensayo (para prueba y blanco) 900 µL de agua desionizada, 500 µL de solución de a-Naphtol 139 mM, 500 µL de solución alcalina de hidróxido de sodio 300 mM

y carbonato de sodio 300 mM, y 500 μL de solución diacetilo 0.05 % (v/v) mezclando bien por agitación. Luego, se añaden 100 μL de solución prueba del primer paso al tubo de ensayo de prueba del segundo paso, y 100 μL de solución blanco del primer paso al tubo de ensayo del blanco del segundo paso. Se mezcla respectivamente cada tubo por agitación a 25 °C y se incuba durante 1 hora. Para posteriormente añadir a ambos 2.5 mL de agua desionizada y nuevamente, mezclar por agitación.

La curva de estandarización se realiza pipeteando las cantidades para los estándares, en las cantidades que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4. Preparación de estándares para curva de estandarización del ensayo enzimático de creatinasa.

	Estándar 1 (μL)	Estándar 2 (μL)	Estándar 3 (μL)	Estándar 4 (μL)	Estándar 5 (μL)	Estándar blanco (μL)
Agua desionizada	980	960	940	920	900	1000
a-Naphtol	500	500	500	500	500	500
Solución alcalina	500	500	500	500	500	500
Solución de diacetilo	500	500	500	500	500	500

Una vez teniendo las cantidades para cada estándar, se mezcla por agitación cada una, para después añadir solución estándar de creatina 4 mM en las cantidades que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Cantidades de solución estándar de creatina para cada estándar del ensayo enzimático de creatinasa.

	Estándar 1 (μL)	Estándar 2 (μL)	Estándar 3 (μL)	Estándar 4 (μL)	Estándar 5 (μL)	Estándar blanco (μL)
Solución estándar de creatina	20	40	60	80	100	---

Se mezcla nuevamente por agitación cada estándar y se incuba a 25 °C durante una hora. A continuación se añaden las siguientes cantidades de agua desionizada.

Tabla 6. Cantidades de agua desionizada para cada estándar del ensayo enzimático de creatininas.

	Estándar 1 (mL)	Estándar 2 (mL)	Estándar 3 (mL)	Estándar 4 (mL)	Estándar 5 (mL)	Estándar blanco (mL)
Agua desionizada	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50

Nuevamente se mezcla por agitación, y una vez terminado, se mide la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro UV-vis.

Los cálculos para la construcción de la curva de estandarización se muestran a continuación:

$$\Delta A_{525nm} \textit{ Estándar} = A_{525nm} \textit{ Estándar} - A_{525nm} \textit{ Estándar blanco}$$

Y se grafica $\Delta A_{525nm} \textit{ Estándar}$ contra μmoles de creatina.

Para la determinación en la muestra se usa la siguiente ecuación:

$$\Delta A_{525nm} \textit{ muestra} = A_{525nm} \textit{ Prueba} - A_{525nm} \textit{ Blanco}$$

Se determinan los μmoles de creatinina hidrolizada usando la curva de estandarización enzimática de la enzima creatininas

En seguida, se despliega la ecuación para determinación de actividad enzimática de la enzima creatininas.

$$\frac{\textit{Unidades}}{\textit{mL enzima}} = \frac{(\mu\text{moles de creatinina hidolizada}) (3) (df)}{(10) (0.1) (0.1)}$$

Donde:

3 = volumen (en mL) de reacción detenida,

df = factor de dilución,

10 = tiempo del ensayo (en minutos),

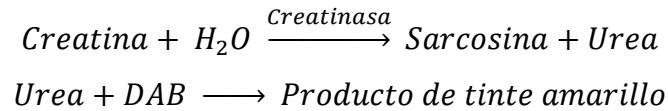
0.1 = volumen (en mL) de reacción detenida usada en la determinación colorimétrica,

0.1 = volumen (en mL) de enzima usada.



6.1.2. Ensayo enzimático de la creatinasa

El principio en el que se basa es el siguiente:



DAB = p-Dimetilaminobenzaldehído.

Tomando en cuenta las condiciones de temperatura a 37°C y pH de 7.5.

El método en el que se basa este ensayo es espectrofotométrico.

El procedimiento del ensayo Sigma-Aldrich para la determinación colorimétrica de creatinasa se describe enseguida, tanto para la prueba como para el blanco:

En tubos de ensayo se pipetea 900 µL de solución de creatina 100 mM, equilibrando la temperatura a 37 °C. Luego se añaden 100 µL de solución de enzima creatinasa (2-4 unidades/mL), la cual se prepara inmediatamente antes de usarse en buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5 frío (esta parte no aplica para el blanco). Inmediatamente se mezcla y se incuba a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se añaden 2 mL de solución DMAB (p-Dimetilaminobenzaldehído) 117 mM, y solo al blanco se añaden 100 µL de solución de enzima creatinasa. Se mezcla por agitación cada tubo de ensayo y se deja reposar por 20 minutos a 25 °C. Posteriormente se lee la absorbancia tanto de la prueba como de blanco, a una longitud de onda de 435 nm.

A continuación, se presenta la ecuación para determinación de actividad enzimática de la enzima creatinasa.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL enzima}} = \frac{(A_{435\text{nm}}\text{Prueba} - A_{435\text{nm}}\text{Blanco}) (3)(df)}{(0.321) (10) (0.1)}$$

Donde:

3 = volumen total del ensayo (en mL),

df = factor de dilución,

0.321 = coeficiente de extinción milimolar del tinte amarillo,

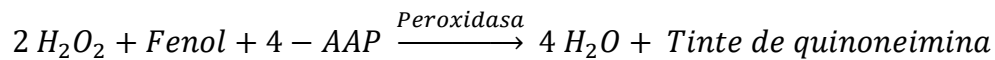
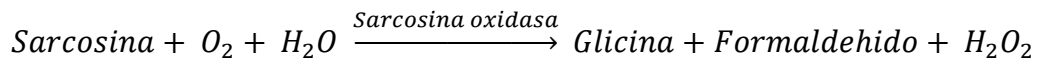


10 = tiempo del ensayo (en minutos),

0.1 = volumen de enzima usada (en mL).

6.1.3. Ensayo enzimático de la sarcosina oxidasa

El principio en el que se basa este ensayo enzimático es el siguiente:



4-AAP = 4-Aminoantipirina

Tomando en cuenta las condiciones de temperatura a 37 °C y pH de 8.3.

El método en el que se basa este ensayo es colorimétrico.

El procedimiento del ensayo Sigma-Aldrich para la determinación colorimétrica de sarcosina oxidasa se describe enseguida, tanto para la prueba como para el blanco:

En tubos de ensayo se pipetea 200 µL de agua desionizada, 50 µL de buffer tris-HCl 200 mM, pH 8.3, 50 µL de solución 4-AAP 15 mM, 50 µL de solución fenol 0.2 %, 50 µL de solución de enzima peroxidasa (que contenga 50 unidades de purpurogalina/mL), la cual se prepara inmediatamente antes de usarse en agua desionizada, y 100 µL de solución de sarcosina 1000 mM. Se mezcla bien y se equilibra a 37 °C. A continuación, se añaden al blanco 10 µL de solución de fosfato de potasio 10 mM, pH 7.5, y a la prueba 10 µL de solución de enzima sarcosina oxidasa (0.25-1 unidades/mL), la cual debe prepararse inmediatamente antes de usarse en solución de fosfato de potasio 10 mM, pH 7.5 frío. Se mezcla respectivamente cada tubo y se incuba a 37 °C durante 5 minutos. Luego, se añaden 2.5 mL de etanol tanto a la prueba como al blanco, y nuevamente se mezclan bien. Posteriormente, se leen las absorbancias para cada uno, a una longitud de onda de 480 nm.

A continuación, se presenta la ecuación para determinación de actividad enzimática de la enzima sarcosina oxidasa.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mg Proteína}} = \frac{(A_{480\text{nm}}\text{Prueba} - A_{480\text{nm}}\text{Blanco}) (3.01) (2)}{(17.14) (5) (\text{mg Proteína}/\text{RM})}$$



Donde:

3.01 = volumen total del ensayo,

2 = moléculas de peróxido de hidrogeno usadas por molécula de peroxidasa,

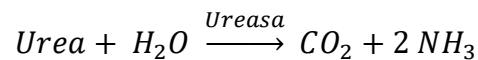
17.14 = coeficiente de extinción milimolar del tinte de quinoneimina a 480 nm,

5 = tiempo del ensayo en minutos,

RM = mezcla de reacción.

6.1.4. Ensayo enzimático de la ureasa

El principio en el que se basa este ensayo enzimático es el siguiente:



Tomando en cuenta las condiciones de temperatura a 30 °C y pH de 8.2.

El método en el que se basa este ensayo es espectrofotométrico.

El procedimiento del ensayo Sigma-Aldrich para la determinación espectrofotométrica de ureasa se describe enseguida, tanto para la prueba como para el blanco:

En un tubo de ensayo se pipetea 10 mL de solución de urea 66 mM, y se incuba a 30 °C. Después, en el tiempo cero se añaden 25 µL de solución de enzima ureasa (100-150 unidades/mL), la cual debe prepararse inmediatamente antes de usarse en buffer de fosfato de potasio 10 mM, pH 8.2, con cloruro de litio 10 mM y ácido etilendiaminotetracético 1 mM, frío. Una vez teniendo esto, en el mismo tubo de ensayo, se mezcla por inversión y de ahí mismo se remueve una alícuota de 1 mL, la cual se transfiere a un nuevo tubo de ensayo, el cual ya debe contener 5 mL de reactivo de color Nessler, el cual se prepara con reactivo Nessler, solución ficoll 0.4 % (p/v), y agua desionizada. Se mezcla y este nuevo tubo de ensayo será nuestro reactivo blanco. Se procede a incubar a 30 °C, para después, a 2, 4, y 6 minutos (incrementos de tiempo), transferir 1 mL de solución del tubo de ensayo de prueba en respectivos tubos de ensayo que contengan 5 mL de reactivo de color Nessler y mezclar cada uno por inversión. Posteriormente, se leen las absorbancias del blanco y de las pruebas a una longitud de onda de 480 nm.

Para el análisis colorimétrico es necesario preparar diferentes estándares como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 7. Preparación de estándares para la prueba colorimétrica del ensayo enzimático de ureasa.

	Estándar blanco (mL)	Estándar 1 (mL)	Estándar 2 (mL)	Estándar 3 (mL)	Estándar 4 (mL)	Estándar 5 (mL)	Estándar 6 (mL)
Agua desionizada	1	0.9	0.8	0.6	0.6	0.2	---
Solución estándar de amonio 2.5 mM	---	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Reactivo de color Nessler	5	5	5	5	5	5	5

Una vez teniendo cada cantidad en cada estándar, se mezclan y se leen las absorbancias para el estándar blanco y para cada uno de los estándares.

A continuación, se muestran los cálculos para la construcción de la curva de estandarización:

$$\Delta A_{480nm} \text{Estándar} = A_{480nm} \text{Estándar} - A_{480nm} \text{Estándar Blanco}$$

De donde se grafican los μmoles de NH_3 contra ΔA_{480nm} para obtener $\Delta A_{480nm} / \mu\text{mol NH}_3$.

Para la determinación en la muestra se usa la siguiente ecuación:

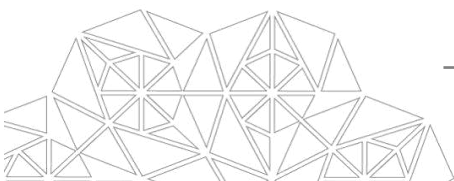
$$\Delta A_{480nm} \text{Prueba} = A_{480nm} \text{Prueba} - A_{480nm} \text{Reactivo blanco}$$

$$\frac{\Delta A_{480nm} \text{Prueba}}{\text{min}} = \frac{A_{480nm} \text{Prueba}}{\text{incremento de tiempo (en minutos)}}$$

A continuación, se presenta la ecuación para determinación de actividad enzimática de la enzima ureasa.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{g enzima}} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{480nm} \text{Prueba}}{\text{min}} \right) (1000)}{\left(\frac{\Delta A_{480nm}}{\mu\text{mol NH}_3} \right) \left(\frac{\text{mg enzima}}{\text{mL RM}} \right)}$$

Donde:





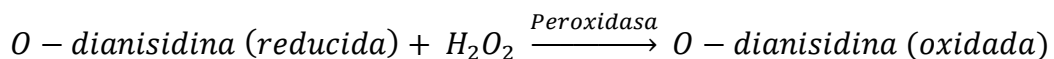
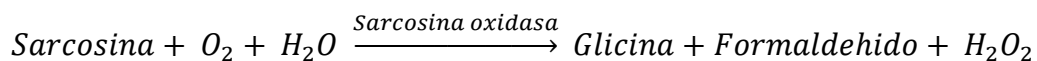
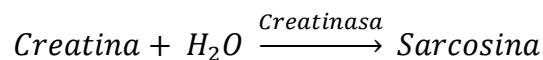
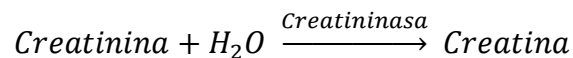
RM = mezcla de reacción,

1000 = factor de conversión para convertir miligramos a gramos.

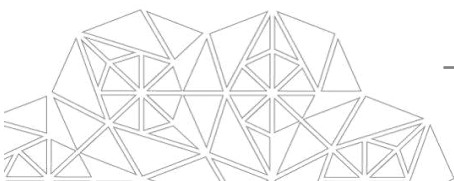
6.2. Diseño del prototipo

La cinta contendrá cuatro zonas de reconocimiento biológico y una de pH, las cuales interaccionarán idealmente con sus respectivos sustratos generando así, un cambio de color perceptible visualmente. La propuesta consta de una cinta de medidas 2cm x 9 cm, y del grosor de la cinta doble cara general de aproximadamente 1.5 mm, colocada en el centro del pañal, esto con la finalidad de poder utilizar la mayor cantidad de muestra, ya que es la posición ideal para su adquisición independientemente del género del usuario. Del mismo modo, para evitar inter-contaminación o algún tipo de bloqueo entre las zonas de reacción, se deja un espacio entre estas de 1 cm, como se muestra en la figura Fig. 19.

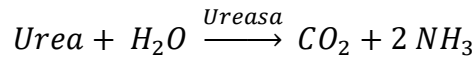
La cinta propuesta está basada en cinta doble cara, y las zonas de reacción están colocadas en un arreglo sobre papel filtro Whatman 1, ya que el tamaño de poro que ofrece este es ideal para la aplicación que se busca. Sobre el papel Whatman se colocará entonces el sistema de reconocimiento que consta para la zona de reconocimiento de creatinina: del conjunto de cuatro enzimas (a continuación se muestra la ruta de reacción) inmovilizadas sobre las nanoesferas de quitosano y agente cromogénico que es la o-dianisidina. Para la zona de reconocimiento de creatina y sarcosina, se omitirán, la primera, y la primera y segunda enzima de la ruta de reacción, respectivamente, manteniendo el mismo agente cromogénico. La ruta de reacción es la siguiente:



Para el caso de la detección de urea, se inmovilizará la enzima ureasa sobre las nanoesferas de quitosano depositadas en el papel filtro, y en este caso el agente cromogénico será el rojo fenol, susceptible a cambios de pH, cambios que serán generados por la concentración de



amoníaco. El mecanismo de reacción a seguir, será el mismo visto anteriormente en el ensayo enzimático.



Principalmente, lo que se desea sensar en el sistema en general, es urea, creatinina y pH. Sin embargo, se desean tener dos zonas de reacción más como control, para que en caso de no haber creatinina en la muestra, sea medida indirectamente. De manera que las dos zonas *extra* (que evaluarán Creatina y Sarcosina respectivamente) serán con el fin de evitar falsos positivos, o señalización errónea y la medición indirecta de creatinina.

La disposición general del sistema se propone de acuerdo al anagrama CrUpSaC para tener siempre un orden de los resultados obtenidos y saber a qué espacio corresponde cada cambio de color generado, y éste se leerá de arriba hacia abajo, tomando como referencia el pañal en la orientación que se muestra en la Fig. 19. El anagrama en cuestión corresponde a: Cr de creatinina, U de urea, p de pH, Sa de sarcosina, y C de creatina.

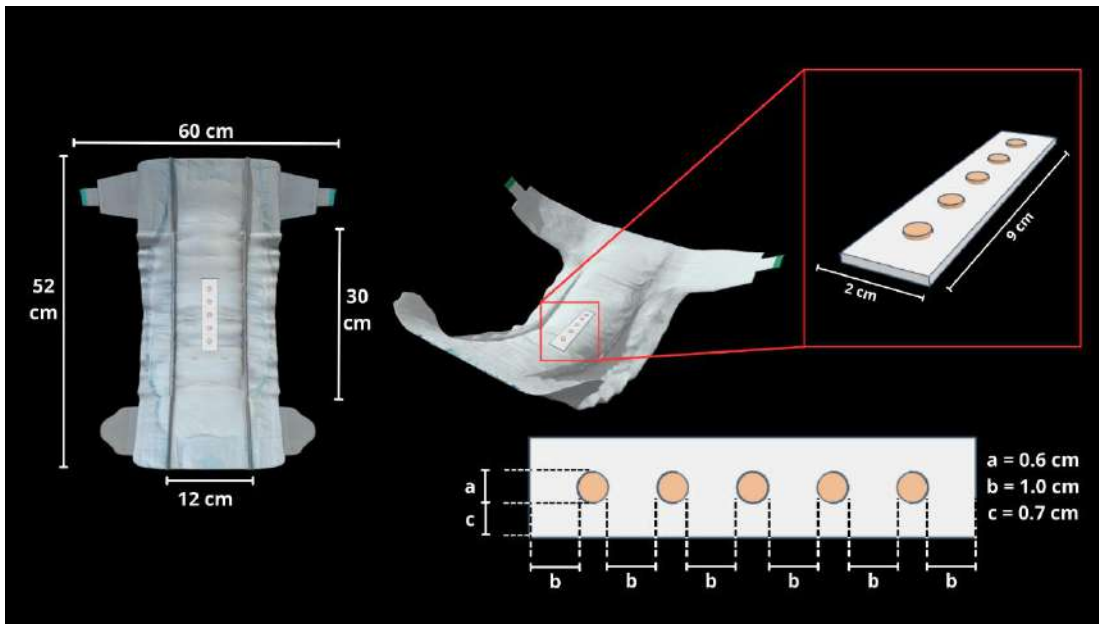
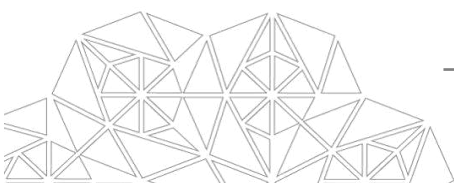


Fig. 19. Esquema representativo con medidas del prototipo de la cinta sensora multi-colorimétrica en un pañal común para adulto mayor.

La estructura básica de un pañal desechable consta de 4 capas principales: la capa superior que se encuentra directamente en contacto con la piel del usuario, la capa de adquisición que facilita la movilización de líquido lejos de la piel, el núcleo del pañal o también conocida



como la capa absorbente, y finalmente, la capa exterior u hoja trasera que es la capa resistente al agua cuya finalidad es evitar la filtración del líquido hacia fuera del pañal (Dey et al., 2016; Counts et al., 2017; Bachra et al., 2020; Nyamukamba et al., 2023). Dentro de los materiales más comunes para estas partes tenemos: polipropileno (PP) para la capa superior, poliéster para la capa de adquisición, polímeros superabsorbentes (como el poliacrilato de sodio) que pueden mezclarse con celulosa para la capa absorbente, y polietileno (PE) para la capa resistente al agua (Dey et al., 2014; Siregar, 2022; Nyamukamba et al., 2023).

Teniendo en cuenta esa distribución, la cinta estaría entre la capa del sistema de adquisición y la capa absorbente, con la finalidad de evitar el contacto de la piel con todo el sistema de reconocimiento, pero a la vez, que se garantice la llegada del fluido hasta estas zonas de reacción y se lleve a cabo su cometido, como se muestra en la Fig. 20.

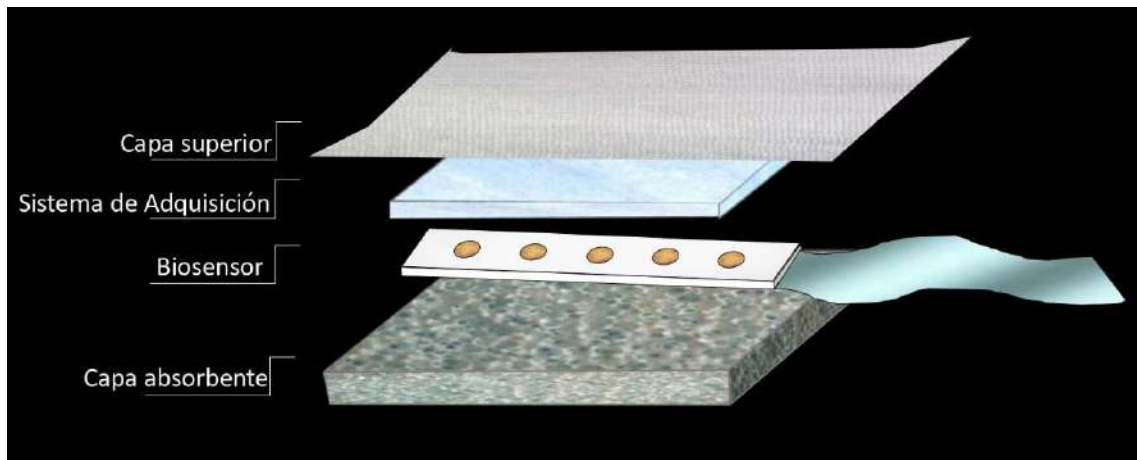
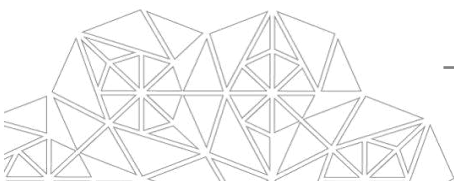


Fig. 20. Esquema de la distribución de capas integrando la capa de la cinta sensora o mejor llamada cinta biosensora, junto con la representación de la cinta de extracción.

De igual manera la cinta estará pegada completamente en una de sus caras (la cara posterior a la zona de reacciones) a una cinta de polipropileno (llamada cinta de extracción) de un espesor menor o igual a 2mm y el mismo ancho que la cinta sensora, la cual contará con dos extremos adhesivos, esto con el fin de que este adherido al pañal internamente, entre la capa del biosensor y la capa absorbente para evitar que la cinta sensora se mueva y cause problemas, y el otro extremo que estará por fuera del pañal (después de la capa resistente al agua), adherida a esta misma capa resistente al agua en la parte frontal del pañal, con el fin de poder despegarla y extraerla junto con la cinta sensora hacia el exterior para observar con mayor claridad los cambios colorimétricos. De manera que, la cinta de PP estaría atravesando





finamente tanto la capa absorbente, como la capa resistente al agua, en cuyas uniones o intersecciones con la cinta de PP estarían unidas mediante una unión térmica (Liu et al., 2019), esto con el fin de facilitar la extracción ya que si se cocieran estas intersecciones, se haría más complicado este paso.

Se eligió el polipropileno como material base para la cinta de extracción gracias a las propiedades que ofrece como: su módulo de elasticidad reportado cercano a los 1300 MPa lo cual lo hace flexible y a la vez le confiere cierta rigidez para que al momento de querer extraerlo no se rompa, su densidad de 0.905 g/cm³ lo cual permite añadirlo y no agregar un peso exagerado o notorio en el pañal general, su incapacidad de absorber humedad que nuevamente es ventaja para cuando se requiera extraer que no se rompa, su punto de fusión arriba de los 170 °C lo que garantiza que no habrá deformaciones de la cinta que generen complicaciones de extracción, y otras características más simples como que no tiene olor y es transparente, por lo que no dañara organolépticamente la imagen del pañal (British Plastics Federation, s. f.; Omnexus, s.f.; Roymaplast, s. f.; Sanmetal, s. f.).

6.3. Nanoesferas de quitosano

Las nanopartículas de quitosano se utilizarán como soporte para la inmovilización de las enzimas. El quitosano de bajo peso molecular se disolverá en tres soluciones acuosas de ácido acético glacial (0.5, 1.0, y 1.5 % v/v) para formar una solución de concentración final de 1.25 mg/mL. Esta solución se mantendrá en agitación por 24 horas a temperatura ambiente utilizando un agitador magnético. El pH inicial resultante será de 4.7 usando una solución de NaOH 1N. La solución se filtrará a través de una jeringa con un tamaño de poro de 0.45 µm para remover residuos de partículas insolubles. El tripolifosfato de sodio (TPP) será preparado y disuelto en agua ultra pura a una concentración final de 0.56 mg/mL con ayuda de agitación magnética. El TPP será agregado gota a gota con una jeringa de 2 mL en la solución de 5 mL de quitosano para la elaboración de las nanopartículas de QTPP. La mezcla se mantendrá en constante agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, la suspensión resultante con las nanopartículas se centrifugará a 3200 rpm por 20 minutos.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización de las nanoesferas de quitosano

7.1.1. Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las nanoesferas de quitosano

La técnica de caracterización por SEM, utiliza un haz enfocado de electrones de alta energía para obtener imágenes de la superficie de una muestra (Jha et al., 2023). Esto con el fin de revelar características propias del material como su morfología y tamaño (Zheng et al., 2023). En diversas investigaciones se han reportado morfologías esféricas usando el método de gelación iónica, en el cual el tripolifosfato de sodio (TPP) actúa como ligante (cross-linker), aunque los resultados obtenidos en ellos han sido considerablemente diferentes en cuanto al tamaño de las nanopartículas. Se han reportado tamaños de 40 nm (Zheng et al., 2023), de 90 nm (Kahdestani et al., 2020), de 71 nm (Kamat et al., 2016), y 200 nm (Jha et al., 2023), los cuales están dentro del rango ya que se sabe que todas las formulaciones basadas en éste método, pueden obtener tamaños de partículas desde 1 a 1000 nm (Asif et al., 2023).

La importancia del tamaño de las nanopartículas de quitosano (ChNP) juega un rol importante en cuanto sus propiedades por ejemplo: en el poder de conjugación con medicamentos, la cristalinidad, y la carga global (Jha et al., 2023)

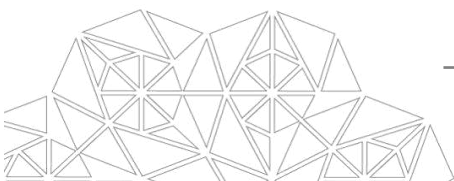
Además, se sabe gracias a estudios previos, que el tamaño de las NP es dependiente de ciertos factores tales como: la concentración de quitosano, la relación quitosano/TPP, el pH de la solución, y el nivel de deacetilación del quitosano. Estos factores en conjunto generan una desventaja del método en cuanto a la dificultad que tiene para producir tamaños uniformes (Kahdestani et al., 2020; Kamat et al., 2016; Jha et al., 2023). De igual manera, se han hecho estudios por simulación y experimentalmente para determinar la dependencia de la temperatura en los tamaños y distribuciones de estos de las NP, en donde se obtuvo que a menor temperatura, menor es el tamaño de las NP, con una distribución más estrecha (Kamat et al., 2016).

En este trabajo se obtuvieron las imágenes SEM para las nanopartículas de quitosano, como se muestra en la figura Fig. 21 a). Con los datos obtenidos, se realizó un análisis para obtener la distribución de áreas, y con ello, de diámetros de las nanopartículas obtenidas mediante el uso del software ImageJ, con el cual se pudo obtener el área de cada elemento de la imagen



SEM, como se muestra en la figura Fig. 21 b). De estos datos se generó el histograma por rangos de áreas para ver la distribución de las mismas y con ello generar un estimado del diámetro promedio de las nanopartículas, considerando a estas como esféricas, como se observa en la figura Fig. 21 c). De los datos generados, se obtuvo que el área promedio fue de $1.239 \mu\text{m}^2$, de modo que podemos referir a que el diámetro promedio es de aproximadamente 1256.0031 nm. Este último dato converge con lo que se muestra en la figura Fig. 21 d), en donde se tomaron indiscriminadamente nanopartículas para medir su diámetro, y como se observa, los valores son muy cercanos a este valor promedio.

Las nanopartículas con los menores diámetros obtenidos fueron de aproximadamente 80 nm, mientras que las más grandes fueron de aproximadamente 3534 nm, se puede conferir esa distribución tan amplia a los factores que ya se habían comentado, inherentes al método de síntesis. Sin embargo, también es importante mencionar que más del 50 % del material obtenido, está muy cerca del diámetro promedio, lo cual es bueno. De igual manera, se puede atribuir esa gran dispersión de tamaños a la rápida aglomeración de la solución de nanopartículas, influenciada a su vez por la temperatura y quizás también por el tamaño de diámetro de la aguja utilizada para el microgoteo de la solución.



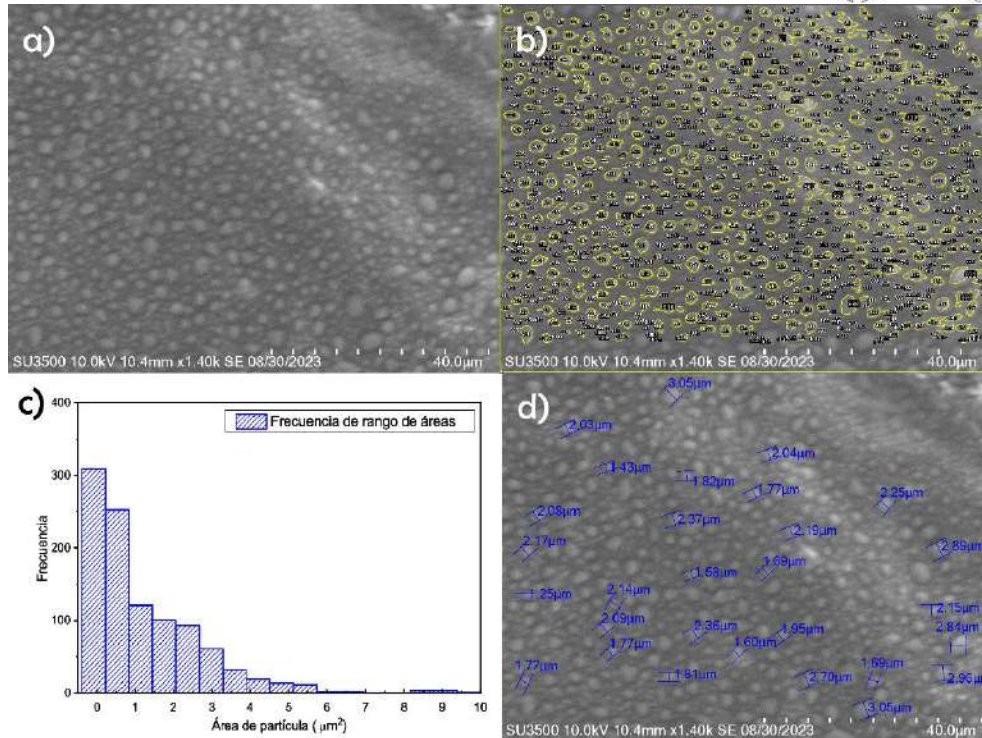


Fig. 21. Imagen SEM de las nanopartículas (nanoesferas) de quitosano obtenidas y su distribución de tamaños. a) Imagen SEM con resolución de 40 μm, b) Análisis de áreas realizada con el software ImageJ, c) distribución de la frecuencia de áreas de las nanopartículas, y d) Paneo de algunas nanopartículas mayores a 1000 nm.

7.1.2. Caracterización por espectroscopia Raman de las nanoesferas de quitosano

La espectroscopia Raman es una técnica sensible utilizada para detectar las modificaciones estructurales en complejos moleculares, como deducción de la excitación de los modos vibratorios asociados activos a Raman (Jha et al., 2023). Aunque es cierto que tanto Raman como infrarrojo pertenecen al mismo espectro vibratorio molecular, Raman se caracteriza por poder medir la muestra directamente sin pretratamiento, lo cual es adecuado para medir compuestos hidrosolubles (Ren et al., 2014). El efecto Raman se basa en la dispersión de la luz, que incluye tanto la dispersión elástica como la inelástica, esta última es la que sirve para esta técnica, que se genera por la excitación de una vibración molecular específica (Jha et al., 2023).

El quitosano ha sido analizado por esta técnica anteriormente, a cuyos picos se les han asignado ya una explicación, por ejemplo, en el rango de 1050-1200 cm^{-1} la región de estiramiento C-C, de 1290-1350 cm^{-1} la región de flexión CNH, en 1445 cm^{-1} amida-III (estiramiento C-N), en 1550 cm^{-1} amida-II (deformación de NH_2), y 1635 cm^{-1} amida-I

(estiramiento C=O) (Nirmala et al., 2011; Socrates, 2001). El pico más característico, independientemente del sustrato que se esté usando al hacer esta prueba, que se pueden usar para potenciar el resultado obtenido, es el de la región de $1050\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, al igual que uno cercano a los 1500 cm^{-1} , como se reporta en el estudio de Puente (2020).

Ahora bien, en cuanto a los picos característicos de nanopartículas de quitosano se ha reportado que son aquellos que aparecen en los correspondientes a la vibración de estiramiento de los anillos (969 cm^{-1} , 1212 cm^{-1} , 1325 cm^{-1}) y principalmente a la vibración de estiramiento C-H del epóxido (2837 cm^{-1}) (Ren et al., 2014).

En el presente trabajo se obtuvo el espectro Raman para las NEQ, como se muestra en la figura Fig. 22. En éste, se puede observar un claro pico cerca de los 920 cm^{-1} , el cual puede ser atribuido a la banda vibratoria de los enlaces C-C de ciclohexanos (como es el caso de la estructura quitosano), que debe observarse cerca de los 900 cm^{-1} (Socrates, 2001). Por otro lado, el pico, o los picos que se observan cerca de los 1450 cm^{-1} , pueden conferirse a los estiramientos C-N, como ya se había mencionado. Y por último pero no menos importante, el pequeño pico que se ve cerca de 650 cm^{-1} puede referir al enlace C-C=O (Ren et al., 2014), correspondientes quizás a quitina, que como precursor y ligado al grado de desacetilación del mismo quitosano, no formó quitosano.

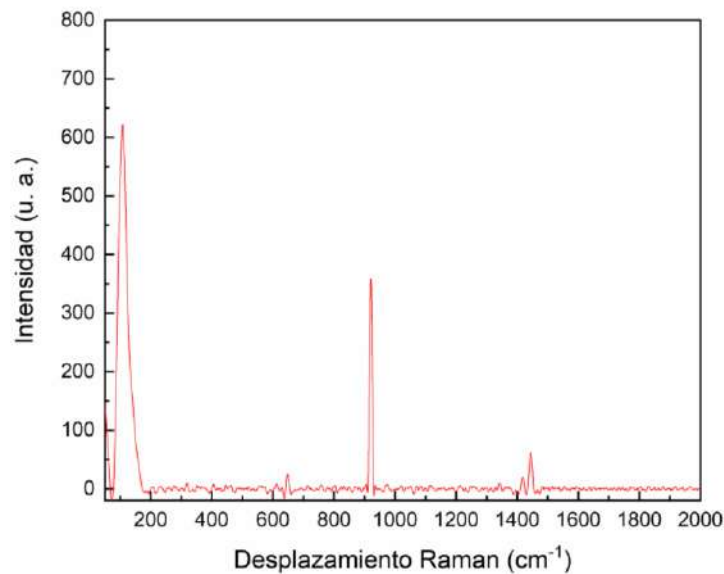


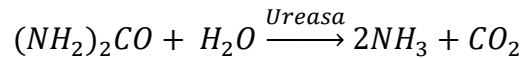
Fig. 22. Espectro Raman para las nanoesferas de quitosano (NEQ).



7.2. Evaluación enzimática de la enzima ureasa

7.2.1. Evaluación de la actividad enzimática de la enzima ureasa

Para llevar a cabo la medición de la actividad enzimática de la ureasa se realizó por el método de Nessler, cuyo principio experimental es provocar la hidrólisis catalizada de urea a amoníaco y dióxido de carbono, a un pH óptimo reportado de 7.0 (Liu *et al.*, 2021). La fórmula de la reacción es la siguiente:



Ecuación 1. Hidrólisis de la urea catalizada por la enzima ureasa..

De manera que el amoníaco producido, el cual causa un incremento en el pH (Bubanja *et al.*, 2018), reacciona con el reactivo Nessler (tetrayodomercurato de potasio (II)) (Palintest, 2023) para formar un complejo amarillo-ámbar, y su absorbancia es directamente proporcional a la concentración de amoníaco, logrando así determinar la actividad de la enzima. De igual manera hay que tener en cuenta que otros compuestos que contengan nitrógeno interfieren, produciendo una solución colorada u opalescente con el reactivo (Crosby, 1968). La longitud de onda a la que se debe de hacer la medición espectrofotométrica es de 480 nm (Liu *et al.*, 2021).

Se ha reportado también que puede existir una biestabilidad (sistema con dos estados de equilibrio estables) y oscilaciones en la actividad de la enzima, principalmente en soluciones no amortiguadoras, que se pudiera atribuir a la falta de estabilidad de la enzima, misma que puede incrementarse al inmovilizar sobre soportes sólidos. Sin embargo, un inconveniente potencial de la inmovilización es que, aunque aumenta la longevidad, normalmente hay una disminución en la actividad de la enzima, que puede atribuirse a cambios en el estado conformacional de la enzima, afectando el sitio activo, o bien, problemas de difusión que impiden el transporte del sustrato al sitio activo (Bubanja *et al.*, 2018).

7.2.1.1. Evaluación de la actividad enzimática de la enzima ureasa en estado libre e inmovilizada dependiente del pH

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de la actividad enzimática dependiente del pH, que podemos ver en la figura Fig. 23 se encontró que en estado libre el pH óptimo se encuentra en un rango de 7 a 7.75, siendo el óptimo reportado de entre 7.4 a 8 (Shaba *et al.*,



2023). Por otro lado, se evaluó la actividad de la enzima ureasa en dos soportes ligeramente diferentes, estos son: nanoesferas de quitosano (NEQ) y macroesferas de quitosano (MEQ). Cada uno de estos soportes nos exhibe actividades diferentes, por un lado la enzima soportada en MEQ muestra un rango de pH óptimo entre 6.5 a 7, mientras que las NEQ muestran un rango óptimo de pH entre 7 a 7.6, muy similar a los valores cuando ésta se encuentra en estado libre. Esto se debe a la producción de amoníaco, el cual modula la acidez de la solución mejorando la actividad. Sin embargo, también se observa el decaimiento de la actividad en valores más básicos, lo cual puede deberse a una posible distribución del estado de protonación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en la superficie de la enzima. Esta deprotonación en un medio alcalino podría afectar negativamente las interacciones electrostáticas intramoleculares, provocar la desaturación de la arquitectura 3D de la enzima, y así, reducir su actividad (Al-Garawi *et al.*, 2022). Por lo cual se decidió trabajar con un pH favorable para la enzima, siendo este de 7.0.

También se puede observar que existe un decremento en la actividad cuando la enzima se inmoviliza, el decremento es significativo cuando es inmovilizada sobre MEQ pero no tan severo cuando la enzima se soporta en NEQ. Se podría conferir esa disminución a la posible aglomeración de las MEQ y NEQ entre ellas respectivamente, lo cual estaría impidiendo el sitio activo de la enzima, y por ende, la poca o nula interacción y actividad de la misma. O bien, por los inconvenientes inherentes de inmovilizar, como ya se mencionó anteriormente.

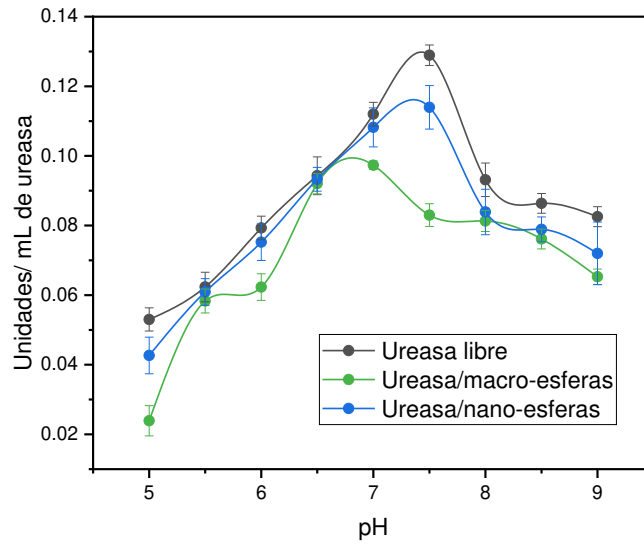


Fig. 23. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la enzima ureasa en estado libre e inmovilizada.

7.2.1.2. Evaluación de la actividad enzimática de la enzima ureasa en estado libre e inmovilizada dependiente de la temperatura

La relación entre temperatura y actividad enzimática para la enzima ureasa, tanto en estado libre como inmovilizada en los soportes antes ya mencionados, se puede observar en la figura Fig. 24. Como se muestra, existe una tendencia creciente de la actividad enzimática conforme se aumenta la temperatura en las tres configuraciones diferentes en que se tiene la enzima, con una tendencia bastante similar, hasta llegar a su máximo el cual converge en el mismo punto para los tres casos, y el cual se encuentra en una temperatura de 55 °C, muy similar a la temperatura óptima reportada para esta enzima que es de 60 °C. Esta tendencia incremental se debe a la capacidad de carga de la ureasa y a una gran cantidad de sitios de unión potenciales en su superficie, lo que le permite extenderse más fácilmente en el área de las nanoesferas. Más allá de los 55 °C hay decaimiento en la actividad debido a la desnaturalización de la enzima (Al-Garawi *et al.*, 2022).

De igual manera, se puede observar que hay rangos de temperatura en los que la enzima en NEQ mejora la actividad con respecto a las dos configuraciones restantes que se evaluaron, estos rangos son los comprendidos de 15 a 35 °C. En el resto de rangos de temperaturas evaluadas se puede observar que la relación temperatura-actividad enzimática mantiene

cierta concordancia, teniendo así, mejores resultados para la enzima libre, seguidos de la enzima en NEQ, y finalmente los obtenidos con las MEQ, tendencia la cual también puede observarse en todo el rango de la evaluación de pH.

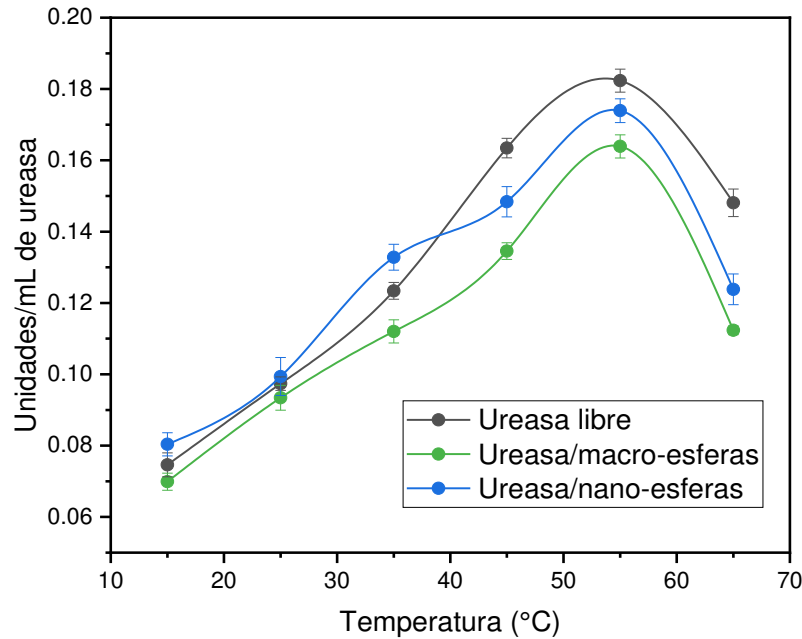


Fig. 24. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la enzima ureasa en estado libre e inmovilizada.

Si bien, con los resultados obtenidos tanto de la evaluación a diferentes pH y diferentes temperaturas, pareciera que la mejor opción sería hacer uso de la enzima sin ningún tipo de soporte, sin embargo, se puede defender que el usar la configuración con NEQ permitirá un mejor resultado práctico, ya que al usar esta configuración, y como ya se mencionó anteriormente, con respecto al pH no hay una variación de la actividad preocupante, prácticamente es la misma, incluso podría compensarse con el decremento que si existe en la actividad de la enzima en temperaturas menores a 40 °C en estado libre, donde existe una mejora en los resultados significativa cuando se está en la configuración NEQ.



7.2.2. Evaluación del acoplamiento enzimático de la enzima ureasa

Ahora bien, para determinar la eficacia del acoplamiento de la enzima a los soportes, se usó el bien conocido método de Lowry, el cual se basa tanto en la reacción de Biuret como en la de Folin-Ciocalteu, en donde la primera de éstas consiste en que los enlaces peptídicos de las enzimas reaccionan con cobre en condiciones alcalinas produciendo iones de cobre Cu^+ , que a su vez reacciona con el reactivo Folin-Ciocalteu (una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico), en donde en esencia el fosfomolibdotungstato se reduce a azul de heteropolimolibdeno por la oxidación de los aminoácidos aromáticos (principalmente triptófano, tirosina y cisteína) catalizada por cobre (Waterborg *et al.*, 1994; Lowry *et al.*, 1951).

Como ventaja del método se tiene que es sensible a bajas concentraciones de proteína (5-100 μg), pero también cuenta con una desventaja y es el estrecho intervalo de pH dentro del cual es preciso, además de la variedad de compuestos que causan interferencia como lo son: algunos derivados de aminoácidos, ciertos buffers, lípidos, azúcares, ácidos nucleicos y reactivos de sulfhidrilo. La concentración del color es medido por absorbancia entre 650 y 750 nm (Shen, 2018).

En la figura Fig. 25 se puede observar la relación correspondiente al porcentaje de enzima inmovilizada pasado cierto tiempo en cada uno de los soportes evaluados en este trabajo (MEQ y NEQ), pudiendo así referir que, a pesar de que con macroesferas se llegó a un 70 % de inmovilización en menor tiempo, la mejor configuración es la que tiene como soporte las nanoesferas de quitosano ya que pasados los primeros 40 minutos (5 minutos de diferencia con el tiempo de los mejores resultados de las MEQ), se logró inmovilizar aproximadamente el 80 % de la enzima total en solución. Por lo que se puede aserir que al no tener una diferencia enorme en tiempo, pero si en porcentaje de enzima inmovilizada, la mejor opción es la configuración con NEQ.

Es importante mencionar que no hay una técnica para una inmovilización total efectiva, es decir, no se podría inmovilizar el 100 % de la enzima, por lo que los valores obtenidos son bastante satisfactorios.

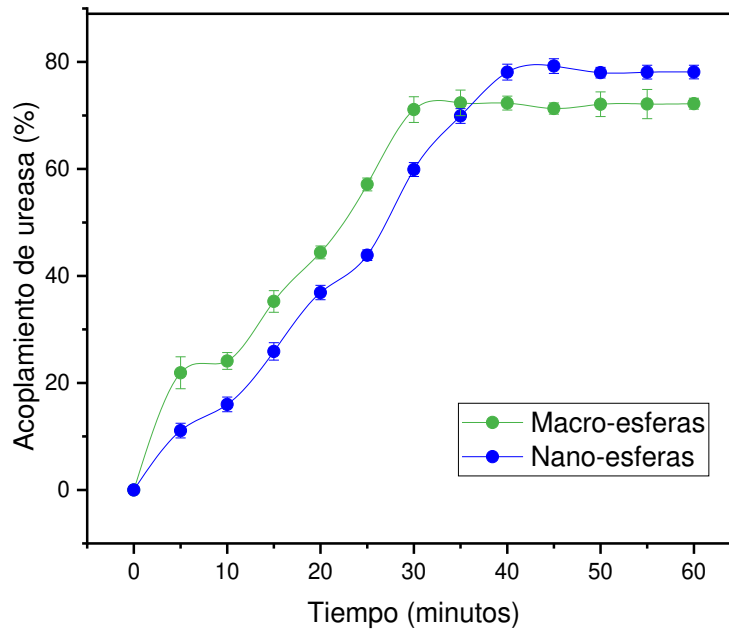


Fig. 25. Curvas de acoplamiento enzimático para la inmovilización enzimática de la enzima ureasa sobre macro y nano esferas de quitosano.

7.3. Pruebas colorimétricas para detección enzimática

La distancia entre dos colores es una medida de interés en la ciencia de color. Un espacio de color que es uniforme y que sus dimensiones son ortogonales, como es el caso del espacio RGB, la diferencia entre dos colores se puede obtener como la distancia euclidiana entre sus coordenadas (Bugarin Kamour, 2018). Entre mayor sea la diferencia de esta medida, menor será la similitud entre esos colores (Dasari *et al.*, 2005).

La distancia Euclidiana (DE) se calculó entonces, con la Ecuación 2 usando los valores RGB (Condezo-Hoyos *et al.*, 2015) leídos a través de un colorímetro comercial.

$$DE = \sqrt{(R_M - R_B)^2 + (G_M - G_B)^2 + (B_M - B_B)^2}$$

Ecuación 2. Ecuación para obtener las distancias Euclidianas de los valores RGB.

Donde DE es la distancia Euclidiana, R, G, B son los valores de los componentes rojo, verde y azul, respectivamente. El subíndice M es la notación para referir al valor de la muestra, mientras que el subíndice B es para referir al valor del blanco o control.

7.3.1. Determinación colorimétrica de urea por distancias Euclidianas

En la Fig. 26 se puede observar cada uno de los componentes R, G, y B, para cada una de las concentraciones de urea del rango establecido para las pruebas colorimétricas, incluyendo el blanco. En estas es posible apreciar que existe una tendencia visible para cada grupo de componentes, es decir, en el caso de las componentes R, la tendencia es creciente conforme también incrementa la concentración de urea, convergente tanto con los colores anaranjados, como con las intensidades de esos naranjas que se apreciaban al incrementar la concentración a simple vista. En el caso de las componentes G y B, ambas también tienen también una tendencia, en este caso decreciente, y con un ritmo diferente entre ellas, llegando casi al mismo valor en concentraciones más altas de urea. Esta gráfica permite visualizar y confirmar que para el caso de la evaluación de la urea, el color predominante es el de componentes R, por lo que incluso a simple vista esperaríamos ver colores con predominancia hacia los rojos, o derivados cercanos de este color.

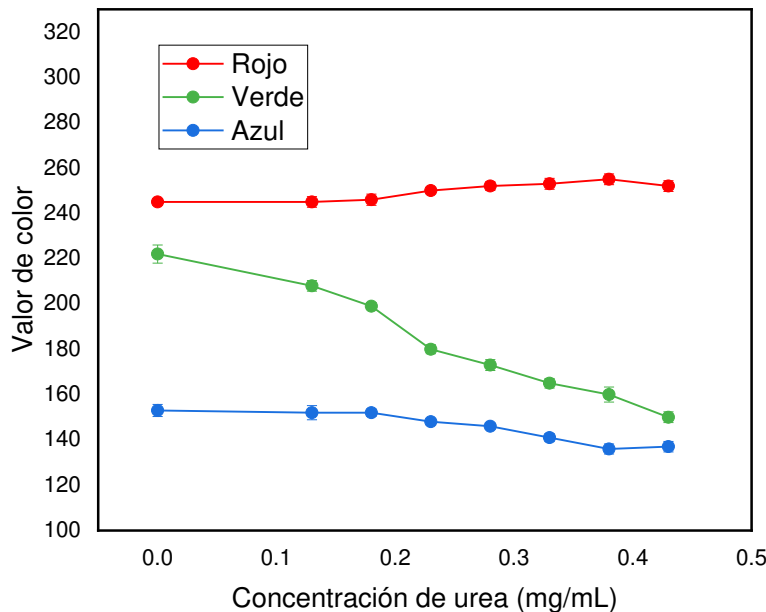


Fig. 26. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de urea.

Una vez obtenidos los componentes RGB para cada concentración de urea, toca hacer el análisis cuantitativo, para lo cual usamos la ecuación de las distancias Euclidianas (DE). Esta nos permite construir la curva de calibración, relacionando la DE y la concentración de urea.

La Fig. 27, fácilmente permite observar que a medida que la concentración de urea aumenta, el valor de la DE también lo hace, lo que nos dice que hay una relación directamente proporcional entre estos dos.

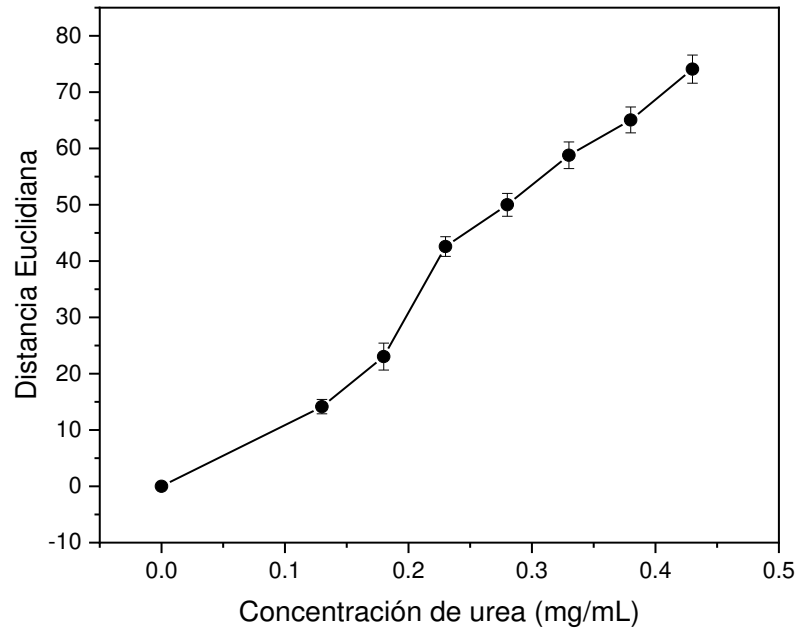


Fig. 27. Curva de calibración para determinación de concentración de urea a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas.

Con la regresión lineal a partir de los datos anteriores, que se muestra en la Fig. 28, se pudo encontrar quizás la parte que más nos interesa en este trabajo que es: el coeficiente de determinación (R^2), que a grandes rasgos, es el indicador de la relación lineal entre la distancia Euclidiana y la concentración nuestro analito (Condezo-Hoyos *et al.*, 2015), en este caso urea, y que nos dio un valor R^2 ya ajustado de 0.97164, lo que nos sugiere que el modelo, o la relación entre DE y concentración de urea, es altamente predictivo.

De igual manera, se tiene el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) con un valor de 0.98777, con el cual podemos afirmar, no solo visualmente, que existe una fuerte y positiva relación lineal.

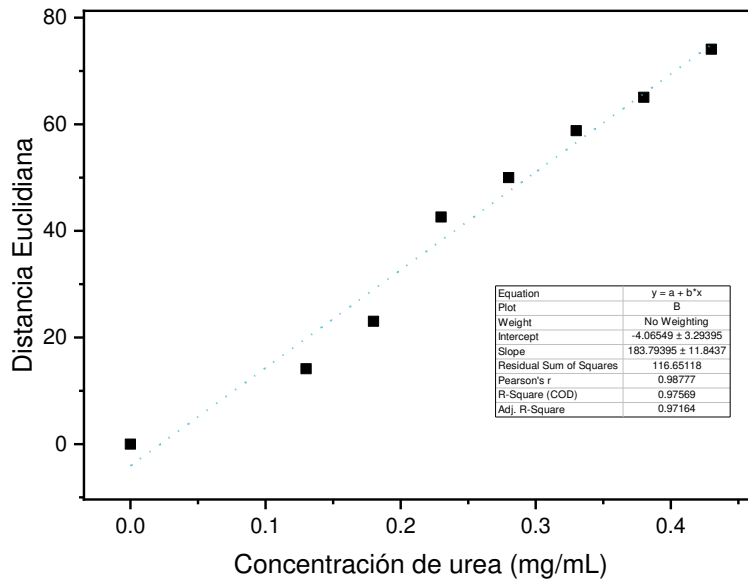


Fig. 28. Regresión lineal para la curva de calibración para determinación de concentración de urea.

Ahora bien, para observar de manera más fácil el cambio de color que nos arrojó la prueba de la enzima ureasa, se realizó el mapa de colores (Fig. 29) en el espacio de color RGB, en el cual se observa un color diferente y correspondiente a cada concentración del rango establecido previamente. El valor RGB no se representa numéricamente, sino ya de manera visual, justo como se veía a simple vista.

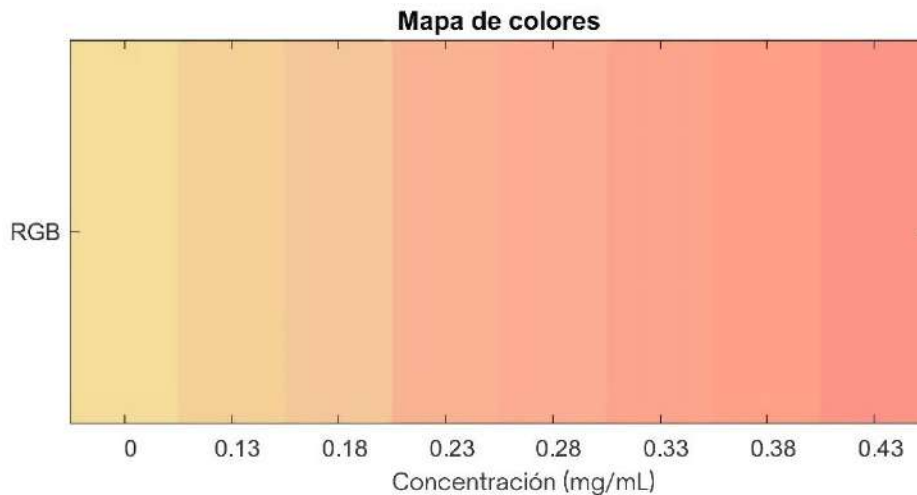


Fig. 29. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de urea en la prueba colorimétrica.

El sistema CIE 1931 define los colores mediante un parámetro de luminancia Y , y dos coordenadas de color x e y , que identifican un punto en el diagrama de cromaticidad. En este sistema los parámetros se derivan de la distribución espectral de energía (SPD) de la luz emitida por el objeto coloreado, ajustada por las curvas de sensibilidad del ojo humano que han sido medidas, es decir, el diagrama forma el área de todos los tonos perceptibles por el ojo humano normal (Hyperphysics s. f.). Fuera de la curva, no existen colores reales, sino únicamente colores teóricos o matemáticos (Sistemas de TV, s. f.). Este sistema se desarrolló para especificar los estímulos cromáticos basándose en valores triestímulos, o la medida de activación de los conos en las retinas de nuestros ojos, de tres primarios imaginarios (Fan *et al.*, 2021). La base del sistema que fue llamado observador estándar CIE 1931 (Westland, 2001). Se fundamenta en la premisa de que el ojo humano dispone de tres tipos de conos sensibles al color, cuya respuesta se puede describir de manera óptima mediante los valores triestímulos. Una vez conseguido esto, se determina que cualquier color puede ser representado en términos de dos coordenadas de color, x e y (Hyperphysics s. f.).

En el diagrama de cromaticidad obtenido (Fig. 30), se puede observar que para el caso de la prueba colorimétrica de la enzima ureasa, sus valores están en la región rosa-naranja, como era de esperarse pues así es como se podían describir los colores que se apreciaban a simple vista.

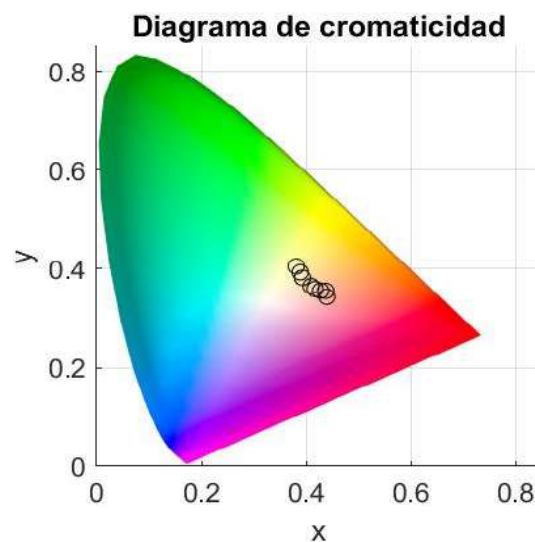
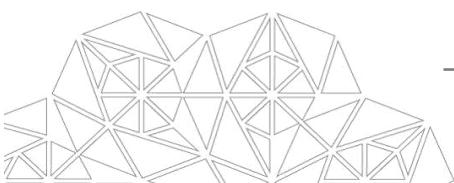


Fig. 30. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de urea.



De igual manera es posible observar en la Fig. 31 de manera más cercana como es que están distribuidas las concentraciones de nuestro analito (urea) en las coordenadas x, y del diagrama de cromaticidad, observando que hay una tendencia marcada hacia los componentes rojizos como ya previamente se había mencionado.

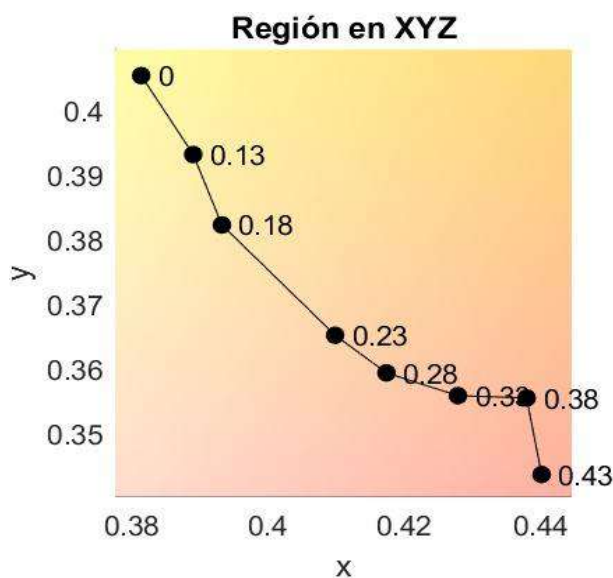


Fig. 31. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de urea.

Tabla 8. Tabla comparativa del límite de detección de urea con respecto a otros trabajos.

Analito que sensa	Material/sistema de reconoc.	Material de soporte	Muestra/Biofluido	Límite de detección	Nombre del artículo	Referencia
Urea	Ureasa	Ácido tánico/AgNO ₃	Orina	0.58 mM (0.0348 mg/mL)	Smartphone-assisted point-of-care colorimetric biosensor for the detection of urea via pH-mediated AgNPs growth	(Choi <i>et al.</i> , 2021)
Urea	Ureasa e indicador de pH	Papel filtro	Saliva	10.4 mg/L (0.0104 mg/mL)	Smartphone based optical biosensor for the detection of urea in saliva	(Soni <i>et al.</i> , 2018)
Urea	Cristales fotónicos pH-sensibles	Película de polímero de cristal fotónico opalino inverso.	Urea	Es determinación semi-cuantitativa	Label-free and pH-sensitive colorimetric materials for the sensing of urea	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Urea	4-ciano-4'-pentilbifenilo (5CB) y	Sustrato de vidrio recubierto de	Sangre	5 mM (0.3003 mg/mL)	Real-time liquid crystal-based	(Khan <i>et al.</i> , 2014)

	poli(ácido acrílico-b-4-cianobifenil-4-oxiundecilacrilato) (PAA-b-LCP)	octadeciltricloro silano			biosensor for urea detection	
Urea	Luminol y permanganato	Tejido de soja	Orina	2 μ M (0.1201 μ g/mL)	Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for urea	(Qin <i>et al.</i> , 2000)
Urea	Albúmina de suero bovino	Película de polipirrol	Solución acuosa de urea	No mencionado	Potentiometric urea biosensor based on BSA embedded surface modified polypyrrole film	(Ahuja <i>et al.</i> , 2008)
Urea	Ureasa/Poli(c arbamolisufo nato)+Polietil enimina	Membrana NH ₄ ⁺ y papel filtro	Leche	2.5x10 ⁻⁵ mol/L (1.5015 μ g/mL)	Potentiometric biosensor for urea determination in milk	(Trivedi <i>et al.</i> , 2009)
Urea	Ureasa/Rojo fenol/ ChNP	Nanopartículas de quitosano depositadas sobre papel Whatman	Muestras acuosas	0.0754780 mg/mL	Este trabajo	Este trabajo

7.3.2. Determinación colorimétrica de sarcosina por distancias Euclidianas

En la Fig. 32 se puede observar los componentes R, G y B, para cada una de las concentraciones de sarcosina del rango establecido para las pruebas colorimétricas, incluyendo el blanco. De esta es posible apreciar que existe una tendencia decreciente para todas las componentes conforme aumenta la concentración de sarcosina, se puede apreciar que de ellas las que menos presenta variación es el componente R, mientras que las componente G y B presentan una tendencia decreciente más marcada y similar entre ellas. A partir de la variación pequeña existente en la componente R y que esos valores son mayores que los componentes restantes, se puede explicar el por qué los resultados a simple vista se aprecian en tonos rojizos-anaranjados.

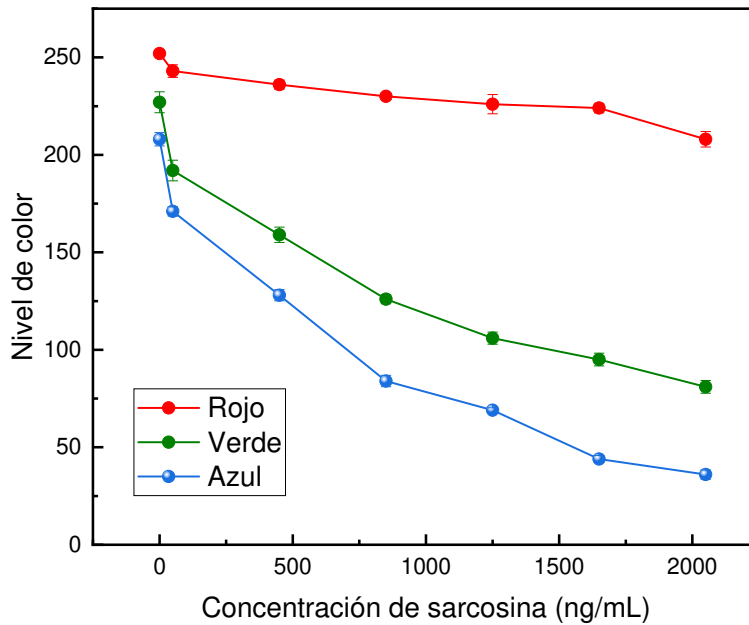


Fig. 32. Descomposición de los valores RGB obtenidos para las pruebas colorimétricas de sarcosina.

A partir de los componentes RGB obtenidos para cada concentración de sarcosina, es necesario hacer el análisis cuantitativo haciendo uso del método DE. Ello permite construir la curva de calibración relacionando la DE con la concentración de sarcosina. En la Fig. 33 es posible ver que conforme la concentración de sarcosina aumenta, el valor de la DE también lo hace, lo que indica que existe una relación directamente proporcional entre estos dos.

De esta curva de calibración es posible obtener la regresión lineal y con ello encontrar el coeficiente de determinación (R^2) cuyo valor para esta prueba ya ajustado es de 0.99691, lo que nos sugiere que el modelo, o la relación entre DE y concentración de sarcosina, es altamente predictivo. Cabe destacar que el valor se puede tornar medianamente bajo y podría deberse al salto abrupto en los datos entre el primer punto (el blanco) y el segundo punto en la gráfica (el primer valor del rango de intervalos con analito en la solución), ya que si no se omitiera ese primer intervalo, el valor R^2 sería más bajo. De igual manera se tiene el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r) con un valor de 0.99876, a partir del cual se puede afirmar que existe una buena y positiva relación lineal.

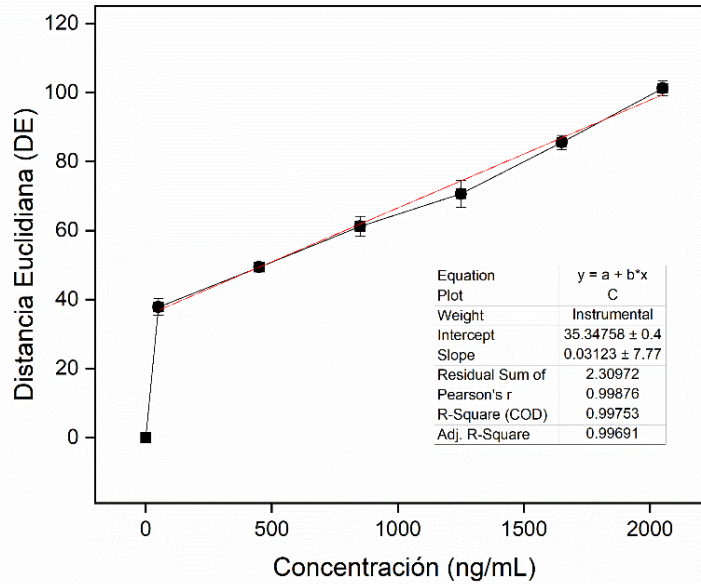


Fig. 33. Curva de calibración y regresión lineal para la determinación de concentración de sarcosina a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas.

Para no dejar a la imaginación como se veía el rango o la gama de colores que se obtuvieron en las pruebas de sarcosina, se realizó el mapa de colores (Fig. 34) en el espacio RGB, con el cual es fácil poder observar un color diferente para cada uno de los valores de concentración del rango establecido. El valor RGB no se representa numéricamente, sino ya de manera visual, justo como se veía a simple vista.

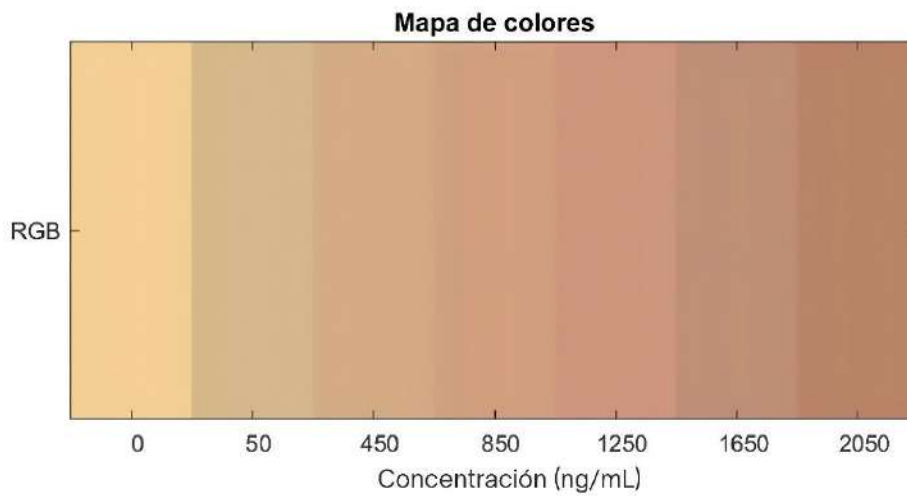


Fig. 34. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de sarcosina.

En el diagrama de cromaticidad obtenido (Fig. 35), se puede observar que para esta prueba, los valores se aglomeran casi al centro del diagrama, ligeramente desplazados hacia los tonos amarillos, rojizos y un poco de rosa-anaranjado, como era de esperarse ya que así se podían describir los colores apreciados a simple vista y también de manera digital, como ya se mostró.

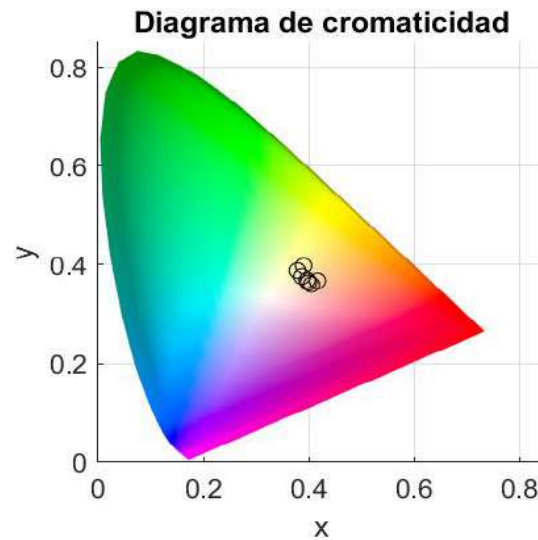


Fig. 35. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de sarcosina.

De igual manera es posible observar en la Fig. 36 de manera más cercana la distribución de las concentraciones de esta prueba de sarcosina en las coordenadas x , y , del diagrama de cromaticidad, reforzando la tendencia hacia los colores previamente ya mencionados. En este acercamiento se puede observar que se rompe cierta tendencia visual en los últimos dos valores del intervalo de las pruebas, ya que no continúan desplegándose en valores más bajos del eje y , pero podría deberse a la forma general del diagrama de cromaticidad.

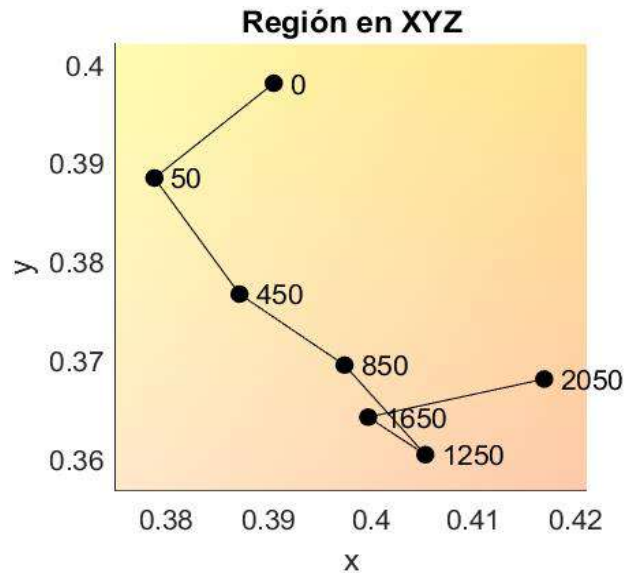


Fig. 36. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de sarcosina.

Tabla 9. Tabla comparativa del límite de detección de sarcosina con respecto a otros trabajos.

Análito que sensa	Material/sistema de reconoc.	Material de soporte	Muestra/Biofluido	Límite de detección	Nombre del artículo	Ref.
Sarcosina	Nanopartículas de paladio	PdNPs/TMB	Orina	5.0 nM (0.4452 ng/mL)	Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles	(Lan <i>et al.</i> , 2014)
Sarcosina	Sarcosina oxidasa	CQDs-AuNRs-SO _x	Orina	0.011 μmol/L (0.9795 ng/mL)	Colorimetric determination of sarcosine in human urine with enzyme-like reaction mediated Au nanorods etching	(Zhong <i>et al.</i> , 2021)
Sarcosina	Clorhidrato de poli(alilamina)	Clorhidrato de poli(alilamina)	Orina artificial	2.5 μM (0.2226 μg/mL)	Colorimetric paper-based sarcosine assay with improved sensitivity	(Masumoto <i>et al.</i> , 2021)
Sarcosina	Sarcosina oxidasa-Peroxidasa del rábano picante	SO _x -HRP	Orina	0.7 μM (0.0623 μg/mL)	Development of sarcosine quantification in urine based on enzyme-coupled colorimetric method for prostate cancer diagnosis	(Yamkamon <i>et al.</i> , 2018)

Sarcosina	Riboflavina	Electrodo de carbón vítreo modificado con compuesto de grafeno-quitosano modificado con nanopartículas bimetálicas de Au-Pt/Polipirrol	Orina contaminada	0.68 μM (0.0605 $\mu\text{g/mL}$)	An electrochemical sarcosine sensor based on biomimetic recognition	(Liu <i>et al.</i> , 2019)
Sarcosina	Cavitando de tetrafosfonato supramolecular	Micro perlas magnéticas	Orina	30 μM (2.6714 $\mu\text{g/mL}$)	An electrochemiluminescence-supramolecular approach to sarcosine detection for early diagnosis of prostate cancer	(Valenti <i>et al.</i> , 2015)
Sarcosina	Sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico	Óxido de grafeno	Medio alcalino	0.73 μM (0.0650 $\mu\text{g/mL}$)	An organic indicator functionalized graphene oxide nanocomposite-based colorimetric assay for the detection of sarcosine	(Xue <i>et al.</i> , 2016)
Sarcosina	Sarcosina oxidasa/O-dianisidina/ChNP	Nanopartículas de quitosano depositadas sobre papel Whatman	Muestras acuosas	425.988 ng/mL	Este trabajo	Este trabajo

7.3.3. Determinación colorimétrica de creatina por distancias Euclidianas

La Fig. 37 permite observar la descomposición de los valores RGB en sus componentes de la prueba colorimétrica a diferentes concentraciones de creatina, incluyendo el blanco. A partir de esta es posible observar una tendencia decreciente para cada una de las componentes conforme la concentración de creatina aumenta. Al igual que en los casos anteriores, el componente predominante o con valores mayores es el rojo, mientras que el verde hace aportaciones al color moderadas, y finalmente, el componente azul hace las menores aportaciones para la generación de los colores obtenidos en la prueba a cada concentración, por lo que los colores esperados estarían ubicados cerca o con tendencia a los tonos rojizos.

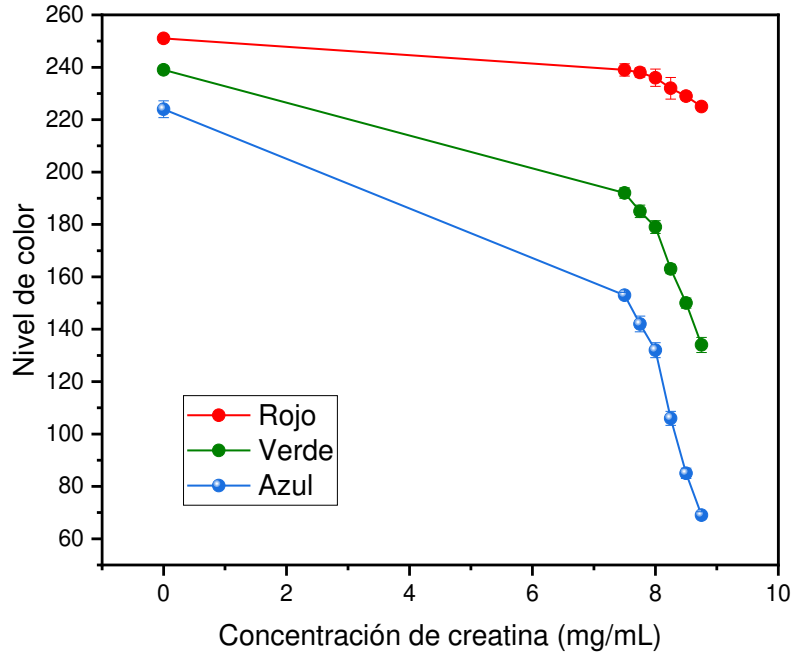


Fig. 37. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de creatina.

A partir de los datos obtenidos de los componentes RGB de la prueba de creatina, se hace el análisis cuantitativo con el método de DE. Con esto es viable construir la curva de calibración relacionando la DE con la concentración de creatina. En la Fig. 38 se muestra una tendencia incremental del valor de la DE conforme se aumenta la concentración de la creatina, que de manera visual nos sugiere que existe una relación directamente proporcional entre estos dos.

De esta curva se hace la regresión lineal la cual nos permite a su vez, encontrar el coeficiente de determinación (R^2) que para esta prueba es de 0.92307 ya ajustado, lo que nos sugiere que el modelo es altamente predictivo. De igual manera se obtiene el coeficiente de correlación de Pearson (r) cuyo valor para esta prueba es de 0.96874, del cual es posible sostener que existe una buena y positiva relación lineal.

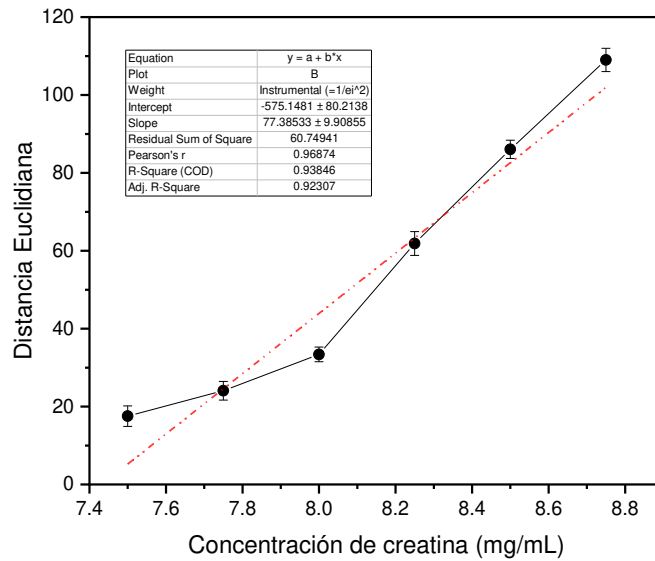


Fig. 38. Curva de calibración y regresión lineal para la determinación de concentración de creatina a partir de los valores RGB por el método de distancias Euclidianas.

A modo de ejemplificar mejor los valores RGB obtenidos en esta prueba, se muestra el mapa de colores en el espacio RGB en la Fig. 39, del cual es posible observar cómo eran los tonos o colores obtenidos en la prueba para cada una de las concentraciones que se trabajaron al igual que el blanco. Como se puede apreciar, los tonos obtenidos están en los rojos-anaranjados, como se había anticipado y comentado anteriormente por los valores de las componentes obtenidas.

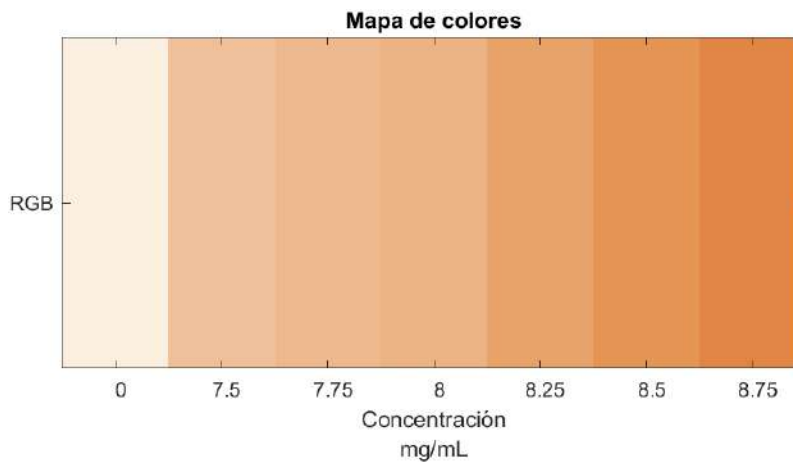


Fig. 39. Mapa de colores en el espacio de color RGB para cada una de las concentraciones de creatina.



De igual manera, se muestra el diagrama de cromaticidad conseguido (Fig. 40), del cual es posible ubicar la distribución de coordenadas de cada uno de los valores de concentración de creatina, incluyendo el blanco también, en la prueba realizada. Del resultado obtenido es fácilmente apreciar una tendencia casi lineal a través de este diagrama, desde lo que es casi el centro (que el centro es blanco total), hacia el extremo de los límites de colores naranjas-rojizos.

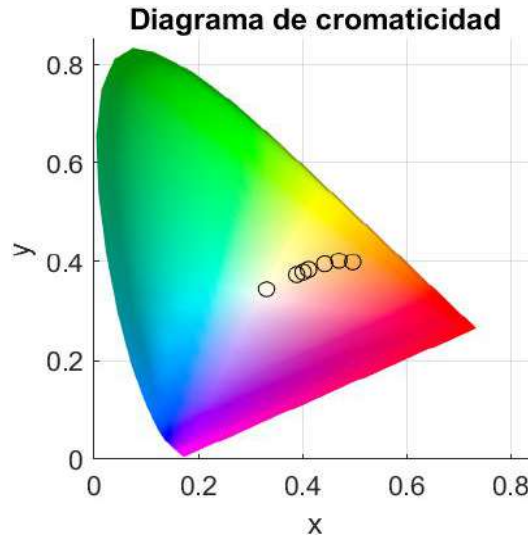
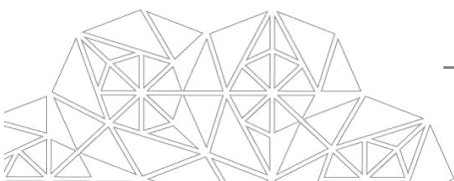


Fig. 40. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de creatina.

Al hacer un acercamiento a la zona donde se distribuyen los valores de creatina en el diagrama anterior, que se muestra en la Fig. 41, es fácil ver que hay una muy buena relación en cuanto a mayor concentración, con colores más saturados o vívidos, ya que para esta prueba no hay puntos traslapados en la tendencia general, como es el caso de los últimos valores de la prueba colorimétrica de la sarcosina.



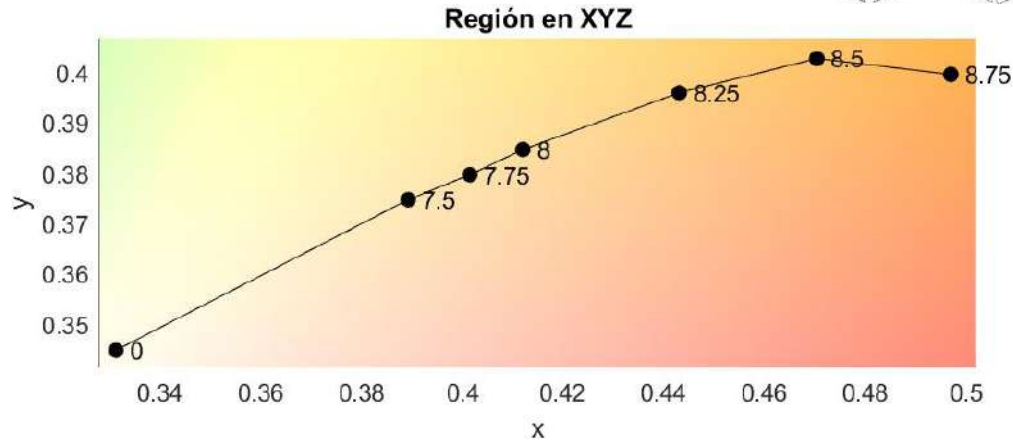


Fig. 41. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de creatina.

Tabla 10. Tabla comparativa del límite de detección de creatina con respecto a otros trabajos.

Analito que sensa	Material/sistema de reconoc.	Material de soporte	Muestra/Bi ofluido	Límite de detección	Nombre del artículo	Ref.
Creatina	Complejo sarcosina oxidasa y creatinasa	Electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Fe_3O_4	Muestras comerciales de creatina en polvo	2.0×10^{-7} mol/L (26.226 ng/mL)	An Fe_3O_4 nanoparticles-based amperometric biosensor for creatine determination	(Kaçar <i>et al.</i> , 2012)
Creatina	Nanopartículas de óxido de cadmio (CdO NPs)	Electrodo de carbón vítreo y nafión como el conductor enlazante	Suero humano, suero de conejo y orina	50.0 ± 0.1 pM (6.55 ± 0.013 pg/mL)	Ultrasensitive and label-free detection of creatine based on CdO nanoparticles: a real sample approach	(Rahman <i>et al.</i> , 2017)
Creatina	Sarcosina oxidasa y creatina amidino hidrolasa	Electrodo de varilla de carbono	Solución buffer	No mencionado	Amperometric biosensor for the determination of creatine	(Ramana vicius, 2007)
Creatina	Nanomateriales porosos nano formulados de óxido metálico mixto de baja dimensión (CuO.Mn ₂ O ₃ . NiO)	Electrodo de carbón vítreo con nafión como aglutinante conductor	Muestras biológicas como sangre, suero y orina	21.63 ± 0.05 pM (2.836 ± 0.006 pg/mL)	An Electrochemical Approach for the Selective Detection of Cancer Metabolic Creatine Biomarker with Porous Nano-Formulated CMNO Decorated Glassy Carbon Electrode	(Rahman <i>et al.</i> , 2020)

Creatina	Ureasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y albúmina de suero bovino	Electrodo de membrana de polivinilcloruro de amonio que contiene ácido palmítico y matriz de polivinilferroceno	Muestras comerciales de creatina en polvo	1×10^{-5} M (1.3113 $\mu\text{g/mL}$) para el pot. y 2×10^{-5} M (2.6226 $\mu\text{g/mL}$) para el ampero.	Determination of Creatine in Commercial Creatine Powder with New Potentiometric and Amperometric Biosensors	(Karakuş <i>et al.</i> , 2009)
Creatina	Compuestos de guanidina y ninhidrina en solución alcalina	No mencionado	Suero, sangre, y orina	1.0×10^{-7} M (13.113 ng/mL)	Fluorimetric Determination of Creatine	(Conn, 1960)
Creatina y I-arginina	Ureasa, creatinasa, y arginasa	Policloruro de vinilo carboxilado	Soluciones de creatina y I-arginina	$> 10^{-5}$ M (1.3113 $\mu\text{g/mL}$)	Bienzymatic potentiometric electrodes for creatine and I-arginine determination	(Koncki <i>et al.</i> , 1996)
Creatina	Creatinasa/O-dianisidina/ChNP	Nanopartículas de quitosano depositadas sobre papel Whatman	Muestras acuosas	0.0132167 mg/mL	Este trabajo	Este trabajo

7.3.4. Determinación colorimétrica de creatinina por distancias Euclidianas

La Fig. 42 presenta los valores de cada una de las componentes RGB, para cada una de las concentraciones de creatinina de la prueba, incluyendo el blanco. A partir de estos valores se puede anticipar (como se ha venido haciendo en las pruebas anteriores) que en el color final de cada prueba, predominan los tonos rojos-naranjas. Esto debido a que el componente con mayores valores, nuevamente es el rojo, mientras que los componentes G y B son sustancialmente menores, lo que resulta en aportaciones al color final moderadas, y de casi la misma magnitud (entre estas dos últimas componentes) para cada concentración. De manera general se puede observar que existe una tendencia decreciente para todas y cada una de las componentes que componen a los colores obtenidos, es decir, a mayores concentraciones de analito, menor el valor de cada componente.

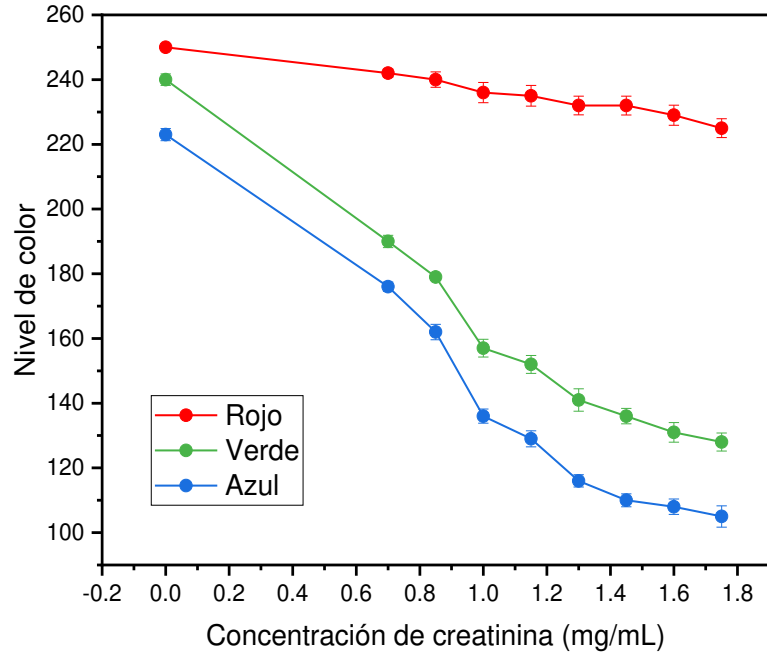


Fig. 42. Descomposición de los valores RGB obtenidos para las pruebas colorimétricas de creatinina.

A partir de los valores RGB obtenidos en la prueba de creatinina, se procede a hacer el análisis cuantitativo por el método de DE. Con ello es posible construir la curva de calibración relacionando el valor de la DE con la concentración de creatinina. En la Fig. 43 se observa que existe una relación directamente proporcional, puesto que conforme se aumenta la concentración del analito, también aumenta el valor de la DE.

De esta curva se obtiene la regresión lineal la cual nos permite a su vez, encontrar el coeficiente de determinación (R^2) ajustado que para esta prueba es de 0.98674 lo que nos sugiere que el modelo es altamente predictivo. De igual manera se obtiene el coeficiente de correlación de Pearson (r) cuyo valor para esta prueba es de 0.99418, del cual es posible sostener que existe una muy buena y positiva relación lineal.

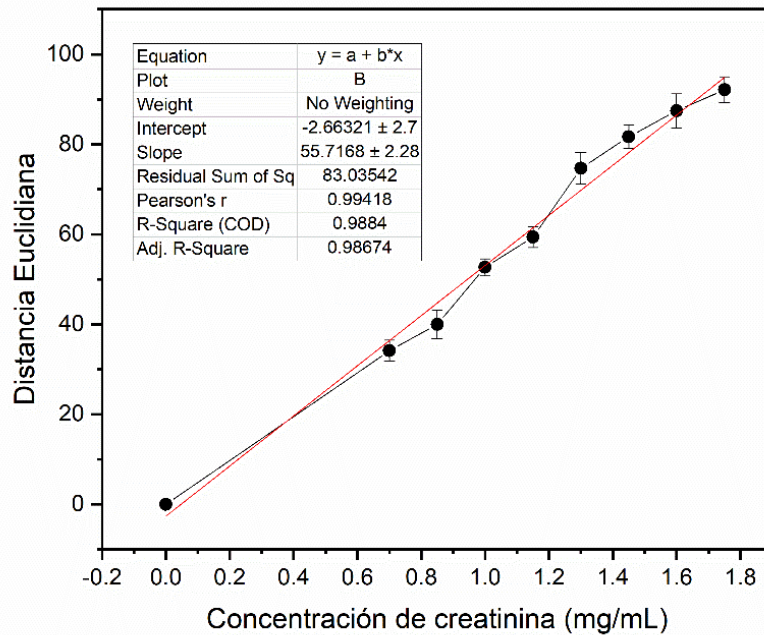


Fig. 43. Curva de calibración y regresión lineal para la determinación de concentración de creatinina a partir de los valores RGB por el método de distancias Euclidianas.

De igual manera, como se ha venido trabajando, se muestra ahora el mapa de colores (Fig. 44) en el espacio RGB, para ver de manera más fiel los colores obtenidos para cada concentración en esta prueba colorimétrica de creatinina, y no dejar los datos solamente en términos de valores RGB. Es decir, se presenta el abanico de colores obtenido para cada intervalo de concentración de la prueba dentro del rango establecido. Y nuevamente, como era de esperarse por los resultados previos al mapa de colores, el rango de variación de los colores obtenidos estarían dentro de los rojos-naranjas, o bien, siendo más meticulosos entre naranjas-rosados.

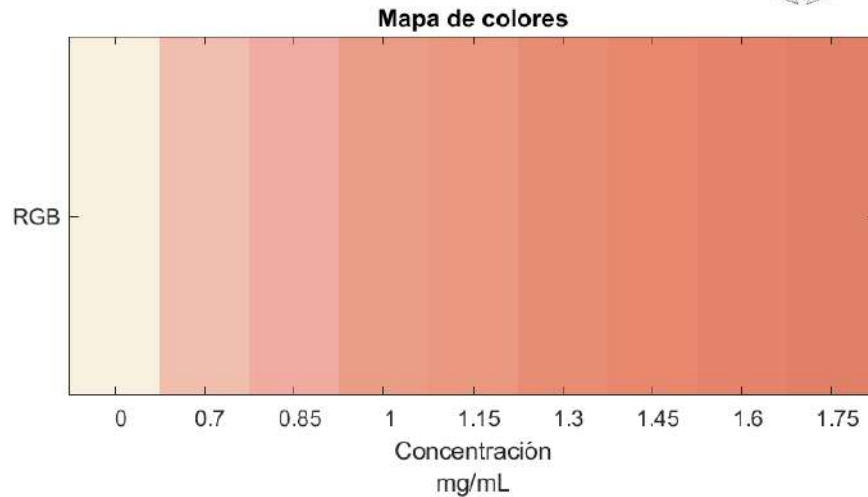


Fig. 44. Mapa de colores del espacio RGB para cada una de las concentraciones de creatinina.

En este caso, los datos obtenidos para el diagrama de cromaticidad, que pueden observarse en la Fig. 45, muestran (como en el caso de la prueba anterior) una linealidad visual de las coordenadas para los valores de concentración del analito de interés. De modo que, se puede apreciar que la dispersión de los datos comienza cercano al blanco (al centro) y se van alejando con cierta tendencia hacia los tonos naranjas-rosados, como ya se había mencionado y mostrado previamente en la Fig. 44.

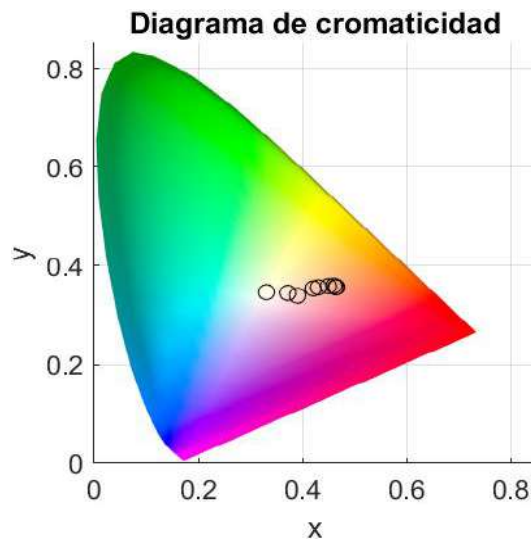


Fig. 45. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de creatinina.

Al hacer un acercamiento a la dispersión de esas coordenadas en el diagrama de cromaticidad asociadas a los valores de concentración del analito (Fig. 46), se puede denotar que en los

primeros intervalos de concentración (de 0 a 1 mg/mL) los cambios de los valores de las coordenadas de este diagrama son fácilmente apreciables, un segundo rango de intervalos (1-1.3 mg/mL) son medianamente apreciables los cambios, y para los últimos valores (1.45-1.75 mg/mL) es más complicado apreciar cambios en esas coordenadas, sin embargo, es importante señalar que de manera favorable no hay traslapes entre los valores de concentración y las coordenadas, es decir, se sigue una cierta tendencia general conforme aumenta la concentración del analito, y no hay interferencias de concentraciones mayores entre coordenadas de concentraciones menores, o viceversa.

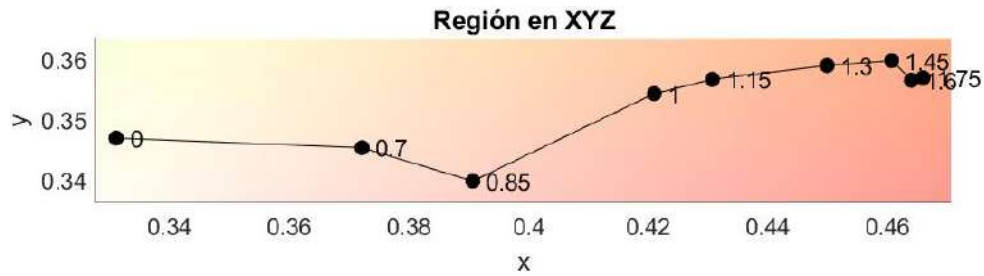


Fig. 46. Acercamiento a las coordenadas del diagrama de cromaticidad CIE 1931 para la prueba colorimétrica de creatinina.

Tabla 11. Tabla comparativa del límite de detección de creatinina con respecto a otros trabajos.

Analito que sensa	Material/sistema de reconoc.	Material de soporte	Muestra/Biofluido	Límite de detección	Nombre del artículo	Referencia
Creatinina	Sistema de AuNP con adenosina/Ag ⁺	Nanopartículas de oro	Orina simulada y suero bovino	12.7 nM (1.4366 ng/mL)	Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Recognition of Creatinine with Good Selectivity and Sensitivity	(Du <i>et al.</i> , 2016)
Creatinina	Sistema de L-cisteina estabilizada en CuNP	Nanopartículas de cobre	Suero artificial y muestras de orina	0.454 nM (0.0513 ng/mL)	Selective recognition of creatinine – Development of a colorimetric sensor	(Sivasankara <i>et al.</i> , 2018)
Creatinina	Compósito de membranas de polímero molecularmente impreso (MIP) con sitios receptores artificiales	Membranas de micro filtración de fluoruro de polivinilideno (PVDF)	Muestras acuosas	0.25 mM (28.28 mg/mL)	Colorimetric test-systems for creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes	(Sergeyeva <i>et al.</i> , 2013)

Creatinina	AgNPs mono dispersas recubiertas de citrato + NaOH	Nanopartículas de plata	Orina	53.4 nM (6.0406 ng/mL)	Citrate-capped silver nanoparticles as a probe for sensitive and selective colorimetric and spectrophotometric sensing of creatinine in human urine	(Alula <i>et al.</i> , 2018)
Creatinina	Sistema de AuNP modificado con ácido úrico y Hg ²⁺	Nanopartículas de oro	Suero bovino y orina	19.8-1.6 nM (2.2397-0.1809 ng/mL)	Colorimetric Detection of Creatinine Based on Plasmonic Nanoparticles via Synergistic Coordination Chemistry	(Dun <i>et al.</i> , 2015)
Creatinina	AuNP estabilizadas con citrato	Nanopartículas de oro	Orina humana	80 uM (0.0090 mg/mL)	Gold nanoparticles-based colorimetric and visual creatinine assay	(He <i>et al.</i> , 2015)
Creatinina	Sistema ácido pírico/ AgNPs	Nanopartículas de plata	Sangre humana y fluido cerebrospinal	8.4 nM (0.9502 ng/mL)	Picric acid capped silver nanoparticles as a probe for colorimetric sensing of creatinine in human blood and cerebrospinal fluid samples	(Parmar <i>et al.</i> , 2016)
Creatinina	Creatininasas /O-dianisidina/ ChNP	Nanopartículas de quitosano depositadas sobre papel Whatman	Muestras acuosas	0.0758212 mg/mL	Este trabajo	Este trabajo

7.4. Pruebas de interferentes

7.4.1. Prueba de interferentes para la urea

Se realizó también lo que fue la prueba de interferentes del complejo para evaluar la detección urea, constituido por las nanoesferas de quitosano, la enzima ureasa y la o-dianisidina. Para determinar si éste era susceptible o no, a generar un cambio alguno en el color obtenido en presencia de otras moléculas presentes inherentemente en la orina. Es importante hacer esta prueba ya que se sabe que cuando existe una fuerte presencia de interferentes en la muestra

a analizar, la respuesta y desempeño del sensor se ven disminuidos (Domínguez-Cruz, 2014). Además de que, cuando el dispositivo de detección está en contacto directo con fluidos biológicos, las señales no deseadas de interferencias son un problema grave y predominante (Rocchitta *et al.*, 2016).

La prueba se realizó con urea libre de otros analitos, y en presencia de ellos. Los analitos utilizados para evaluar la posible interferencia fueron: creatinina, creatina, glucosa, ácido ascórbico, sarcosina y lactato.

Los resultados obtenidos son muy favorables, ya que como se observa en la figura Fig. 47, no hay cambio significativo aparente, por no decir ninguno, en los valores de las tres componentes RGB que se están evaluando, en presencia de los analitos utilizados. De manera que se puede conferir que las respuestas obtenidas serán completamente ligados a urea, y que en estos no están contribuyendo otras moléculas, es decir, que es altamente selectivo nuestro complejo, permitiendo así, resultados confiables y precisos. En cualquier biosensor, si la selectividad no es suficiente, surgen dudas sobre la exactitud y precisión del método (Ozkan *et al.*, 2022).

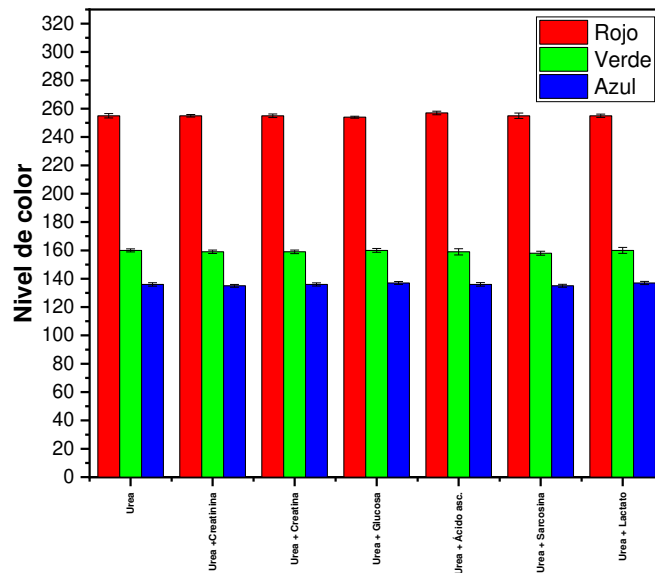


Fig. 47. Prueba de interferentes para detección de urea en presencia de distintos analitos.



8. CONCLUSIONES

Partiendo del hecho que hoy en día la población en general está integrada por más adultos que personas jóvenes, aunado a que la población de adultos se ve afectada en mayor porcentaje por diversas enfermedades, por lo que es prescindible la creación de dispositivos cada vez más fiables, más fáciles de usar, y por supuesto a precios más accesibles, para el control de dichas enfermedades, y en el mejor de los casos de la prevención de las mismas. Con la postura establecida, se puede dejar por sentado que el presente trabajo ha sido de gran apoyo para dicha causa, ya que involucra el sensado de una enfermedad altamente presente en adultos mayores (ERC) y, como ya se mencionó en el cuerpo del trabajo, suele ser silenciosa, por lo que la prevención y/o control de la misma es de suma importancia. En este sentido, el biosensor presentado exhibe potenciales ventajas, principalmente contra los métodos de diagnóstico comunes, tales como: fácil operación y manejo del dispositivo en general, la posibilidad de hacer el sensado desde la comodidad del hogar, el uso de volúmenes bajos y sin previa preparación de las muestras, buen tiempo de respuesta, buen límite de detección, y quizás uno de los puntos principales es que se puede *ver* físicamente el resultado al ser una respuesta colorimétrica. Estos aspectos hacen del biosensor una forma ideal para llevar el manejo de esta enfermedad tan potencialmente peligrosa.

La inmovilización de la enzima ureasa sobre las nanopartículas de quitosano permitió ver a través de los resultados, el aumento de la actividad enzimática principalmente en diferentes temperaturas, ya que la tendencia en cuanto a pH se mantuvo muy similar a la enzima en estado libre, exhibiendo en ambos casos la estabilidad máxima en pH 7.5, lo que nos indica que puede usarse en un rango de temperaturas más amplio que con la enzima libre, exhibiendo una estabilidad máxima a los 55 °C, y un rango mejorado con respecto a la enzima libre de los 15-35 °C. En cuanto al acoplamiento enzimático, se obtuvo que cerca del 80 % de la enzima se inmovilizó pasados los primeros 40 minutos, sin cambios significativos en los minutos posteriores, lo que es muy buen resultado. Con ello, queda claro que la inmovilización en el soporte elegido es beneficioso para el dispositivo en general, ya que muestra estabilidad enzimática similar e incluso mejor en ciertos rangos, añadiendo que tanto el material de soporte como el método de inmovilización, son económicos.



Con respecto a la precisión de las pruebas colorimétricas es posible afirmar que en general es bastante preciso, ya que de las 4 enzimas evaluadas, todas presentan a partir de las curvas de calibración un valor R^2 mayor a 0.92, o lo que es, una precisión mayor del 92 %, que para fines prácticos es un valor de impacto, ya que respaldan la afirmación de que el dispositivo puede aplicarse para el desarrollo de biosensores enzimáticos para la detección de la ERC. Además, a pesar de que los límites de detección para cada analito no son los mejores exhibidos, se puede afirmar que son bastante competitivos con respecto a los biosensores reportados hasta el momento, y que estos pueden ser mejorados añadiendo más rangos de evaluación de concentraciones.

Finalmente, pero no menos importante, se realizaron las pruebas de interferentes para la detección de urea, de las cuales se determinó que no hay interferencia aparente con otro tipo de biomolécula, lo que nos sugiere que el dispositivo es altamente selectivo, confiable y preciso.

En conclusión, el desarrollo de este proyecto permitió obtener diferentes resultados con los que es posible sostener que el prototipo presenta una excelente alternativa para aplicarse en el desarrollo de una plataforma biosensora microfluídica colorimétrica para la detección, evaluación y control de la enfermedad renal crónica, que sea confiable y al mismo tiempo económica, gracias a los materiales y métodos empleados.



9. MEJORAS A FUTURO

Desde mi punto de vista, el principal aspecto a mejorar son los límites de detección, ya que, aunque si logran ser competitivos, estos pueden ser mejorados sin mucho esfuerzo de por medio. Otro punto importante a tomar en cuenta es la integración de dispositivos inteligentes, como smartphones o tablets, en cuanto a aplicaciones para las lectura y análisis de resultados, ya que como sabemos y podemos vivir en nuestro día a día, el uso de estos dispositivos es cada vez mayor, y sus capacidades y alcances de los mismos son inexplicables, con un amplio potencial de aplicación en esta área, mejorando así la portabilidad y eficiencia.

De igual modo, se tendría que trabajar bien en la optimización de esas aplicaciones para tener los menores sesgos de error posibles entre dispositivos de diferentes marcas o modelos, es decir, que exista una nula variación de valores obtenidos entre ellos, tomando en cuenta incluso los entornos en donde se tomen las lecturas, condiciones ambientales, color e intensidad de iluminación, entre otras.



10. REFERENCIAS

- Ache, G. (2018). Nanosportes de sílica biomimética para la inmovilización de enzimas. Universidad ORT Uruguay. <https://dspace.ort.edu.uy/bitstream/handle/20.500.11968/3874/Material%20completo.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>
- Ah Mew N, Simpson KL, Gropman AL, *et al.* Urea Cycle Disorders Overview. 2003 Apr 29 [Updated 2017 Jun 22]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. Available crónica en aguas calientes. Instituto de Servicios de Salud Del Estado de Aguascalientes. Centenario Hospital Miguel Hidalgo Instituto Mexicano Del Seguro Social. from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1217/?report=classic> Arreola-Guerra JM.; Gutiérrez-Peña CM.; Delgadillo-Castañeda R; (2019). Enfermedad renal eneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.
- AKF. (2022). El daño renal agudo (DRA). American Kidney Fund. <https://www.kidneyfund.org/es/todo-sobre-los-rinones/otros-problemas-renales/el-dano-renal-agudo-dra>
- Al-Garawi, Z. S., Taha, A. A., Ahmed, N., & Tahir, N. T. (2022). Immobilization of urease onto nanochitosan enhanced the enzyme efficiency: biophysical studies and in vitro clinical application on nephropathy diabetic Iraqi patients. *Journal of Nanotechnology*, 2022, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2022/8288585>
- Amor-Gutiérrez, O., Costa-Rama, E., & Fernández-Abedul, M. T. (2022). Paper-Based Enzymatic Electrochemical Sensors for Glucose Determination. *Sensors*, 22(16), 6232. <https://doi.org/10.3390/s22166232>
- Andreu-Periz, L., & Force-Sanmartín, E. (2003, 1 octubre). Revisión actualizada sobre la insuficiencia renal aguda: estudio de un caso. *Nursing*. <https://www.elsevier.es/es-revista-nursing-20-articulo-revision-actualizada-sobre-insuficiencia-renal-13052533>



- Andrew Bentall. (2021, septiembre 3). Nefropatía crónica - Síntomas y causas - Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/chronic-kidney-disease/symptoms-causes/syc-20354521>
- Antonio, J., Candow, D. G., Forbes, S. C., Gualano, B., Jagim, A. R., Kreider, R. B., ... Ziegenfuss, T. N. (2021). Common questions and misconceptions about creatine supplementation: what does the scientific evidence really show? *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18(1). doi:10.1186/s12970-021-00412-w
- Arabacı, N., Karaytuğ, T., Demirbas, A., Ocsoy, I., & Katı, A. (2020). Nanomaterials for Enzyme Immobilization. *Green Synthesis of Nanomaterials for Bioenergy Applications*, 165–190. doi:10.1002/9781119576785.ch7
- Arango V., S. S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Fac. Nac. Salud Pública*. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v30n1/v30n1a09.pdf>
- Arispe-Quispe, M. S., Callizaya-Laura, M. K., Laura-Yana, A. A., Mendoza-Mendoza, M. Z., Mixto-Cano, J. L., Valdez-Baltazar, B. D., Mendoza-Ocampo, E., Magariños-Loredo, W., & Torrico-Arzady, B. (2019). Importancia del examen general de orina, en el diagnóstico preliminar de patologías de vías urinarias renales y sistémicas, en mujeres aparentemente sanas. *CON-CIENCIA*. http://www.scielo.org.bo/pdf/rcfb/v7n1/v7n1_a09.pdf
- Arreola, Guerra; Gutiérrez, Peña; Zúñiga, L; Robles, O. (2019). ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN AGUASCALIENTES
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23–39. <https://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>
- Asif, H. M., Zafar, F., Ahmad, K., Iqbal, A., Shaheen, G., Ansari, K. A., Rana, S., Zahid, R., & Ghaffar, S. (2023). Synthesis, characterization and evaluation of anti-arthritic and anti-inflammatory potential of curcumin loaded chitosan nanoparticles. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37152-7>
- Atilgan, H., Unal, B., Yalcinkaya, E. E., Evren, G., Atik, G., Kirbay, F. O., Kilic, N. M., & Demirkol, D. O. (2023). Development of an Enzymatic Biosensor Using Glutamate



- Oxidase on Organic–Inorganic-Structured, Electrospun Nanofiber-Modified Electrodes for Monosodium Glutamate Detection. *Biosensors*, 13(4), 430. <https://doi.org/10.3390/bios13040430>
- Ávila, M. C. M., Yáñez, T. R., Naranjo, D., Almanza, A., & Castell, C. D. (2021). ¿Es la bolsa o la orina lo que cambió de color? Diagnóstico diferencial y relevancia clínica. *Medicina clínica práctica*, 4(4), 100274. <https://doi.org/10.1016/j.mcpsp.2021.100274>
- Ayesha Fazal Nawaz, Samra Zafar, Syeda Laraib Fatim, Komal Shahzadi, Zarish Fatima, Iqra Siddique. Use of Nanomaterials for the Immobilization of Industrially Important Enzymes. *Journal of Nanotechnology Research* 4 (2021): 45-57.
- Azevedo, K., Machek, S. B., Lewis, A. E., Azevedo, W., Willardson, J. M., Pereira, R., & Machado, M. (2022). Creatine Supplementation Improves Muscular Performance without Additional Impact on the Cardiovascular System in Trained Women. *Muscles*, 1(3), 121-132. <https://doi.org/10.3390/muscles1030013>
- Bachra, Y., Grouli, A., Damiri, F., Bennamara, A., & Berrada, M. (2020). A new approach for assessing the absorption of disposable baby diapers and superabsorbent polymers: A comparative study. *Results in Materials*, 8, 100156. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2020.100156>
- Bai, X., Li, D., Ma, F., Deng, X., Luo, M., Feng, Y., & Yang, G. Y. (2020). Improved thermostability of creatinase from *Alcaligenes Faecalis* through non-biased phylogenetic consensus-guided mutagenesis. *Microbial Cell Factories*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01451-9>
- Baldin, A. E., Gomes, E. N. S., Bender, S., & Linartevichi, V. F. (2021). Efeitos da suplementação crônica da creatina sobre a função renal: revisão da literatura. *Research, Society and Development*, 10(14), e89101421867. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21867>
- Barmore W, Azad F, Stone WL. Physiology, Urea Cycle. [Updated 2021 May 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513323/Baumelou, A.,>



- Bruckert, E., Bagnis, C., & Deray, G. (2005). Renal disease in cardiovascular disorders: an underrecognized problem. *American Journal of Nephrology*, 25(2), 95–105. <https://doi.org/10.1159/000084660>
- Bashir, S. M., Ahmed Rather, G., Patrício, A., Haq, Z., Sheikh, A. A., Shah, M. Z. ul H., Singh, H., *et al.* (2022). Chitosan Nanoparticles: A Versatile Platform for Biomedical Applications. *Materials*, 15(19), 6521. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ma15196521>
- Benini, S., Musiani, F., Ciurli, S. (2013). Urease. In: Kretsinger, R.H., Uversky, V.N., Permyakov, E.A. (eds) *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_79
- Berberich, J. A., Yang, L., Bahar, I., & Russell, A. J. (2005). A stable three enzyme creatinine biosensor. 2. Analysis of the impact of silver ions on creatine amidinohydrolase. *Acta Biomaterialia*, 1(2), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2004.11.007>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bikbov, B., Purcell, C. A., Levey, A. S., Smith, M., Abdoli, A., Abebe, M., ... Agudelo-Botero, M. (2020). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. doi:10.1016/s0140-6736(20)30045-3
- Bleavins, M. R., Carini, C., Jurima-Romet, M., & Rahbari, R. (2010). *Biomarkers in Drug Development: A Handbook of Practice, Application, and Strategy*. Wiley.
- Blum, L., & Marquette, C. (2009). Biosensors. From the Glucose Electrode to the Biochip. En Springer eBooks (pp. 871-909). https://doi.org/10.1007/978-3-540-88633-4_16
- BRENDA-Enzymes (2023). 1.5.3.1: Sarcosine oxidase (formaldehyde-forming) - BRENDA Enzyme Database. https://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php?ecno=1.5.3.1&table=Application#TAB
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2022, August 31). urea. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/urea>



- Britannica. (2023). Colorimetry | chemistry. Encyclopedia Britannica.
<https://www.britannica.com/science/colorimetry>
- British Plastics Federation. (s. f.). Polypropylene (PP). British Plastics Federation.
<https://www.bpf.co.uk/plastipedia/polymers/PP.aspx>
- Broadbent, A. D. (2017). Colorimetry, Methods. En Elsevier eBooks (pp. 321-327).
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803224-4.00014-5>
- Bubanja, I. N., Bánsági, T., & Taylor, A. F. (2018). Correction to: Kinetics of the urea–urease clock reaction with urease immobilized in hydrogel beads. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*. <https://doi.org/10.1007/s11144-017-1302-z>
- Bueno, M., Izquierdo, M. N., Romo, J. T., & Gómez, P. F. (2007). Protocolo diagnóstico de las alteraciones del pH urinario. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*, 9(81), 5239-5241. [https://doi.org/10.1016/s0211-3449\(07\)74640-4](https://doi.org/10.1016/s0211-3449(07)74640-4)
- Bugarin Kamour, I. (2018). Evaluación de espacios y distancias de color en el cálculo de los gradientes de color para detección automática de glaucoma [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad de Sevilla.
- Bunch. (2021). *Optical Systems Design Detection Essen. Emerging Technologies in Optic*.
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213-221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Campuzano-Maya, G., & Arbeláez Gómez, M. (2007). El Uroanálisis: Un gran aliado del médico. *Revista Urología Colombiana*, XVI(1), 67-92.
- Campuzano-Maya, G., & Arbeláez-Gómez, M. (2006). Uroanálisis: más que un examen de rutina. *Medicina & Laboratorio*, 12.
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8741850.pdf>
- Carney, E.F. The impact of chronic kidney disease on global health. *Nat Rev Nephrol* 16, 251 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0268-7>



- Castro-Ortíz, L. P., Luna-Pabello, V. M., & Villalobos-Pietrini, R. (2007). ESTADO DEL ARTE Y PERSPECTIVAS DEL USO DE BIOSENSORES AMBIENTALES EN MÉXICO. *Rev. Int. Contam. Ambient.*
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v23n1/v23n1a4.pdf>
- Cavalli, R., Leone, F., Minelli, R., Fantozzi, R., & Dianzani, C. (2014). New chitosan nanospheres for the delivery of 5-fluorouracil: preparation, characterization and in vitro studies. *Current drug delivery*, 11(2), 270–278.
<https://doi.org/10.2174/1567201811666140206103609>
- Chandran, R., Nowlin, K., & LaJeunesse, D. (2018). Nanosphere Lithography of Chitin and Chitosan with Colloidal and Self-Masking Patterning. *Polymers*, 10(2), 218. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/polym10020218>
- Chang, P.-C., Tai, W.-C., Luo, H.-T., Lai, C.-H., Lin, H.-H., Lin, Z.-J., ... Lee, B.-S. (2020). Core-Shell poly-(D,L-Lactide-co-Glycolide)-chitosan Nanospheres with simvastatin-doxycycline for periodontal and osseous repair. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 627–635. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.183
- Chávez-Gómez, N. L., Cabello-López, A., Gopar-Nieto, R., Aguilar-Madrid, G., Marin-López, K. S., Aceves-Valdez, M., Jiménez-Ramírez, C., Cruz-Angulo, M. del C., & Juárez-Pérez, C. A. (2017). Enfermedad renal crónica en México y su relación con los metales pesados. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(6), 725–734. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457753402014>
- Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. A., & Kimmel, P. L. (2014, julio 2). Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmra1214243>
- Choochottiros, C., Yoksan, R., & Chirachanchai, S. (2009). Amphiphilic chitosan nanospheres: Factors to control nanosphere formation and its consequent pH responsive performance. *Polymer*, 50(8), 1877–1886. doi:10.1016/j.polymer.2009.02.029



- Cleveland Clinic. (2022). Blood Urea Nitrogen (BUN): Testing, Levels & Indication. <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/17684-blood-urea-nitrogen-bun-test>
- Clydesdale, F. M., & Ahmed, E. M. (1978). Colorimetry — methodology and applications*. CRC critical reviews in food science and nutrition, 10(3), 243-301. <https://doi.org/10.1080/10408397809527252>
- Cochat, P., & Freychet, C. (2016). Análisis de orina con tira reactiva: interés en nefrología pediátrica. EMC - Tratado de Medicina. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(16\)79483-9](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(16)79483-9)
- Condezo-Hoyos, L., Abderrahim, M., & Arribas, S. M. (2015). Análisis colorimétrico de alta eficiencia y de bajo coste mediante visión por computador. Comité Español de Automática de la IFAC. <https://www.ehu.eus/documents/3444171/4484752/125.pdf>
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. (2017). INSUFICIENCIA RENAL. <https://www.cofbadajoz.com/wp-content/uploads/2018/03/INSUFICIENCIA-RENAL.pdf>
- Corella, D., & Ordovás, J. M. (2015). Biomarcadores: antecedentes, clasificación y guía para su aplicación en epidemiología nutricional. Revista Española de Nutrición comunitaria. <https://doi.org/10.14642/RENC.2015.21.sup1.5064>
- Cornell Universit. (2013). New tech lets cholesterol-tracking smartphone users take lifesaving selfies. ScienceDaily. <https://www.sciencedaily.com/releases/2013/12/131213161150.htm>
- Cortón, Eduardo. (2000). Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Counts, J. L., Weisbrod, A. V., & Yin, S. (2017). Common diaper ingredient questions: Modern disposable diaper materials are safe and extensively tested. Clinical Pediatrics, 56(5_suppl), 23S-27S. <https://doi.org/10.1177/0009922817706998>
- Crespo, A. (2018). Revisión del tratamiento de las alteraciones del ciclo de la urea. Facultad de Farmacia Universidad Complutense.



<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALVARO%20CRESPO%20GONZALEZ.pdf>

Crosby, N. T. (1968). Determination of ammonia by the Nessler method in waters containing hydrazine. *The Analyst*, 93(1107), 406. doi:10.1039/an9689300406

Cruz Llanos, Luis Enrique, & Cieza Zevallos, Javier Antonio. (2021). Relación entre el índice urémico y la función renal en pacientes con enfermedad renal crónica y en personas sanas. *Revista Medica Herediana*, 32(4), 216-223. Epub 19 de enero de 2022. <https://dx.doi.org/10.20453/rmh.v32i4.4118>

Dai, H., Li, Y., Zhang, Q., Fu, Y., & Li, Y. (2018). A colorimetric biosensor based on enzyme-catalysis-induced production of inorganic nanoparticles for sensitive detection of glucose in white grape wine. *RSC Advances*, 8(59), 33960-33967. <https://doi.org/10.1039/c8ra06347h>

Dasari, H., Bhagvati, C., & Jain, R. K. (2005). Distance measures in RGB and HSV color spaces. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/221205971_Distance_measures_in_RGB_and_HSV_color_spaces

De Arriba De La Fuente, G., Guinea, M. T., & Cid, T. P. (2011). Estudio físico-químico de la orina. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(11\)70120-2](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(11)70120-2)

De Buitrago, J. M. G. (2010). Análisis de orina. En Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-84-458-2029-2.50016-1>

De Gaetano, F., d'Avanzo, N., Mancuso, A., De Gaetano, A., Paladini, G., Caridi, F., Venuti, V., *et al.* (2022). Chitosan/Cyclodextrin Nanospheres for Potential Nose-to-Brain Targeting of Idebenone. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1206. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ph15101206>

Dehesa LE. Enfermedad renal crónica; definición y clasificación. *Residente*. 2008;3(3):73-78.



- Dehesa, L.E (2008). Enfermedad renal crónica; definición y clasificación. Residente. 3(3):73- 78.
- Delgado, C., Baweja, M., Burrows, N. R., Crews, D. C., Eneanya, N. D., Gadegbeku, C. A., Inker, L. A., Mendu, M. L., Miller, W. A., Moxey-Mims, M., Roberts, G. S., St Peter, W. L., Warfield, C., & Powe, N. R. (2021). Reassessing the Inclusion of Race in Diagnosing Kidney Diseases: An Interim Report From the NKF-ASN Task Force. *American Journal of Kidney Diseases*, 78(1), 103-115. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2021.03.008>
- Dey, S., Helmes, C. T., White, J. C., & Zhou, S. (2014). Safety of disposable diaper materials. *Clinical Pediatrics*, 53(9_suppl), 17S-19S. <https://doi.org/10.1177/0009922814540378>
- Dey, S., Purdon, M. P., Kirsch, T., Helbich, H. M., Kerr, K., Li, L., & Zhou, S. (2016). Exposure factor Considerations for safety evaluation of modern disposable diapers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.08.017>
- Díaz de León-Ponce, M. A., Briones-Garduño, J. C., Carrillo-Esper, R., Moreno-Santillán, A., & Pérez-Calatayud, A. A. (2017). Insuficiencia renal aguda (IRA) clasificación, fisiopatología, histopatología, cuadro clínico diagnóstico y tratamiento una versión lógica. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 40(4). <https://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2017/cma174e.pdf>
- Diezma, Belén, & Correa, EC. (2018). Biosensores y sistemas ópticos y de visión avanzados: su aplicación en la evaluación de la calidad de productos IV gama. *Agrociencia (Uruguay)*, 22(1), 13-25. <https://doi.org/10.31285/agro.22.1.2>
- Dimeski, G., & Treacy, O. (2022). Biochemical Tests for Diagnosing and Evaluation Stages of Chronic Kidney Disease. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1000205>
- Domínguez-Cruz, R. B. (2014). Plataforma general para construcción, caracterización y prueba de biosensores y sensores químicos. [Tesis de doctorado]. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.



- Dossier. (2022). Biosensores colorimétricos y electroquímicos. https://www.itene.com/wp-content/uploads/2022/03/Dossier-2_VIRISENS-BiosensoresolorimEtricoyelectroquImico.pdf
- Dwevedi, A. (2016). *Enzyme Immobilization: Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment*. Springer.
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., & Krakowka, S. (1991). Essential Role of Urease in Pathogenesis of Gastritis Induced by *Helicobacter pylori* in Gnotobiotic Piglets. *INFECTION AND IMMUNITY*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC258033/pdf/iai00043-0254.pdf>
- Edelstein, C. L. (2008). Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 15(3), 222-234. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2008.04.003>
- Edmunds, J. W., Jayapalan, S., DiMarco, N. M., Saboorian, H., & Aukema, H. M. (2001). Creatine Supplementation Increases Renal Disease Progression in Han:SPRD-cy Rats. *American Journal of Kidney Diseases*, 37(1), 73-78. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.20590>
- Edwards, J. M. (2023, 26 enero). Is Renal Insufficiency the Same as Renal Failure? Healthline. <https://www.healthline.com/health/kidney-health/renal-insufficiency-vs-renal-failure>
- Eknoyan, G., Hostetter, T., Bakris, G. L., Hebert, L., Levey, A. S., Parving, H.-H., ... Toto, R. (2003). Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *American Journal of Kidney Diseases*, 42(4), 617-622. doi:10.1016/s0272-6386(03)00826-6
- Ellam, T., Twohig, H., & Khwaja, A. (2016). Chronic kidney disease in elderly people: disease or disease label? *BMJ*, h6559. doi:10.1136/bmj.h6559
- Encyclopedia. (2021). Colorimetric Sensors. <https://encyclopedia.pub/3615>
- Equilibriorenal. (s. f.). ¿Cómo funcionan tus riñones? <https://equilibriorenal.com/pacientes/>



- Espinosa-Cuevas, M. A. (2016). Enfermedad renal. PubMed.
https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_090-096.pdf
- Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L., & Zhang, G. (2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*, 171, 108829.
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>
- Fatima, Zarish, & Quazi, Sameer. (2021). Use of nanomaterials for the immobilization of industrially important enzymes. *European Journal of Biological Research*, 11(3), 381–391. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5148938>
- Fernandez-Lafuente, R. (2023). Enzyme Immobilization. *Molecules*, 28(3).
<https://doi.org/10.3390/molecules28031373>
- Fernández-Puig, S. (2019). Desarrollo y evaluación de sensores potenciométricos miniaturizados para biomarcadores de cáncer de próstata basados en polímeros de impresión molecular [Tesis de doctorado]. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.
- Figuroa-Lara, A., Gonzalez-Block, M. A., & Alarcon-Irigoyen, J. (2016). Medical Expenditure for Chronic Diseases in Mexico: The Case of Selected Diagnoses Treated by the Largest Care Providers. *PloS One*, 11(1), e0145177.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145177>
- Fundación Femeba. (2020). Enfermedad renal crónica: carga mundial, regional y nacional 1990–2017. <https://www.fundacionfemeba.org.ar/blog/farmacologia-7/post/enfermedad-renal-cronica-carga-mundial-regional-y-nacional-19902017-47566>
- Gainza de los Ríos, F. J. (2020). Insuficiencia Renal Aguda. *revistanefrologia*.
<https://www.revistanefrologia.com/index.php?p=revista&tipo=pdf-simple&pii=XX342164212001843>
- Gámez Jiménez, Ana Margarita, Montell Hernández, Oscar Antonio, Ruano Quintero, Vivian, Alfonso de León, José A., & Hay de la Puente Zoto, Marlen. (2013). Enfermedad renal crónica en el adulto mayor. *Revista Médica Electrónica*, 35(4),



306-318. Recuperado en 15 de junio de 2022, de
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242013000400001&lng=es&tlng=es

Gao, W., Nyein, H. Y. Y., Shahpar, Z., Fahad, H. M., Chen, K., Emaminejad, S., ... Javey, A. (2016). Wearable Microsensor Array for Multiplexed Heavy Metal Monitoring of Body Fluids. *ACS Sensors*, 1(7), 866–874. doi:10.1021/acssensors.6b00287

Garg, P. (2024). Serum Creatinine Test Normal Range by Age: Complete Values. MyHealth. <https://redcliffelabs.com/myhealth/lab-test/serum-creatinine-normal-range-by-age-can-creatinine-levels-change-quickly/>

Gil Hernández, F. (s. f.). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. <https://www.ugr.es/~fgil/biomarcadoresrevtoxicol.pdf>

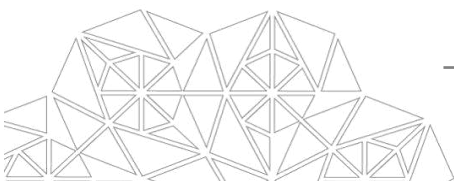
Gilchrist, A., Nobbs, J. (2017). Colorimetry, Theory. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 328–333. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803224-4.00124-2>

Gillette, H. (2023b, enero 9). Are renal insufficiency and renal failure the same? [https://www.medicalnewstoday.com/articles/renal-insufficiency-vs-renal-failure#:~:text=Chronic%20renal%20failure%20\(CRF\)%2C,there%20is%20currentl y%20no%20cure.](https://www.medicalnewstoday.com/articles/renal-insufficiency-vs-renal-failure#:~:text=Chronic%20renal%20failure%20(CRF)%2C,there%20is%20currentl y%20no%20cure.)

Gómez-Carracedo, A., Arias-Muñana, E., & Jiménez-Rojas, C. (2006). INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA. Tratado de geriatría para residentes. https://www.segg.es/download.asp?file=/tratadogeriatría/PDF/S35-05%2062_III.pdf

González-González, Elizabeth, Bacallao Méndez, Raymed Antonio, Gutiérrez García, Francisco, & Mañalich Comas, Reinaldo. (2014). Estimación de la función renal mediante creatinina sérica y fórmulas predictivas en población litiásica cubana. *Revista Cubana de Medicina*, 53(3), 254-265. Recuperado en 12 de mayo de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232014000300003&lng=es&tlng=es.

González-Rumayor, V., García-Iglesias, E., Ruiz-Galán, O., & Gago-Cabezas, L. (2005). Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria.





https://www.ugr.es/~cjl/VT1_Aplicaciones_de_biosensores_en_la_industria_agroalimentaria.pdf

- Gonzalo-Ruiz, J. (2006). Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 20(4), 291–300. doi:10.3109/1061186x.2011.654121
- Gupta, R. C. (2014). *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press.
- Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., & Wojcieszynska, D. (2014). Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. *Molecules*, 19(7), 8995-9018. <https://doi.org/10.3390/molecules19078995>
- Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Suman, R., & Rab, S. (2021). Biosensors applications in medical field: A brief review. *Sensors International*, 2, 100100. doi:10.1016/j.sintl.2021.100100
- He, X., Pei, Q., Xu, T., & Zhang, X. (2020). Smartphone-based tape sensors for multiplexed rapid urinalysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 304, 127415. doi:10.1016/j.snb.2019.127415
- Higgins, C. (2016). Urea and the clinical value of measuring blood urea concentration. <https://acutecaretesting.org/en/articles/urea-and-the-clinical-value-of-measuring-blood-urea-concentration>
- Hill, N. W., Fatoba, O. S., Oke, J., Hirst, J., O’Callaghan, C., Lasserson, D., & Hobbs, R. J. (2016). Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 11(7), e0158765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158765>
- Hroncekova, S., Lorencova, L., Bertok, T., Hires, M., Jane, E., Bučko, M., Kasak, P., & Tkac, J. (2023). Amperometric Miniaturised Portable Enzymatic Nanobiosensor for the



- Ultrasensitive Analysis of a Prostate Cancer Biomarker. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(3), 161. <https://doi.org/10.3390/jfb14030161>
- Huidobro E., Juan Pablo, Tagle, Rodrigo, & Guzmán, Ana María. (2018). Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular. *Revista médica de Chile*, 146(3), 344-350. <https://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872018000300344>
- Hyperphysics. (s. f.). CIE Color System. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/vision/cie.html>
- Ikono, R., Mardliyati, E., Agustin, I. T., Ulfi, M. M. F., Andrianto, D., Hasanah, U., ... Tojo, A. (2018). Chitosan—PRP nanosphere as a growth factors slow releasing device with superior antibacterial capability. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 4(4), 045026. doi:10.1088/2057-1976/aac9f8
- IMSS (2007). Evaluación de los riesgos considerados en el programa de administración de riesgos institucionales. Coordinación de Administración de Riesgos Institucionales. Dirección de Finanzas. Instituto Mexicano del Seguro Social 2007, p. 39-44.
- INSP (Instituto Nacional De Salud Pública), México. (2020, 26 agosto). La Enfermedad Renal Crónica en México. INSP.MX. <https://www.insp.mx/avisos/5296-enfermedad-renal-cronica-mexico.html#sup2>
- Ito, K., Kanada, N., Inoue, T., Furukawa, K., Yamashita, K., Tanaka, N., Nakamura, K., Nishiya, Y., Sogabe, A., & Yoshimoto, T. (2002). Preliminary crystallographic studies of the creatinine amidohydrolase from *Pseudomonas putida*. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 58(12), 2180-2181. <https://doi.org/10.1107/s0907444902017067>
- Itziar, C. B. (2009, 1 febrero). Estudios de función renal: función glomerular y tubular. análisis de la orina. *Nefrología*. <https://www.revistanefrologia.com/es-estudios-funcion-renal-funcion-glomerular-articulo-X1888970009000355>
- IUBMB (2022). EC 1.5.3.1. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC1/5/3/1.html>
- Jabary, N. S., Martin, D., Muñoz, M. F., Santos, M., Herruzo, J., Gordillo, R., & Bustamante, J. (2006, 1 febrero). Creatinina serica y aclaramiento de creatinina para la valoracion

- de la función renal en hipertensos. *Nefrología*. <https://www.revistanefrologia.com/es-creatinina-serica-aclaramiento-creatinina-valoracion-articulo-X0211699506019232>
- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., ... Abdelalim, A. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858. doi:10.1016/s0140-6736(18)32279-7
- Jeon, H., Kim, H. S., Chung, E., & Lee, D. Y. (2022). Nanozyme-based colorimetric biosensor with a systemic quantification algorithm for noninvasive glucose monitoring. *Theranostics*, 12(14), 6308-6338. <https://doi.org/10.7150/thno.72152>
- Jeon, H., Kim, H. S., Chung, E., & Lee, D. Y. (2022). Nanozyme-based colorimetric biosensor with a systemic quantification algorithm for noninvasive glucose monitoring. *Theranostics*, 12(14), 6308-6338. <https://doi.org/10.7150/thno.72152>
- Jha, R., & Mayanovic, R. A. (2023). A review of the preparation, characterization, and applications of chitosan nanoparticles in nanomedicine. *Nanomaterials*, 13(8), 1302. <https://doi.org/10.3390/nano13081302>
- Jiang, F., Bian, J., Liu, H., Li, S., Bai, X., Zheng, L., Jin, S., Liu, Z., Yang, G., & Hong, L. (2023). Creatinase: Using Increased Entropy to Improve the Activity and Thermostability. *Journal of Physical Chemistry B*, 127(12), 2671-2682. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c08062>
- Jiménez C, Claudio, & León P, Daniel E. (2009). Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Vitae*, 16(1), 144-154. Retrieved May 12, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000100017&lng=en&tlng=es.
- Jitonnorn, J., Mujika, J. I., van der Kamp, M. W., & Mulholland, A. J. (2017). Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Simulations Identify the Ring-Opening Mechanism of Creatinase. *Biochemistry*, 56(48), 6377–6388. doi:10.1021/acs.biochem.7b01032



- Jornet-Martínez, N., Henderson, C. J., Campíns-Falcó, P., Daly, R., & Hall, E. A. H. (2019). Towards Sarcosine Determination in Urine for Prostatic Carcinoma Detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. doi:10.1016/j.snb.2019.02.061
- Kahdestani, S. A., Shahriari, M. H., & Abdouss, M. (2020). Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles containing teicoplanin using SoL–gel. *Polymer Bulletin*, 78(2), 1133-1148. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03134-2>
- Kamat, V., Bodas, D., & Paknikar, K. M. (2016). Chitosan nanoparticles synthesis caught in action using microdroplet reactions. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep22260>
- Kaur, J., Choudhary, S., Chaudhari, R., Jayant, R. D., & Joshi, A. (2019). Enzyme-based biosensors. En Elsevier eBooks (pp. 211-240). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102420-1.00013-3>
- Kha and Wolfgang W. A highly sensitive amperometric creatinine sensor. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 351: 151-158.
- KidsHealth. (2023). Riñones. KidsHealth. <https://kidshealth.org/es/kids/kidneys.html>
- Killard, A. J., & Smyth, M. R. (2000). Creatinine biosensors: principles and designs. *Trends in Biotechnology*, 18(10), 433-437. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01491-8](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01491-8)
- Kim, H. J., Kim, C. K., Carpentier, A., & Poortmans, J. R. (2011). Studies on the safety of creatine supplementation. *Amino Acids*, 40(5), 1409–1418. doi:10.1007/s00726-011-0878-2
- Kim, J., Banks, A., Xie, Z., Heo, S. Y., Gutruf, P., Lee, J. W., ... Rogers, J. A. (2015). Miniaturized Flexible Electronic Systems with Wireless Power and Near-Field Communication Capabilities. *Advanced Functional Materials*, 25(30), 4761–4767. doi:10.1002/adfm.201501590
- Koh, A., Kang, D., Xue, Y., Lee, S., Pielak, R. M., Kim, J., Hwang, T., Min, S., Banks, A., Bastien, P., Manco, M. C., Wang, L., Ammann, K. R., Jang, K.-I., Won, P., Han, S., Ghaffari, R., Paik, U., Slepian, M. J., Rogers, J. A. (2016). A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat.



Science Translational Medicine, 8(366), 366ra165.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2593>

Kong, Z., Yu, M., Cheng, K., Weng, W., Wang, H., Lin, J., ... Han, G. (2013). Incorporation of chitosan nanospheres into thin mineralized collagen coatings for improving the antibacterial effect. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 536–541. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.006

Kreider, R. B. (2003). Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Molecular and Cellular Biochemistry*.
<https://www.exerciseandsportnutritionlab.com/wp-content/uploads/2016/02/MCB244-89-94-03.pdf>

Kretsinger, R. H., Uversky, V. N., & Permyakov, E. A. (2013). *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer.
https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4614-1533-6_79#citeas

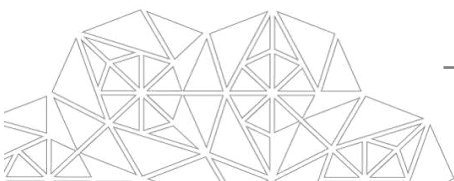
Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H., & Aminabhavi, T. M. (2022). Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. *Biosensors*, 12(7), 543. <https://doi.org/10.3390/bios12070543>

Kumar, P., Jaiwal, R., & Pundir, C. S. (2017). An improved amperometric creatinine biosensor based on nanoparticles of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 537, 41–49. doi:10.1016/j.ab.2017.08.022

Kumar, P., Narwal, V., Jaiwal, R., & Pundi, C. S. (2018). Construction and application of amperometric sarcosine biosensor based on SOxNPs/AuE for determination of prostate cancer. *Biosensors and Bioelectronics*. doi:10.1016/j.bios.2018.09.003

Kuşbaz, A., Göcek, İ., Baysal, G., Kok, F. N., Trabzon, L., Kizil, H., & Kayaoğlu, B. K. (2019). Lactate detection by colorimetric measurement in real human sweat by microfluidic-based biosensor on flexible substrate. *Journal of The Textile Institute*, 110(12), 1725-1732. <https://doi.org/10.1080/00405000.2019.1616955>

Lab Center. (2001). Creatinina. Spinreact.
https://www.spinreact.com.mx/public/_pdf/1001111.pdf



- Lab Tests. (2021, 12 diciembre). Urea. Lab Tests Online. <https://labtestsonline.es/tests/urea>
- LabTest. (2021). Urea. labtestonline. <https://www.labtestsonline.es/tests/urea>
- Lad, U., Khokhar, S., & Kale, G. M. (2008). Electrochemical Creatinine Biosensors. *Analytical Chemistry*, 80(21), 7910–7917. <https://doi.org/10.1021/ac801500t>
- Lahham, M., Jha, S., Goj, D., Macheroux, P., & Wallner, S. (2021). The family of sarcosine oxidases: Same reaction, different products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 704, 108868. doi:10.1016/j.abb.2021.108868
- Laso, M. C. (2002). Interpretación del análisis de orina. *Pediatría práctica*. https://www.sap.org.ar/docs/archivos/2002/arch02_2/179.pdf
- Lee, M., Chen, B.-Y., & Den, W. (2015). Chitosan as a Natural Polymer for Heterogeneous Catalysts Support: A Short Review on Its Applications. *Applied Sciences*, 5(4), 1272–1283. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/app5041272>
- Leonard, J. V., & Morris, A. A. M. (2002). Urea cycle disorders. *Seminars in Neonatology*, 7(1), 27–35. doi:10.1053/siny.2001.0085
- Leonard, J.V. (2006). Disorders of the Urea Cycle and Related Enzymes. In: Fernandes, J., Saudubray, JM., van den Berghe, G., Walter, J.H. (eds) *Inborn Metabolic Diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg . https://doi.org/10.1007/978-3-540-28785-8_20
- Léost, L., Roques, J., Van Der Meer, A., Vincent, L., Sbirrazzuoli, N., Hennig, C., ... Di Giorgio, C. (2018). Towards the development of chitosan nanoparticles for plutonium pulmonary decorporation. *Dalton Transactions*, 47(33), 11605–11618. doi:10.1039/c8dt02419g
- Levey, A. S., & Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease. *The Lancet*, 379(9811), 165–180. doi:10.1016/s0140-6736(11)60178-5
- Levey, A. S., Eckardt, K., Tsukamoto, Y., Levin, A., Coresh, J., Rossert, J., De Zeeuw, D., Hostetter, T. H., Lameire, N., & Eknoyan, G. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global



- Outcomes (KDIGO). *Kidney International*, 67(6), 2089-2100.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x>
- Levey, A. S., Inker, L. A., & Coresh, J. (2015). Chronic Kidney Disease in Older People. *JAMA*, 314(6), 557. doi:10.1001/jama.2015.6753
- Levey, A. S., Stevens, L. A., Schmid, C. H., Zhang, Y., Castro, A. J., Feldman, H. I., Kusek, J. W., Eggers, P. W., Van Lente, F., Greene, T., & Coresh, J. (2009). A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Annals of Internal Medicine*, 150(9), 604. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006>
- Limbut, W., Promsuwan, K., Kongkaew, S., Thavarungkul, P., & Mak, W. C. (2023). Emerging functional materials for microfluidic biosensors. En Elsevier eBooks (pp. 195-231). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823846-2.00008-0>
- Liu, B., Zhuang, J., & Wei, G. (2020). Recent Advance in the Design of Colorimetric Sensors for Environmental Monitoring. *Environmental Science: Nano*. doi:10.1039/d0en00449a
- Liu, F., Cheng, X., Miu, J., Li, X., Yin, R., Wang, J., & Qu, Y. (2021). Application of different methods to determine urease activity in enzyme engineering experiment and production. *E3S web of conferences*, 251, 02057. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125102057>
- Liu, H., Yan, F., & Qian, X. (2019). Preparation and properties of eccentric hollow fiber nonwovens for acquisition distribution layer. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 14, 155892501988549. <https://doi.org/10.1177/1558925019885497>
- Liu, Q. S., Yan, Q. F., & Yin, X. Y. (2015). Preparation of Chitosan Nanospheres by Miniemulsion Crosslinking Method. *Advanced Materials Research*, 1094, 68–71. doi:10.4028/www.scientific.net/amr.1094.68
- Logvinenko, A. D., & Levin, V. L. (2022). *Foundations of Colour Science: From Colorimetry to Perception*. John Wiley & Sons.



- Lombi, F., Muryan, A., Canzonieri, R., & Trimarchi, H. (2016). Biomarkers in acute kidney injury: Evidence or paradigm? *Nefrología*, 36(4), 339-346. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2016.10.006>
- Longobardi, I., Gualano, B., Seguro, A. C., & Roschel, H. (2023). Is It Time for a Requiem for Creatine Supplementation-Induced Kidney Failure? A Narrative Review. *Nutrients*, 15(6), 1466. <https://doi.org/10.3390/nu15061466>
- Loo, J. F., Ho, A. H., & Mak, W. C. (2023). Printed microfluidic biosensors and their biomedical applications. En Elsevier eBooks (pp. 1-40). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823846-2.00001-8>
- López, F., Blanes, M., & Ríos, M. (2012). Valoración de Urea, Creatinina y Electrolitos pre y post hemodiálisis en pacientes renales del Hospital Nacional de Itauguá. *scielo*. <http://scielo.iics.una.py/pdf/hn/v4n1/v4n1a06.pdf>
- López, Fátima, Blanes, Monserrat, Ríos, María, & Vera, Lidia. (2012). Valoración de Urea, Creatinina y Electrolitos pre y post hemodiálisis en pacientes renales del Hospital Nacional de Itauguá.. *Revista del Nacional (Itauguá)*, 4(1), 34-40. Retrieved May 01, 2022, from http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-81742012000100006&lng=en&tlng=es.
- Lopez-Giacoman, S., & Madero, M. (2015). Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World journal of nephrology*, 4(1), 57. <https://doi.org/10.5527/wjn.v4.i1.57>
- Lorenzo-Sellarés V, Luis-Rodríguez D., Lorenzo V., López Gómez JM (2022). Enfermedad Renal Crónica. *Nefrología al día*. ISSN: 2659-2606. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/136>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. doi:10.1016/s0021-9258(19)52451-6
- Lozano, Rafael, Gómez-Dantés, Héctor, Garrido-Latorre, Francisco, Jiménez-Corona, Aída, Campuzano-Rincón, Julio César, Franco-Marina, Francisco, Medina-Mora, María



- Elena, Borges, Guilherme, Naghavi, Mohsen, Wang, Haidong, Vos, Theo, Lopez, Alan D, & Murray, Christopher JL. (2013). La carga de enfermedad, lesiones, factores de riesgo y desafíos para el sistema de salud en México. *Salud Pública de México*, 55(6), 580-594. Recuperado en 01 de mayo de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342013001000007&lng=es&tlng=es.
- Lozano-Triana, C. J. (2016). Examen general de orina: una prueba útil en niños. *Revista de la Facultad de Medicina*. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v64n1.50634>
- Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., & Stone, M. O. (2004). Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology*, 22(2), 211-213. <https://doi.org/10.1038/nbt931>
- Luka, G., Nowak, E., Toyata, Q. R., Tasnim, N., Najjaran, H., & Hoorfar, M. (2021). Portable on-chip colorimetric biosensing platform integrated with a smartphone for label/PCR-free detection of *Cryptosporidium* RNA. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02580-w>
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- Malhotra, B. D., & Ali, M. A. (2018). Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. *Nanomaterials for Biosensors*, 1–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7>
- Malkina, A. (2023, 6 febrero). Enfermedad renal crónica. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-urogenitales/enfermedad-renal-cr%C3%B3nica/enfermedad-renal-cr%C3%B3nica>
- Man, Y. G., Meijing, B., Li, A., Jin, X., Du, Y., & Pan, L. (2021). A microfluidic colorimetric biosensor for in-field detection of *Salmonella* in fresh-cut vegetables using thiolated polystyrene microspheres, hose-based microvalve and smartphone imaging APP. *Food Chemistry*, 354, 129578. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129578>



- Mani, S., Veeramani, V., Chen, S., Madhu, R., Pitchaimani, V., Chang, J. F., & Liu, S. (2016). Hydrothermal synthesis of NiWO₄ crystals for high performance non-enzymatic glucose biosensors. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep24128>
- Manzanares, J. (2015). Interpretación del análisis básico de orina en el deportista. *Medicina De Familia. Semergen*. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2014.07.013>
- Mao, H., Huang, Z. Z. N. Y. J. S., & Ya, Y. (2017). A Microfluidic Colorimetric Biosensor for Chlorpyrifos Determination based on Peroxidase-like CuFe₂O₄/GQDs Magnetic Nanoparticles. *Journal of Residuals Science & Technology*, 14(1), 255-269. <https://doi.org/10.12783/issn.1544-8053/14/1/30>
- Maquieira, A. (2010). ¿ QUÉ SON LOS BIOSENSORES Y PARA QUÉ LOS PODEMOS UTILIZAR? <http://enclave.cev.es/unoi/wp-content/uploads/2011/01/qu%C3%A9-son-los-biosensores-y-para-qu%C3%A9-los-podemos-utilizar.pdf>
- Martín-Pacho, E. (2015). APLICACIÓN DE SENSORES Y BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTIOXIDANTES. Universidad de Valladolid.
- Masaru, S., & Mitsutaka, Y. (1984). A new enzymatic serum creatinine measurement based on an endogenous creatine-eliminating system. *Clinica Chimica Acta*, 143(2), 147–155. doi:10.1016/0009-8981(84)90222-5
- Masson, P., Webster, A. C., Hong, M., Turner, R. M., Lindley, R. I., & Craig, J. C. (2015). Chronic kidney disease and the risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(7), 1162-1169. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv009>
- Mateo, C., Grazú, V., Palomo, J. M., López-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2007). Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature Protocols*, 2(5), 1022-1033. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.133>
- Matsuda, Y., Hoshika, H., Inouye, Y., Ikuta, S., Matsuura, K., & Nakamura, S. (1987). Purification and characterization of sarcosine oxidase of *Bacillus origin*.



- Matsushita, K., Van Der Velde, M., Astor, B. C., Woodward, M., Levey, A. S., De Jong, P. E., Coresh, J., Gansevoort, R. T., El-Nahas, M., Eckardt, K., Kasiske, B. L., Tonelli, M., Hemmelgarn, B. R., Wang, Y., Atkins, R. C., Polkinghorne, K. R., Chadban, S. J., Shankar, A., Klein, R., . . . Manley, T. (2010). Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *The Lancet*, 375(9731), 2073–2081. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60674-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60674-5)
- Maw, T. T., & Fried, L. (2013). Chronic Kidney Disease in the Elderly. *Clinics in Geriatric Medicine*, 29(3), 611–624. doi:10.1016/j.cger.2013.05.003
- Mayo Clinic. (2021a, 19 agosto). Análisis de nitrógeno ureico en sangre. <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/blood-urea-nitrogen/about/pac-20384821>
- Mayo Clinic. (2021b, 3 septiembre). Chronic kidney disease - Diagnosis and treatment. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-kidney-disease/diagnosis-treatment/drc-20354527>
- Mayo Clinic. (2022, julio 30). Insuficiencia renal aguda - Síntomas y causas. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/kidney-failure/symptoms-causes/syc-20369048>
- Mayo Clinic. (2023, 9 febrero). Análisis de creatinina. <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/creatinine-test/about/pac-20384646>
- Medline Plus. (2021). Examen de creatinina en la sangre. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003475.htm#:~:text=Un%20resultado%20normal%20es%20de,frecuentemente%20tienen%20menor%20masa%20muscular.>
- MedlinePlus. (2021). Enfermedad renal crónica: enciclopedia médica. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000471.htm>



- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of oral biology and craniofacial research*, 6(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Méndez-Durán, A. (2021). Evolución del tratamiento sustitutivo de la función renal en México en los últimos 10 años. *Nefrología*. doi:10.1016/j.nefro.2020.02.004
- Milani, D. A. Q. (2022, 8 mayo). Urinalysis. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557685/>
- Mora-Gutiérrez, J. M., Slon Roblero, M. F., Castaño Bilbao, I., Izquierdo Bautista, D., Arteaga Coloma, J., & Martínez Velilla, N. (2017). Enfermedad renal crónica en el paciente anciano. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 52(3), 152–158. doi:10.1016/j.regg.2016.03.006
- Morou-Bermudez, E., Rodriguez, S., Bello, A. S., & Dominguez-Bello, M. G. (2015). Urease and Dental Plaque Microbial Profiles in Children. *PLOS ONE*, 10(9), e0139315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139315>
- Morshed, M., Behary, N., Bouazizi, N., Guan, J., Chen, G., & Nierstrasz, V. (2019). Surface modification of polyester fabric using plasma-dendrimer for robust immobilization of glucose oxidase enzyme. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52087-8>
- Motta, J. F. G., De Freitas, B. C. B., De Almeida, A. F., De Souza Martins, G. A., & Borges, S. V. (2023). Use of enzymes in the food industry: a review. *Food Science and Technology*, 43. <https://doi.org/10.1590/fst.106222>
- Mukouyama, E. B., Oguchi, M., Kodera, Y., Maeda, T., & Suzuki, H. (2004). Low p K a lysine residues at the active site of sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp. U-96. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(3), 846–851. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.219
- Munishwar N. Gupta, Mandeep Kaloti, Manali Kapoor & Kusum Solanki (2011) *Nanomaterials as Matrices for Enzyme Immobilization, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39:2, 98-109, DOI: 10.3109/10731199.2010.516259



- Narwal, V., Kumar, P., Joon, P., & Pundir, C. S. (2018). Fabrication of an amperometric sarcosine biosensor based on sarcosine oxidase/chitosan/CuNPs/c-MWCNT/Au electrode for detection of prostate cancer. *Enzyme and Microbial Technology*, 113, 44–51. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.02.010
- Nassau, K. (2023, 27 marzo). Color | Definition, Perception, Types, & Facts. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/color/The-measurement-of-colour>
- Nath, N., & Chilkoti, A. (2004). Label Free Colorimetric Biosensing Using Nanoparticles. *Journal of Fluorescence*, 14(4), 377-389. <https://doi.org/10.1023/b:jofl.0000031819.45448.dc>
- National Kidney Foundation. (2015). Los riñones y la enfermedad renal. *Kidney.org*. <https://www.kidney.org/sites/default/files/01-10-6163%20%20Learn%20About%20Kidneys%20and%20Kidney%20Disease.pdf>
- Nefralia. (s. f.). Insuficiencia renal crónica. *Nefralia: Enfermedad Renal Crónica*. <https://nefralia.es/insuficiencia-renal-cronica>
- Newman, J. A., & Setford, S. (2006). Enzymatic Biosensors. *Molecular Biotechnology*, 32(3), 249-268. <https://doi.org/10.1385/mb:32:3:249>
- NHS. (2023, 12 abril). Diagnosis. *nhs.uk*. <https://www.nhs.uk/conditions/kidney-disease/diagnosis/>
- NIDDK. (2018). ¿Qué es la insuficiencia renal? . National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-rinones/insuficiencia-renal/que-es#:~:text=La%20insuficiencia%20renal%20significa%20que,los%20pies%20o%20los%20tobillos>
- NIH. (2016). Chronic Kidney Disease Tests & Diagnosis. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/chronic-kidney-disease-ckd/tests-diagnosis>



- NIH. (s. f.). Diccionario de cáncer del NCI. Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/biomarcador>
- Nirmala, R., Il, B. W., Navamathavan, R., El-Newehy, M. H., & Kim, H. Y. (2011). Preparation and characterizations of anisotropic chitosan nanofibers via electrospinning. *Macromolecular Research*, 19(4), 345–350. doi:10.1007/s13233-011-0402-2
- NKF. (2022a). Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR). National Kidney Foundation. <https://www.kidney.org/atoz/content/gfr>
- NKF. (2022b, 15 agosto). What is a Kidney Biopsy?. National Kidney Foundation. <https://www.kidney.org/atoz/content/kidney-biopsy>
- NKF. (2023, 3 mayo). National Kidney Foundation. <https://www.kidney.org/atoz/content/about-chronic-kidney-disease>
- Nogueira, P., Konstantyner, T., De Carvalho, M. H. C., De Xavier Pinto, C. C., De Pádua Paz, I., Belangero, V. M. S., De Sousa Tavares, M., Garcia, C., Neto, O. A. F., Zuntini, K., Da Rocha Lordelo, M., Oi, S. S. P., Damasceno, R. F., & Sesso, R. (2019). Development of a risk score for earlier diagnosis of chronic kidney disease in children. *PLOS ONE*, 14(4), e0215100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215100>
- Nyamukamba, P., Mququ, Z., Nkosi, S., & Isaacs, S. (2023). Determination of selected harmful substances in baby diapers available on the South African market. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(2), 1023. <https://doi.org/10.3390/ijerph20021023>
- Official Journal of the International Society of Nephrology. (2013). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease (Vol. 3). National Kidney Foundation. https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf



- Omnexus. (s. f.). Polypropylene (PP) - Types, properties, uses & structure.
<https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polypropylene-pp-plastic>
- Oncescu, V., O'Dell, D., & Erickson, D. (2013). Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva. *Lab on a Chip*, 13(16), 3232. doi:10.1039/c3lc50431j
- Ong, E. O., Gilkes, N. R., Warren, R. B., Miller, R. F., & Kilburn, D. G. (1989). Enzyme Immobilization Using the Cellulose-Binding Domain of a Cellulomonas Fimi Exoglucanase. *Nature Biotechnology*, 7(6), 604-607. <https://doi.org/10.1038/nbt0689-604>
- OPS. (s. f.). Enfermedad crónica del riñón. Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-cronica-rinon>
- Ortega, F. (2006). BIOSENSORES Y BIOCHIPS: HERRAMIENTAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA TERAPÉUTICA. En ranf. <https://www.ranf.com/wp-content/uploads/academicos/discursos/numero/fidel.pdf>
- Ortega, G. D. (2018). Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos del metabolismo - 2a edición. ERGON.
- Ostermann, M., Zarbock, A., Goldstein, S. L., Kashani, K., Macedo, E., Murugan, R., Bell, M., Forni, L. G., Guzzi, L., Joannidis, M., Kane-Gill, S. L., Legrand, M., Mehta, R. L., Murray, P. T., Pickkers, P., Lippi, G., Prowle, J. R., Ricci, Z., Rimmelé, T., . . . Kellum, J. A. (2020). Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference. *JAMA network open*, 3(10), e2019209. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.19209>
- Ostojic, S. M. (2021). Dietary creatine and kidney function in adult population: NHANES 2017–2018. *Food Science and Nutrition*, 9(4), 2257-2259. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2200>
- Otero González, A. (2011). Envejecimiento y función renal. Mecanismos de predicción y progresión. *Nefrología*, 2(5). <https://doi.org/10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Jul.11085>



- Ou, M., Song, Y., Li, S., Liu, G., Jia, J., Zhang, M., ... Yu, C. (2015). LC-MS/MS Method for Serum Creatinine: Comparison with Enzymatic Method and Jaffe Method. *PLOS ONE*, 10(7), e0133912. doi:10.1371/journal.pone.0133912
- Ozkan, S. A., Uslu, B., & Sezgintürk, M. K. (2022). *Biosensors: Fundamentals, Emerging Technologies, and Applications*. CRC Press.
- Palintest. (2023, 28 septiembre). Ammonia Nessler Test Method, Technical Information - Palintest. [https://www.palintest.com/tech-info-sheet/ammonia-nessler-test-method-technical-information/#:~:text=Nessler's%20reagent%20\(potassium%20tetraiodomercurate%20\(II,to%20adding%20the%20Nessler%20reagent.](https://www.palintest.com/tech-info-sheet/ammonia-nessler-test-method-technical-information/#:~:text=Nessler's%20reagent%20(potassium%20tetraiodomercurate%20(II,to%20adding%20the%20Nessler%20reagent.)
- Parrales, D. H. R., Batallas, K. M. B., & Vélez, B. G. R. (2023). Litiasis renal en pacientes con diabetes y la relación con la acidez de la orina. *MQRInvestigar*, 7(1), 468-487. <https://doi.org/10.56048/mqr20225.7.1.2023.468-487>
- Patel, V. B., Preedy, V. R., & Rajendram, R. (2023). *Biomarkers in Toxicology*. Springer.
- Pearce, J. M. (2014). *Digital Designs and Scientific Hardware*. En Elsevier eBooks (pp. 165-252). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410462-4.00006-8>
- Perales-Montilla, C. M., García-León, A., & Reyes-del Paso, G. A. (2012). Predictores psicosociales de la calidad de vida en pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento de hemodiálisis. In *Nefrología (Madrid)* (Vol. 32, pp. 622–630). scieloes
- Perazzi, Beatriz; Angerosa, Margarita (2011). Creatinina en sangre: calidad analítica e influencia en la estimación del Índice de Filtrado Glomerular *Acta Bioquímica Clínica Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina Latinoamericana*, vol. 45, núm. 2, pp. 265-272
- Pérez-Sánchez, L., Casanova, A. G., & Morales, A. (2019). Biomarcadores de nefrotoxicidad capaces de identificar pacientes oncológicos en riesgo de desarrollar daño renal. *FarmaJournal*, 4(2), 41-50. <https://doi.org/10.14201/fj2019424150>
- Perrone, R. D., Madias, N. E., & Levey, A. S. (1992). Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clinical chemistry*, 38(10), 1933–1953.



- Persaud, N. (2020). CKD a Leading Cause of Morbidity and Mortality Worldwide. *Renal and Urology News*.
<https://www.renalandurologynews.com/home/news/nephrology/chronic-kidney-disease-ckd/ckd-a-leading-cause-of-morbidity-and-mortality-worldwide/>
- Pierre, S. J., Thies, J. C., Duréault, A., Cameron, N. R., Van Hest, J. C. M., Carette, N., Michon, T., & Weberskirch, R. (2006). Covalent Enzyme Immobilization onto Photopolymerized Highly Porous Monoliths. *Advanced Materials*, 18(14), 1822-1826. <https://doi.org/10.1002/adma.200600293>
- Pinheiro, P. (2022). Creatinina y urea: qué son y valores normales | MD.Saúde. MD Saúde. <https://www.mdsaude.com/es/nefrologia-es/creatinina-y-urea/>
- Polanco-Flores, Nasser A.. (2019). Chronic renal disease in Mexico: A preventive uncontrolled epidemic. *Revista médica del Hospital General de México*, 82(4), 194-197. Epub 06 de septiembre de 2021. <https://doi.org/10.24875/hgmx.m19000030>
- Ponnal, R. P., Wood, J. D., Gill, B. D., Bergonia, C. A., Longstaff, W. M., Slabbert, V., Bainbridge-Smith, L., & Crawford, R. H. (2021). Colorimetry of dairy products. *International Dairy Journal*, 113, 104886. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104886>
- Post, A., Tsikas, D., & Bakker, S. J. L. (2019). Creatine is a Conditionally Essential Nutrient in Chronic Kidney Disease: A Hypothesis and Narrative Literature Review. *Nutrients*, 11(5), 1044. <https://doi.org/10.3390/nu11051044>
- Prakash, S., Pinti, M., & Bhushan, B. (2012). Theory, fabrication and applications of microfluidic and nanofluidic biosensors. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 370(1967), 2269-2303. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0498>
- Prickril, B., & Rasooly, A. (Eds.). (2017). *Biosensors and Biodetection. Methods in Molecular Biology*. doi:10.1007/978-1-4939-6911-1
- Puente, C., Sánchez-Domínguez, M., Brosseau, C. L., & López, I. (2020). Silver-chitosan and gold-chitosan substrates for surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS):



- Effect of nanoparticle morphology on SERS performance. *Materials Chemistry and Physics*, 124107. doi:10.1016/j.matchemphys.2020.124107
- Punekar, N. (2018). *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Springer.
- Qian, S., Cui, Y., Cai, Z., & Li, L. (2022). Applications of smartphone-based colorimetric biosensors. *Biosensors And Bioelectronics*: X, 11, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100173>
- Radiologyinfo [Radiological Society of North America (RSNA) and American College of Radiology (ACR)]. (2022). Renal Ultrasound. [Radiologyinfo.org](https://www.radiologyinfo.org/en/info/ultrasound-renal). <https://www.radiologyinfo.org/en/info/ultrasound-renal>
- Rajasulochana, P., Ganesan, Y., Kumar, P. S., Mahalaxmi, S., Tasneem, F., Ponnuchamy, M., & Kapoor, A. (2022). Paper-based microfluidic colorimetric sensor on a 3D printed support for quantitative detection of nitrite in aquatic environments. *Environmental Research*, 208, 112745. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112745>
- Rebelo, T. S. C. R., Pereira, C. M., Sales, M. G. F., Noronha, J. P., Costa-Rodrigues, J., Silva, F., & Fernandes, M. H. (2014). Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 850, 26–32. doi:10.1016/j.aca.2014.08.005
- Reena, A., Karpagavalli, S., Rajendran, L., Manimegalai, B., & Swaminathan, R. (2023). Theoretical analysis of putrescine enzymatic biosensor with optical oxygen transducer in sensitive layer using Akbari–Ganji method. *International Journal of Electrochemical Science*, 18(5), 100113. <https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100113>
- Ren, X. D., Liu, Q. S., Feng, H., & Yin, X. Y. (2014). The Characterization of Chitosan Nanoparticles by Raman Spectroscopy. *Applied Mechanics and Materials*, 665, 367–370. doi:10.4028/www.scientific.net/amm.665.367
- Ren, Y. (2020). *Advances in Microfluidic Technologies for Energy and Environmental Applications*. https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/43843/external_content.pdf?sequence=1#page=73



- Reyes É, Martín J, Yevenes I, Neira M, Palma P, Gordan V, *et al.* (2012). Actividad y efectos de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biopelícula oral humana. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*; 23(2): 343-352.
- Reyes, L. A., Soto, M. A. R., Olvera, J. A. O., & Díaz-Sánchez, Á. G. (2016). Aspectos estructurales y mecánicos de la enzima ureasa y sus proteínas accesorias. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/316793402_Aspectos_estructurales_y_mecanisticos_de_la_enzima_ureasa_y_sus_proteinas_accesorias
- RIKITAKE, K., OKA, I., ANDO, M., YOSHIMOTO, T., & TSURU, D. (1979). Creatinine Amidohydrolase (Creatininase) from *Pseudomonas putida*: ePurification and Some Properties1. *The Journal of Biochemistry*, 86(4), 1109–1117. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132605
- Rimes-Stigare, C., Ravn, B., Awad, A., Torlén, K., Martling, C.-R., Bottai, M., ... Bell, M. (2018). Creatinine- and Cystatin C-Based Incidence of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Disease in AKI Survivors. *Critical Care Research and Practice*, 2018, 1–8. doi:10.1155/2018/7698090
- Robles-Osorio, M. L., Sabath-Silva, E., & Sabath, E. (2015). Arsenic-mediated nephrotoxicity. *Renal Failure*, 37(4), 542–547. doi10.3109/0886022x.2015.101341
- Rocchitta, G. G. M., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M. I., Fiore, V., Manetti, R., & Serra, P. A. (2016). Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors*, 16(6), 780. <https://doi.org/10.3390/s16060780>
- Rodríguez-Avalos, R. (2019). SUPLEMENTACION CON CREATINA Y EVALUACION DE LA FUNCION RENAL MEDIANTE LA CREATININA Y LA CISTATINA C [TRABAJO DE FIN DE GRADO]. Universidad de La Laguna.
- Romero-Salas, I. M., Ávila-Camacho, F. J., Melendez-Ramirez, A., & Stein-Carrillo, J. M. (2021). Predicción de niveles de pH urinario en pacientes con recurrencia de litiasis renal utilizando Deep Learning. REUNIÓN INTERNACIONAL DE OTOÑO EN



COMUNICACIONES, COMPUTACIÓN, ELECTRÓNICA, AUTOMATIZACIÓN
Y EXPOSICIÓN INDUSTRIAL.

https://www.researchgate.net/publication/356911728_IEEE-

[Prediccion_de_niveles_de_pH_urinario_en_pacientes_con_recurrencia_de_litiasis_renal_utilizando_Deep_Learning](#)

Rosero-Oñate, A., Zambrano-Espinel, J. V., & Zambrano-Villamar, A. D. (2023, 14 marzo).

“Proteínas séricas y concentración de electrolitos en pacientes con insuficiencia renal crónica”. <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/4963>

Roymaplast. (s. f.). Physical and chemical properties of polypropylene.

<http://roymaplast.com/en/propiedades-fisicas-y-quimicas-del-polipropileno/>

Rule, A. D., Larson, T. S., Bergstralh, E. J., Slezak, J. M., Jacobsen, S. J., & Cosio, F. G.

(2004). Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Annals of internal medicine*, 141(12), 929–937. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-141-12-200412210-00009>

Sadani, K., Nag, P., Thian, X. Y., & Mukherji, S. (2022). Enzymatic optical biosensors for

healthcare applications. *Biosensors And Bioelectronics: X*, 12, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100278>

Safari, J., Azizi, F., & Sadeghi, M. (2015). Chitosan nanoparticles as a green and renewable

catalyst in the synthesis of 1,4-dihydropyridine under solvent-free conditions. *New Journal of Chemistry*, 39(3), 1905–1909. doi:10.1039/c4nj01730g

Sahu, S. C. (2022). Genomic and Epigenomic Biomarkers of Toxicology and Disease:

Clinical and Therapeutic Actions. John Wiley & Sons.

Sakhuja, A. (2021). Novel Biomarkers of Kidney Function: Introduction and Overview,

Characteristics of an Ideal Marker for Kidney Disease, Biomarkers of Acute Kidney Injury. [https://emedicine.medscape.com/article/1925619-](https://emedicine.medscape.com/article/1925619-overview#:~:text=Serum%20creatinine%20remains%20the%20most,%2C%20amp)

[overview#:~:text=Serum%20creatinine%20remains%20the%20most,%2C%20amp%20utations%2C%20hydration%20status\).](#)



- Santos-Damião, C. S. (2019). Biophysical Characterization of Sarcosine Oxidase - Effect of Physical and Chemical Parameters on Sarcosine Oxidase Activity [Monografía de maestría]. Universidad de Lisboa.
- SANMETAL. (s. f.). Division Termoplásticos: Polipropileno - PP. <https://www.sanmetal.es/productos/termoplasticos/polipropileno-pp/18>
- Savia. (s. f.). Urea alta en análisis: ¿qué significa? - Salud Savia. Salud Savia. <https://www.saludsavia.com/contenidos-salud/articulos-especializados/urea-alta-en-analisis-que-significa-y-como-tratarla>
- Schoenmakers, C. H. H., Kuller, T., Lindemans, J., & Blijenberg, B. G. (1993). Automated Enzymatic Methods for Creatinine Measurement with Special Attention to Bilirubin Interference. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 31(12). doi:10.1515/cclm.1993.31.12.861
- Secretaria de Salud. (2017). Enfermedades renales. salud.edomex.gob.mx. <https://salud.edomex.gob.mx/cevece/docs/tripticos/2017/Semana%2010.pdf>
- Seki, M., Nakayama, M., Sakoh, T., Yoshitomi, R., Fukui, A., Katafuchi, E., Tsuda, S., Nakano, T., Tsuruya, K., & Kitazono, T. (2019). Blood urea nitrogen is independently associated with renal outcomes in Japanese patients with stage 3–5 chronic kidney disease: a prospective observational study. *BMC Nephrology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1306-1>
- Senthamizhan, A., Balusamy, B., & Uyar, T. (2020). Recent progress on designing electrospun nanofibers for colorimetric biosensing applications. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 13, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.08.002>
- Serafín, V., Hernández, P. E., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2013). Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode. *Electrochimica Acta*, 97, 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.03.005>



- Serna-Cock, L., Arenas, A. L. C., & Aponte, A. A. (2009). Use of Enzymatic Biosensors as Quality Indices: A Synopsis of Present and Future Trends in The Food Industry. *SciELO*, 69(2). <https://doi.org/10.4067/s0718-58392009000200017>
- Shaba, P. J., Musa, D. A., Egwim, E. C., & Uthman, A. (2023). Function of Urease in Plants with Reference to Legumes: A Review. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/369734241_Function_of_Urease_in_Plants_with_Reference_to_Legumes_A_Review
- Shen, C. (2018). *Diagnostic Molecular Biology*. Academic Press.
- Shen, L., Hagen, J. A., & Papautsky, I. (2012). Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. *Lab on a Chip*, 12(21), 4240–4243. <https://doi.org/10.1039/c2lc40741h>
- Shi, Y., Yang, Y., Kan, J., Mu, S., & Li, Y. (1997). Bioelectrochemical properties of sarcosine oxidase immobilized in a polypyrrole film. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(7), 655–659. doi:10.1016/s0956-5663(97)00020-1
- Siew, E. D., & Davenport, A. (2015). The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail? *Kidney International*, 87(1), 46-61. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.293>
- Siew, E. D., Ware, L. B., & Ikizler, T. A. (2011). Biological Markers of Acute Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(5), 810-820. <https://doi.org/10.1681/asn.2010080796>
- Sigma. (1996). Enzymatic Assay of Creatinase. En sigmaaldrich.com. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/288/786/creatinase.pdf>
- Sigma-Aldrich. (2013). Urease, Type C-3 from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean). En sigmaaldrich.com. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/397/624/u0251dat.pdf>
- Siregar, M. J. (2022). Recent Technology for Recycling of Used Diapers Waste. *International journal of innovation in Engineering*, 2(2).



Sistemas de TV. (s. f.). Apuntes de colorimetría. En ulpgc.
<https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/8/8064/colorimetria.pdf>

Socrates, G. (2001). Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and Charts. Wiley.

Soda, Y., & Bakker, E. (2019). Quantification of Colorimetric Data for Paper-Based Analytical Devices. *ACS Sensors*, 4(12), 3093-3101.
<https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01802>

Song, Y., Wei, W., & Qu, X. (2011). Colorimetric biosensing using smart materials. *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla.), 23(37), 4215–4236.
<https://doi.org/10.1002/adma.201101853>

Sorachim. (2021, noviembre 10). Creatinase from Microorganism.
<https://sorachim.com/product/creatinase-2/>

Stevens, L. A., Coresh, J., & Levey, A. S. (2008). CKD in the Elderly—Old Questions and New Challenges: World Kidney Day 2008. *American Journal of Kidney Diseases*, 51(3), 353-357. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.01.009>

Stevens, P. E., & Levin, A. (2013). Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease: Synopsis of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 Clinical Practice Guideline. *Annals of Internal Medicine*, 158(11), 825. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007>

Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in Hiv and Aids*, 5(6), 463-466. <https://doi.org/10.1097/coh.0b013e32833ed177>

Sugita, O., Uchiyama, K., Yamada, T., Sato, T., Okada, M., & Takeuchi, K. (1992). Reference Values of Serum and Urine Creatinine, and of Creatinine Clearance by a New Enzymatic Method. *Annals of Clinical Biochemistry*, 29(5), 523-528.
<https://doi.org/10.1177/000456329202900506>

Sujoy, B., & Aparna, A. (2013). POTENTIAL CLINICAL SIGNIFICANCE OF UREASE ENZYME. En *European Scientific Journal*.
<https://core.ac.uk/download/pdf/236406507.pdf>



- Suzuki, H. (1994). Sarcosine oxidase: structure, function, and the application to creatinine determination. *Amino Acids*, 7(1), 27–43. doi:10.1007/bf00808444
- Syme, N. R., Stevens, K. J., Stirling, C., McMillan, D. C., & Talwar, D. (2020). Clinical and Analytical Impact of Moving from Jaffe to Enzymatic Serum Creatinine Methodology. *The journal of applied laboratory medicine*, 5(4), 631-642. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa053>
- Taal, M. W., & Brenner, B. M. (2006). Predicting initiation and progression of chronic kidney disease: Developing renal risk scores. *Kidney International*, 70(10), 1694-1705. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001794>
- Tabata, M., Totani, M., & Endo, J. (1992). Coimmobilized enzyme columns in determining serum creatinine using creatininase, creatinase and sarcosine oxidase by flow-injection analysis and chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 262(2), 315–321. doi:10.1016/0003-2670(92)80069-j
- Tabeling, P. (2005). *Introduction to Microfluidics*. OUP Oxford.
- Tamayo, Juan; Lastir, H. S. (2016). *La enfermedad renal crónica en México, Hacia una política nacional para enfrentarla*.
- Tang, J., Guo, Y., & Zhang, J. (2023). Colorimetry characteristics and color contribution of fluorescence in natural Cr-containing spinel. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29675-w>
- Tang, T.-Y., Wen, C.-J., & Liu, W.-H. (2000). Expression of the creatininase gene from *Pseudomonas putida* RS65 in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 2–6. doi:10.1038/sj.jim.2900753
- Tietz, N. W., Burtis, C. A., & Ashwood, E. R. (1994). *Tietz textbook of clinical chemistry*. Saunders.
- Tong, Y., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., & Wang, W. (2014). Efficient improvement on stability of sarcosine oxidase via poly-lysine modification on enzyme surface. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 140–146. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.015



- Torres Zamudio, Cesar. (2003). Insuficiencia renal crónica. *Revista Medica Herediana*, 14(1), 1-4. Recuperado en 12 de mayo de 2023, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2003000100001&lng=es&tlng=es
- Torres-Rodríguez, J. M., Alvarado-Ramírez, E., & Gutiérrez-Gallego, R. (2008). Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. *Revista Iberoamericana De Micología*, 25(1), 27-31. [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70007-x](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70007-x)
- Tree-udom, T., Wanichwecharungruang, S. P., Seemork, J., & Arayachukeat, S. (2011). Fragrant chitosan nanospheres: Controlled release systems with physical and chemical barriers. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1602–1609. doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.074
- Trinh, K. L. (2022). Microfluidic Biosensors for Point-of-Care Nucleic Acid Amplification Tests. *Biosensors*, 13(1), 5. <https://doi.org/10.3390/bios13010005>
- Vaidya, V. S., & Bonventre, J. V. (2010). Biomarkers: In Medicine, Drug Discovery, and Environmental Health. John Wiley & Sons.
- Vanholder, R., Gryp, T., & Glorieux, G. (2018). Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research). *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 33(1), 4–12. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx039>
- Vassiliou, S., Grabowiecka, A., Kosikowska, P., Yiotakis, A., Kafarski, P., & Berlicki, Ł. (2008). Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Organophosphorus Inhibitors of Bacterial Ureases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(18), 5736–5744. doi:10.1021/jm800570q
- Veenstra, T. D. (2010). Proteomics for Biomarker Discovery. *Biomarkers*, 25–46. doi:10.1002/9780470918562.ch3



- Vega, J., & Huidobro E., J. P. (2019). Efectos en la función renal de la suplementación de creatina con fines deportivos. *Revista Médica Chile*.
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v147n5/0717-6163-rmc-147-05-0628.pdf>
- Wang, M., Zi, G., Liu, J., Song, Y., Zhao, X., Wang, Q., & Zhao, T. (2021). Self-Powered Biosensor for Specifically Detecting Creatinine in Real Time Based on the Piezo-Enzymatic-Reaction Effect of Enzyme-Modified ZnO Nanowires. *Biosensors*, 11(9), 342. <https://doi.org/10.3390/bios11090342>
- Wang, X., Sun, X., Xu, Z., Pan, W., Yu, G., & Wang, J. (2020). An ultrasmall chitosan nanosphere encapsulating carbon dots and rhodamine B as a ratiometric probe for the determination of Hg²⁺. *Microchimica Acta*, 187(12). doi:10.1007/s00604-020-04627-7
- Wang, Y., Ma, X., Zhao, W., Jia, X., Kai, L., & Xu, X. (2006). Study on the creatinase from *Paracoccus* sp. strain WB1. *Process Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.009>
- Waterborg, J. H., & Matthews, H. R. (1994). The Lowry Method for Protein Quantitation. *Basic Protein and Peptide Protocols*, 1–4. doi:10.1385/0-89603-268-x:1
- Westland, S. (2001). Qué es CIE. Libro electrónico Faud.
<https://tgd1libroelectronico.faud.unsj.edu.ar/wp-content/uploads/2021/02/5-2CIE.pdf>
- WHO. (1993). Biomarkers and Risk Assessment: 0 Concepts and Principles. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39037/9241571551-eng.pdf>
- Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews*, 80(3), 1107–1213. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.1107
- Yadav, S. K., Devi, R., Bhar, P., Singhla, S. K., & Pundir, C. S. (2012). Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine. *Enzyme and microbial technology*, 50(4-5), 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.008>



- Yang, Y., & Mu, S. (1996). The bioelectrochemical response of the polyaniline sarcosine oxidase electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 415(1-2), 71–77. doi:10.1016/s0022-0728(96)04702-x
- Yang, Y., Yang, N., Zheng, C., Shao, Z., *Polym. Eng. Sci.* 2022, 62(1), 201. <https://doi.org/10.1002/pen.25844>
- Ye, S., Feng, S., Huang, L., & Bian, S. (2020). Recent Progress in Wearable Biosensors: From Healthcare Monitoring to Sports Analytics. In *Biosensors* (Vol. 10, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/bios10120205>
- Yetisen, A. K., Akram, M. S., & Lowe, C. R. (2013). Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12), 2210. doi:10.1039/c3lc50169h
- Yoshimoto T, Oka I, Tsuru D (junio de 1976). «Purification, crystallization, and some properties of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*». *J. Biochem.* 79 (6): 1381-3
- Yu, L., & Li, N. (2019). Noble Metal Nanoparticles-Based Colorimetric Biosensor for Visual Quantification: A Mini Review. *Chemosensors*, 7(4), 53. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7040053>
- Zhao, V. X. T., Wong, T. I., Zheng, X. X., Tan, Y. N., & Zhou, X. (2020). Colorimetric biosensors for point-of-care virus detections. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.10.002>
- Zhao, X., Lu, C. T., Yang, S., Ni, R., Peng, T., & Zhang, J. (2022). Synthesis of N, N, n-trimethyl chitosan-based nanospheres for the prolonged release of curcumin. *Food hydrocolloids for health*, 2, 100092. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100092>
- Zheng, X., Min, G., Wu, L., Lü, X., Qi, L., Zhong, H., Lu, Y., Zhang, Y., & Zhang, X. (2023). Ceftazidime-assisted synthesis of ultrasmall chitosan nanoparticles for biofilm penetration and eradication of *pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40653-0>



- Zhou, M., Yang, M., & Zhou, F. (2014). Paper based colorimetric biosensing platform utilizing cross-linked siloxane as probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.065>
- Zhou, Y., Yin, H., Meng, X., Xu, Z., Fu, Y., & Ai, S. (2012). Direct electrochemistry of sarcosine oxidase on graphene, chitosan and silver nanoparticles modified glassy carbon electrode and its biosensing for hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta*, 71, 294–301. doi:10.1016/j.electacta.2012.04.014
- Zhu, D., Liu, B., & Wei, G. (2021). Two-Dimensional Material-Based Colorimetric Biosensors: A Review. *Biosensors*, 11(8), 259. <https://doi.org/10.3390/bios11080259>
- Zimmer, Marc (1 de abril de 2000). «Molecular Mechanics Evaluation of the Proposed Mechanisms for the Degradation of Urea by Urease». *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 17 (5): 787-797.
- Zopfi-Rubio, A. R. (2019). Guía de Procedimiento de Determinación de pH en Orina. En Ministerio de Salud. <https://www.insnsb.gob.pe/docs-trans/resoluciones/archivopdf.php?pdf=2019/GP%20038%20-Determinaci%C3%B3n%20de%20pH%20en%20OrinaF.pdf>
- Zotta, E., Ochoa, F., Yeyati, N. L., & Ibarra, C. (2009). El manejo de la urea y su mecanismo de adaptación durante la enfermedad renal. *Nefrología, diálisis y trasplante*. <https://www.revistarenal.org.ar/index.php/rndt/article/download/323/324>