



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

**MULTI-SENSOR COLORIMÉTRICO NO
INVASIVO PARA DETECCIÓN DE
BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN BIOMÉDICA

PRESENTA:

CRISTIAN EDUARDO FLORES ARREOLA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN DE DIOS GALINDO DE LA ROSA

Campus Aeropuerto, Qro. Mex., 2024





Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Multi-sensor colorimétrico no invasivo para detección
de biomarcadores de daño renal

por

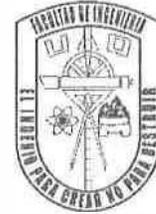
Cristian Eduardo Flores Arreola

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGLIN-272208



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Especialidad en Ingeniería Biomédica



“Multi-sensor colorimétrico no invasivo para detección de biomarcadores de daño renal”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
INGENIERO EN BIOMÉDICA

Presenta:

Cristian Eduardo Flores Arreola

Dirigido por:

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa
Presidente

Dra. Vanessa Vallejo Becerra
Secretario

Dra. Alejandra Álvarez López
Vocal

Dr. Carlos Andrés Pérez Ramírez
Sinodal

Firma

Firma

Firma

Firma

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) es una condición clínica considerada como la enfermedad crónica con menor atención médica, sin embargo, representa un problema de salud pública, psicológica y social por su carácter epidémico, su tasa de morbilidad, mortalidad y el impacto en las finanzas de las instituciones y la economía de los pacientes y sus familias. En México los datos son alarmantes, en 2017 se reportó una prevalencia del 12.2%, es decir, alrededor de 14.5 millones de mexicanos tenía esta enfermedad y este mismo año, fue la segunda causa de muerte. Además, la enfermedad es clínicamente asintomática lo que dificulta el diagnóstico, la evaluación y el tratamiento de los pacientes.

Es por ello por lo que la Academia Nacional de Medicina y otras instituciones del sector salud, apuestan a la innovación para frenar esta patología. Por ende, este estudio se centra en el desarrollo de un método no invasivo, sensible y multi analítico para la detección de biomarcadores de daño renal utilizando un enfoque multi-sensor colorimétrico. Este enfoque propuesto combina múltiples técnicas como la inmovilización enzimática, dispositivos microfluídicos, colorimétricas y análisis de imagen para detectar un sistema de biomarcadores específicos en muestras biológicas, como la orina. con este enfoque se utilizan las propiedades químicas y ópticas del cambio de color en presencia de biomarcadores específicos asociados con el daño renal. Todas estas ventajas del desarrollo de esta investigación ofrecen una herramienta con un gran potencial para el desarrollo de dispositivos sobresalientes para su aplicación en entornos clínicos y de atención médica para la detección temprana de la ERC.

Palabras claves: biomédica; biosensores; inmovilización de enzimas; colorimetría; procesamiento de imágenes; biomarcadores; daño renal.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is a clinical condition considered to be the chronic disease with the least medical attention, however, it represents a public health, psychological, and social issue due to its epidemic nature, its morbidity and mortality rate, and its impact not only on the finances of public institutions but also on the economy of patients and their families. In Mexico, the statistical data is alarming, in 2017 a prevalence of 12.2% was reported, which is around 14.5 million of people had this disease and that year was also the second leading cause of death. In addition, the disease is clinically asymptomatic, which makes it difficult to diagnose, assess, and treat patients on time.

This is why the National Academy of Medicine and other health sector institutions are betting on innovation to curb this pathology. Therefore, this study focuses on the development of a non-invasive, sensitive, and multi-analytical method for the detection of renal damage biomarkers using a multi-sensor colorimetric approach. This proposed approach combines multiple techniques such as enzyme immobilization, microfluidic devices, colorimetry, and image analysis to detect a system of specific biomarkers in biological samples, such as urine. With this approach, the chemical and optical properties of the color change in the presence of specific biomarkers associated with renal damage are used. All these advantages mentioned on the development of this research offer a tool with a great potential for the development of outstanding devices for their application in clinical and healthcare settings for the early detection of CKD.

Keywords: [biomedicine](#); [biosensors](#); [enzyme immobilization](#); [colorimetry](#); [image processing](#); [biomarkers](#); [renal damage](#).

Dedicatoria

A mi madre Celinda Arreola Servín, quien ha sido una fuente constante de inspiración y apoyo incondicional, pues sin ella no lo habría logrado. Por su bendición y comprensión a lo largo de mi vida, han sido fundamentales en cada paso que he dado.

In Memoriam

En honor a mi abuela Teresa, su amor y bondad han dejado una huella permanente en mi vida. Cada página de esta tesis está impregnada con el amor de mi abuela.

Agradecimientos

Expreso mi profunda gratitud a mis padres Celinda Arreola y Alfredo Flores, que contribuyeron de diversas maneras para moldearme no solo mi ser, sino también mi persona y mi apreciación por la vida. Me enseñaste tantas lecciones valiosas y les debo todo lo que soy hoy en día

A mi hermano Carlos Flores, que me ha inspirado y me ha acompañado de diferentes maneras durante mi trayecto, que siempre me levante de mi continuo tropiezo, mi mayor compañero de aventuras, mi confidente y mi más grande amigo. Y a mis hermanos Lorena, Guadalupe, Alfredo, Diana, Viviana, Rubén, Susana y Brenda que hemos compartido risas, lágrimas, triunfos y desafíos. He aprendido el valor del esfuerzo, la perseverancia y el compromiso a través de sus experiencias compartidas y, su presencia ha sido un regalo invaluable, y cada momento compartido juntos ha enriquecido mi vida de formas inimaginables.

A mi amigo Luis Vega, por ser un pilar al principio de mi proceso académica y parte de mi vida, estoy eternamente agradecido.

A mi colega y amiga, la Ing. Andy Argueta, quien fue una fuente de apoyo con su ingenio, perspicacia y su actitud positiva que han enriquecido esta tesis. Estoy agradecido por haber tenido a alguien tan talentosa y dedicada en este viaje de investigación.

A mis amigos que la universidad y la vida me ha dado, los ingenieros Luis Jiménez, Johannes Martínez, Julio López y Lorissee Cobos que hemos creado recuerdos que atesoraré para siempre y estoy agradecido por cada momento que hemos compartido y por los muchos más que están por venir.

Un sincero agradecimiento a todos mis amigos y compañeros de la universidad y el laboratorio, especialmente a las ingenieras Mariely Vidal, Citlali Rosales, Pao Olvera, Cynthia Callejas, Kendra Góngora, Andrea Nieto y Sonia Aguillón. Por sus ideas, comentarios y discusiones que han enriquecido y contribuido enormemente en esta tesis.

A mis profesores, con especial cariño a mis asesores y sinodales de esta tesis: el Dr. Juan Galindo por compartir sus ideas innovadoras y su perspectiva en la investigación única, gracias por su amistad, generosidad, exigencia, presión y paciencia que me hicieron crecer enormemente en mi conocimiento y en mi persona; a la Dra. Alejandra Álvarez, la Dra. Vanessa Vallejo y el Dr. Carlos Pérez que generosamente compartieron su tiempo, experiencia y apoyo, enriqueciendo así esta tesis.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud al grupo de investigación BIOSENS, a vinculación de la facultad de Ingeniería y al Fondo para el Desarrollo del Conocimiento FONDEC-UAQ2022 (proyecto FIN202211) por el entorno y los recursos ofrecidos para llevar a cabo esta investigación, gracias por las oportunidades y el apoyo brindado.

*Poderoso Newton, iluminado Einstein, santo Hawking y Amitabha
Buda, iluminadnos con vuestra sabiduría y guíanos por el camino de
la verdad.*

Anónimo

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
3	JUSTIFICACIÓN	6
4	OBJETIVOS.....	8
4.1.1	Objetivo general.....	8
4.1.2	Objetivos específicos.....	8
5	HIPÓTESIS.....	9
5.1	Hipótesis	9
6	MARCO TEÓRICO	10
6.1	Enfermedad renal crónica.....	10
6.1.1	Etapas	11
6.1.2	¿Es posible tener enfermedad renal, aunque la eGFR sea normal?.....	14
6.1.3	Causas y factores de riesgo	14
6.1.4	Síntomas y complicaciones.....	16
6.1.5	Incidencia, prevalencia y mortalidad.....	17
6.1.6	ERC en México	19
6.1.6.1	Incidencia, prevalencia y mortalidad de la ERC en México.....	21
6.1.6.2	Carga financiera	24
6.1.7	Ciclo de la urea	28
6.2	Biosensores	30
6.2.1	características de un biosensor	38
6.2.2	Biomarcadores para daño renal	41
6.2.2.1	Urea	45
6.2.2.2	Creatinina.....	49
6.2.2.3	pH.....	52
6.2.3	Enzimas como biorreceptores en biosensores catalíticos.....	55
6.2.3.1	Creatininasa	55
6.2.3.2	Creatinasa	58
6.2.3.3	Sarcosina oxidasa.....	59
6.2.3.4	Ureasa.....	62
6.3	Inmovilización de enzimas	63
6.4	Biosensores microfluídicos colorimétricos	71

6.4.1	Colorimetría.....	75
6.4.1	Procesamiento de imágenes.	79
6.4.2	Dispositivos inteligentes destinados para el sector salud.	80
7	ANTECEDENTES.....	82
7.1	Dispositivos para daño renal	82
8	METODOLOGÍA.....	85
8.1	Síntesis y funcionalización de macromoléculas de quitosano:	85
8.1.1	Materiales	85
	El quitosano, Ácido acético, Hidróxido de sodio, Etanol 98%, Glutaraldehído, Solución tampón de fosfato (7.5 pH) y Agua desionizada se obtuvieron de Sigma Aldrich.	85
8.1.2	Método.....	85
8.2	Cararcterización fisicoquímicas de las macroesferas de quitasano.....	87
8.3	Fabricación de dispositivos microflúidico basado en papel filtro	87
8.4	Inmovilización de las enzimas.....	88
8.4.1	Materiales	88
8.4.2	Creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa	88
8.4.2.1	Método	88
8.4.3	Ureasa	89
8.4.3.1	Evaluación bioquímica	90
8.5	Pruebas de bioensayo de pH.....	91
8.6	Procesamiento de imagen para el análisis colorimétrico	92
9	ANÁLISIS Y RESULTADOS.....	94
9.1	Síntesis de macromoléculas de quitosano	94
9.2	Pruebas bioquímicas	97
9.2.1	Ensayo de actividad de la ureasa.....	97
9.2.1.1	Efectos del pH	97
9.2.1.2	Efectos de la temperatura	99
9.2.1.3	Estudio de acoplamiento enzimático de la ureasa en macromoléculas de quitosano	100
9.3	Procesamiento de imágenes y análisis colorimétrico	102
9.3.1	Creatinina	102
9.3.2	Creatina	109
9.3.3	Sarcosina	113
9.3.4	Urea.....	116

9.3.5	Límites de detección.....	120
9.3.6	Dispositivo microfluídico	121
9.3.6.1	Manipulación del Dispositivo.....	123
10	CONCLUSIÓN	125
11	PERSPECTIVAS Y TRABAJO A FUTURO	127
12	REFERENCIAS	128
13	ANEXO.....	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de biosensores portátiles capaces de detectar electrolitos y metabolitos en la sangre, sudor, saliva, etc. (J. Kim, 2018).....	1
Figura 2. ejemplo del impacto de COVID-19 en la investigación, en atención médica, hogares, edificios, ciudades, transporte y la industria (Umair et al., 2021).	3
Figura 3. Enfermedad renal crónica y fisiopatología (Akinnibosun et al., 2022).	15
Figura 4. Representación del ciclo de la urea (Yokoyama, 2021).	29
Figura 5. (a) Biosensores basados en transistores de efecto de campo para diagnóstico de COVID-19 en un PoC; este biosensor ofrece una respuesta en tiempo real (Science China Press, (Moabelo et al., 2021). (b) prueba colorimétrica nanoamplificada para el diagnóstico clínico de COVID-19 (Alafeef et al., 2021).	31
Figura 6. Ejemplos representativos de biosensores portátiles. A) Potenciostatos de bolsillo. B) Potenciostatos basados en teléfonos inteligentes. C) Glucómetro convencional (da Silva et al., 2017).....	33
Figura 7. Esquema básico de un biosensor mostrando sus tres etapas: bioreceptor, transductor y amplificador (Pandey & Malhotra, 2019).	35
Figura 8 Categorización de los biosensores. a) biosensores de detección directa. b) biosensores de detección indirecta (Rasooly & Herold, 2009).....	36
Figura 9. Estructura molecular de la urea; formula molecular $CO(NH_2)_2$; peso molecular 60,056 g/mol (National Center for Biotechnology Information, 2023).	46
Figura 10. Síntesis de urea durante el proceso de catabolismo de proteína y aminoácidos (Burtis et al., 2012).	47
Figura 11. Estructura molecular de creatinina (National Center for Biotechnology Information, 2023).....	49
Figura 12. Metabolismo de la creatina y la creatinina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000)....	50
Figura 13. Conversión creatinina – creatina (Beuth et al., 2003).	55
Figura 14. Hidrólisis de creatinina catalizada por creatinina amidohidrolasa (Berberich et al., 2005).....	56
Figura 15. sistema basado en tres enzimas, creatinina amidohidrolasa (CA), creatina amidinohidrolasa (CI) y sarcosina oxidasa (Sox) (Pundir, Kumar, et al., 2019).	57

Figura 16. Hidrólisis de creatina catalizada por creatinasa (Berberich et al., 2005).....	58
Figura 17. grupo guanidina de la molécula de creatina.	59
Figura 18. Hidrólisis de sarcosina catalizada por sarcosina oxidasa monomérica (Berberich et al., 2005).....	59
Figura 19. Reacción redox de sarcocina para producir especies de imina (Damião, 2019; Lahham et al., 2021).	60
Figura 20. Reacción global de hidrólisis de urea catalizada por la enzima ureasa (Svane et al., 2020).	62
Figura 21. Reacción general de la hidrólisis de la urea (Mazzei et al., 2020).....	62
Figura 22. Esquemas de las técnicas de inmovilización de enzimas más comunes. a) unión química. B) retención física (Sánchez-Ramírez et al., 2014).	67
Figura 23. μ PAD fabricado por fotolitografía para detectar glucosa y proteína. II) Esquema de las partes y áreas con los reactivos agregados. III) ensayos de glucosa y proteína desarrollados con el μ PAD (Martinez et al., 2007).....	73
Figura 24. Síntesis de macromoléculas de quitosano.	86
Figura 25. Microscopia electrónica de barrido.....	87
Figura 26. Diseño y corte del material para la fabricación de dispositivos microfluídico basado en papel filtro.	88
Figura 27. Inmovilización de enzimas creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa sobre un soporte de macroesferas de quitosano.	89
Figura 28. Inmovilización de la enzima ureasa sobre un soporte de macroesferas de quitosano.....	90
Figura 29. Esquema de metodología para las pruebas bioquímicas de la actividad de la enzima (método de Nessler).	91
Figura 30. Preparación de tinta universal de pH.	91
Figura 31. Adquisición de imagen y procesamiento de imagen para el análisis colorimétrico.	93
Figura 32. Macroesferas de quitosano.....	94

Figura 33. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las macromoléculas de quitosano reticuladas con glutaraldehído al 5%.	96
Figura 34. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima ureasa libre e inmovilizada.....	98
Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima ureasa libre e inmovilizada.....	99
Figura 36. Gráfico del porcentaje de acoplamiento de ureasa sobre plataforma de quitosano.....	100
Figura 37. (A) Ilustración esquemática de la reacción enzimática y cromogénica del sistema peroxidasa – o-dianisidina. (B) Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo.....	103
Figura 38. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de creatinina con diversas concentraciones (0-1.5 mM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de creatinina y las respuestas colorimétricas en el espacio. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatinina.	105
Figura 39. Ajuste lineal y análisis residual de valores colorimétricos de creatinina.	107
Figura 40. (A) Relación lineal entre la concentración de creatinina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatinina.....	108
Figura 41. Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo de creatina.....	110
Figura 42. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de creatina con diversas concentraciones (0-9 mM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de creatinina y las respuestas colorimétricas en el espacio RGB. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.	111
Figura 43. (A) Relación lineal entre la concentración de creatina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Relación lineal entre la concentración de creatina y las respuestas colorimétricas en el componente saturación (S). (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.	112

Figura 44. Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo de sarcosina.	113
Figura 45. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de sarcosina con diversas concentraciones (0-4 uM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el espacio RGB. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de sarcosina.	115
Figura 46. (A) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el componente saturación (S). (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.	116
Figura 47. Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo.....	117
Figura 48. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de urea con diversas concentraciones (0-200 uM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de urea y las respuestas colorimétricas en el espacio RGB. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de sarcosina.	118
Figura 49. (A) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el componente saturación (S). (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.	119
Figura 50. Prototipo del dispositivo microfluídico basado en papel que cuantifica cinco analitos simultáneamente. (a) Capa hidrofóbica superior. (b) Polímero que forman los microcanales. (c) Capa fluídica de papel de celulosa. (d) Capa hidrofóbica inferior.	122
Figura 51. Características del dispositivo microfluídico basado en papel.	122
Figura 52. Dispositivo de diagnóstico simple para usuarios finales generales sin experiencia técnica.	123
Figura 53. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr; (C) CMYK y (D) NTSC o YIQ del biomarcador de creatinina.	150
Figura 54. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr y (C) XYZ del biomarcador de creatinina.	151

Figura 55. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr; (C) CMYK y (D) XYZ del biomarcador de sarcosina.152

Figura 56. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr; (C) CMYK y (D) XYZ del biomarcador de urea.....153

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas de la Enfermedad Renal (American Kidney Fund, 2022).	12
Tabla 2. Las 10 causas principales de muerte en México y su cambio en el porcentaje entre 2009 y 2019 (Mexico Institute for Health Metrics and Evaluation, 2019).	20
Tabla 3 Fuentes principales de gastos para costear problemas de salud y una proyección para el año 2050 (México Institute for Health Metrics and Evaluation, 2019).	25
Tabla 4. Criterios ASSURED de la Organización Mundial de la Salud.....	32
Tabla 5. características más importantes de un biosensor.	39
Tabla 6. Características de los materiales del soporte o matriz.	65
Tabla 7. Principales categorías de inmovilización de enzimas.....	66
Tabla 8. Tipos de inmovilización de enzimas.....	68
Tabla 9. dispositivos POCT de creatinina populares y sus respectivas especificaciones.	83
Tabla 10. Límites de detección (LOD) para cada biomarcador en sus respectivos espacios de color.....	120

1 Introducción

Hoy en día, los dispositivos portátiles han adquirido popularidad debido a que pueden ser utilizados para medir las condiciones de salud y estado físico de la población en donde se puede controlar la frecuencia cardíaca, tomar presión arterial, seguimiento de calorías, conteo de pasos, etc., como se muestra en la Figura 1 (J. Kim, 2018; Koh et al., 2016). Con los avances de la tecnología de cámara avanzada y sofisticada de los teléfonos inteligentes y el conjunto en desarrollo de biosensores colorimétricos han surgido nuevas alternativas para leer los niveles de diferentes biomarcadores presentes en diferentes 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; Koh et al., 2016).

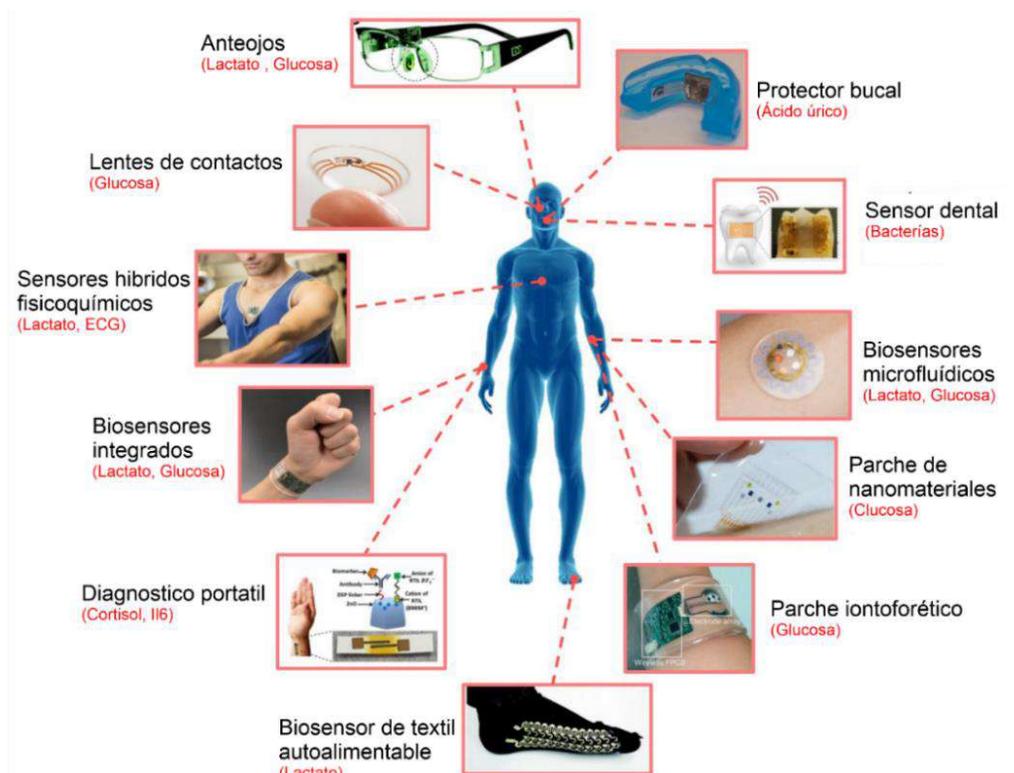


Figura 1. Tipos de biosensores portátiles capaces de detectar electrolitos y metabolitos en la sangre, sudor, saliva, etc. (J. Kim, 2018).

La determinación precisa de estos biomarcadores es una prueba existente en la mayoría de los laboratorios de emergencia, y es importante comprender y considerar las desventajas que existen en los estudios clínicos actuales, por ello el desarrollo de biosensores es prometedor a mejorar el proceso de análisis y presenta como una gran alternativa debido a que reduce el tiempo de detección, la cantidad de muestra, costos, teniendo una gran selectividad para detección de biomarcadores, entre otras (Cornell Universit, 2013; Koh et al., 2016).

La precisión analítica de los biosensores ha conducido a un crecimiento acelerado de la investigación y desarrollo de estos, además el impacto de la introducción de esta tecnología 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 por los propios pacientes con problemas de daño renal, evitando los procesos de análisis clínicos. Por tanto, la detección y monitoreo en tiempo real de biomarcadores como la creatinina, urea y creatina es de gran importancia para el control, prevención y diagnóstico de ciertos trastornos generados por problemas de daño renal, como los trastornos del ciclo de la urea que pueden causar hasta la muerte si no se detecta a tiempo (Ah Mew et al., 2003; Cornell Universit, 2013).

Estos trastornos del ciclo de la urea es el resultado de alteraciones en las funciones bioquímicas y fisiológicas durante el desarrollo de la insuficiencia renal en etapa terminal y es un problema común de los llamados errores metabólicos congénitos. Generalmente comienza con hiperamonemia y alteración del perfil de aminoácidos plasmáticos y urinarios y pueden aminorar o acumularse niveles nocivos de desechos como la urea y creatinina, y desequilibra la composición química de la sangre que pone en grave peligro la vida de los pacientes (Barmore et al., 2021; Gil Ortega, 2018). El mayor perfil de atención está presente en la sala metabólica pediátrica que corresponde aproximadamente al 60% de los casos con una alta tasa de mortalidad y una corta

esperanza de vida, consecuencia de déficits enzimáticos completos que conllevan a alteraciones en los sistemas biológicos y órganos (Crespo, 2018; Gutiérrez et al., 2003).

Los avances en la ingeniería y el campo de la investigación biomédica en los últimos años han beneficiado el análisis clínico para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica (ERC), teniendo un impacto significativo en el diseño y desarrollo de biosensores en el punto de atención mejorando las áreas de diagnóstico clínico y el control y monitoreo de enfermedades (Cooper & Cass, 2004).

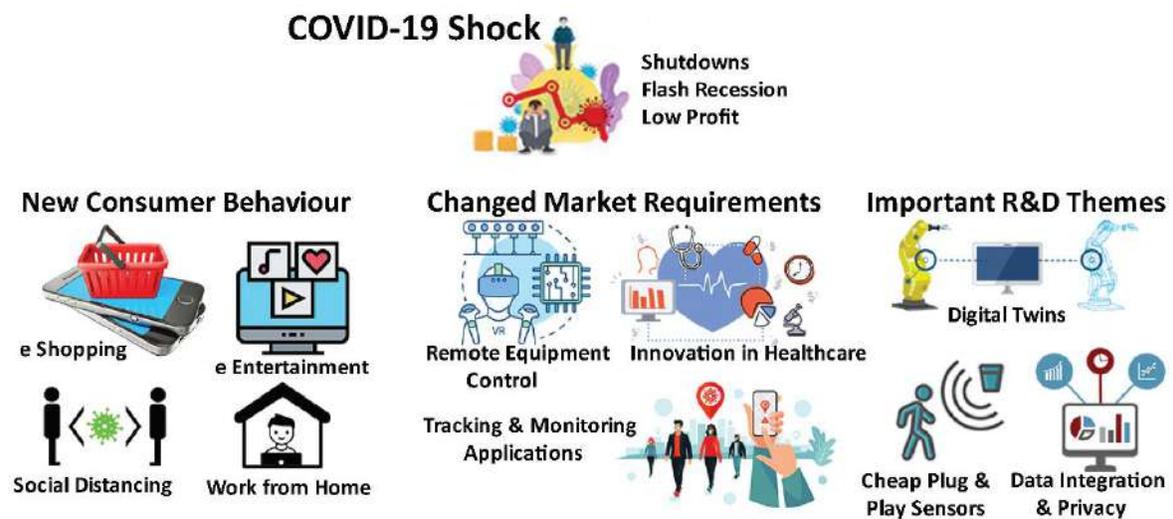


Figura 2. ejemplo del impacto de COVID-19 en la investigación, en atención médica, hogares, edificios, ciudades, transporte y la industria (Umair et al., 2021).

Tanto la comunidad científica, los sectores sanitarios y la industria han prestado una atención considerable a estos avances como antecedente de la pandemia por SARS-COVID-19 como se muestra en la Figura 2 (Umair et al., 2021). Esta pandemia ha resaltado tecnologías como las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que son rápidas, sensibles y confiables, sin embargo, limitadas al uso de un personal calificado y equipo de laboratorio, además de no ser totalmente accesible en diferentes comunidades. La velocidad y la profundidad de la pandemia creó desafíos sin precedentes para las sociedades y sector sanitario de salud a medida que la pandemia se prolongaba por el

mundo, sin embargo, esto ha puesto a la comunidad científica y la industria de tecnología biomédica en el centro del escenario con una demanda sin precedentes de pruebas de diagnóstico en el punto de atención. Estos acontecimientos impactaron en la tecnología biomédica, como el desarrollo de biosensores colorimétricos de flujo latera que son extremadamente rápidos, aportan resultados en solo 15 minutos y son confiables (Mak & Ho, 2022).

La aceptación de la tecnología emergente de diagnóstico con biosensores por el desenlace de la pandemia dependió en gran medida del costo, la portabilidad, la facilidad de uso y el tiempo de respuesta de dichos dispositivos (Higson, 2012; Mak & Ho, 2022). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció criterios bajo el acrónimo ASSURED para el diagnóstico de pruebas rápidas con biosensores con características de asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido /robusto, equipo mínimo o sin equipo y entregable (Mak & Ho, 2022).

Es por ello que en este trabajo se revisara los aspectos enzimáticos y bioquímicos de los biomarcadores específicos de los problemas de enfermedad renal, y desarrollar un biosensor microfluídico a nivel de multi-sensado, utilizando ensayos bioquímicos colorimétricos que permitan medir los niveles de urea y creatinina con interés clínico en pacientes con enfermedad renal. También se involucrarán técnicas de telemedicina, integrando procesamiento de imágenes con el uso de teléfonos inteligentes, 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 una anomalía de los riñones que causa daños estructurales en los riñones y de la disminución del funcionamiento de estos (Pereira et al., 2005). La National Kidney Foundation (NKF) a través de las guías de práctica clínica Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) propuso una definición y clasificación para la ERC en el año 2002, con los criterios esenciales que ayudan a estandarizar la comunicación médica actual sobre la ERC que fue respaldada por la organización global Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) en el 2012. La ERC se define como “una disminución de la función renal, expresada por un filtrado glomerular o por un aclaramiento de creatinina estimados < 60 ml/min en $1,73$ m², o como la presencia de daño renal de forma persistente durante al menos 3 meses” (Cabrera, 2004). La definición también facilita a identificar y enfocar la investigación en la mejora de los tratamientos y en el desarrollo de nuevos métodos de detección, para apoyar la prevención y el tratamiento oportunos de la ERC, mejorando la calidad de vida de los pacientes (Himmelfarb & Ikizler, 2019; Pereira et al., 2005).

La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las patologías de mayor impacto en la salud pública del país y en las últimas décadas, la prevalencia e incidencia de la ERC en México y a nivel global han aumentado progresivamente (Arreola et al., 2019). Las cifras de morbilidad y mortalidad son alarmantes; en México, es una de las principales causas de atención en hospitalización y en los servicios de urgencias (Méndez-Durán et al., 2010). En 2017, se reportó una prevalencia de ERC del 12.2 % y 51.4 muertes por cada 100 mil habitantes en México. En 2014, El gasto en salud anual medio por persona para esta patología se estimó en 8.966 dólares estadounidenses (USD) en la secretaria de Salud, y de 9.091 USD en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Además, hoy en día cuesta aproximadamente 800 USD al mes atender a un paciente que se encuentra en tratamiento de diálisis (Figuroa-Lara et al., 2016; GLOBAL HEALTH METRICS, 2018).

Es muy posible que en la pérdida de la función renal inicial en la ERC no presente ningún síntoma y las manifestaciones clínicas ocurren hasta una etapa avanzada de la afección, sin embargo, las alteraciones de biomarcadores causada por ERC pueden aminorar o aumentar niveles nocivos de desechos como: La urea, creatinina y el pH que pueden desencadenar a la composición química de la sangre y poner en grave peligro la vida de los pacientes. Al comprender los procesos de las vías bioquímicas del ciclo de la urea, y el diagnóstico de los biomarcadores involucrados en los procesos del ciclo de la urea o sus actividades secundarias, los ingenieros biomédicos pueden mejorar el método de sensado y diagnóstico clínico para identificar alteraciones de biomarcadores por medio de biosensores de los pacientes (Gutiérrez et al., 2003; Yokoyama, 2021).

3 Justificación

Con un amplio conocimiento sobre la tecnología emergente de biosensores de próxima generación, los biosensores de análisis portátiles y la telemedicina tendrán un gran impacto en un campo en rápido desarrollo. Por lo tanto, 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, etcétera y, proporcionar una mejor calidad de vida (Ye et al., 2020).

Uno de los objetivos de ingeniería biomédica en el desarrollo de biosensores aplicado en el entorno del proceso de análisis de laboratorio clínico es reducir costos, tiempo de análisis más rápidos y resultados clínicos más seguros; además reducir la complejidad del análisis de fluidos biológicos para facilitar y permitir que los pacientes realicen pruebas caseras con resultados fiables. En el desarrollo de estos biosensores se está incluyendo

cada vez más el uso de enzimas, y se consideran algunos parámetros y las características de rendimiento específicas en su mejoramiento como el costo (menor de \$10 USD por tira de detección), el tiempo de respuesta (menor de 1.5 minutos), el límite de detección ($\leq 10 \mu\text{M}$) y la vida útil mayor a 1 año (Lad et al., 2008).

Si bien es necesario seguir trabajando en esta dirección que incluyan los parámetros y las características anteriores, la tecnología actualmente desarrollada no parece ser adecuada para un solo biosensor para detectar urea en orina, sangre o sudor humanos sin diluir, por ende, las pruebas se realizan en laboratorios. Se informa en la literatura que la medición del nivel de urea en sangre u orina humana es clínicamente esencial, porque estos datos reflejan parcialmente el estado de la función renal. Otra molécula importante clínicamente significativa relacionada con los trastornos renales es la creatinina, que puede crear nuevas oportunidades para el diagnóstico de la enfermedad renal (Tietz et al., 1994).

Con el conjunto de un sistema de biosensores de multi-sensado basado en reacciones enzimáticas y gracias a la tecnología de cámara avanzada y sofisticada integradas en los teléfonos inteligentes, han surgido nuevas alternativas para leer los niveles de diferentes biomarcadores mediante el análisis de color utilizando procesos colorimétricos donde es posible detectar ópticamente los biomarcadores en una gota de plasma, sudor, saliva, lagrime u orina.

4 Objetivos

4.1.1 Objetivo general

Desarrollar un multi-sensor microfluídico colorimétrico no invasivo para la detección de creatinina, urea y pH para aplicación en diagnóstico de daño renal.

4.1.2 Objetivos específicos

- Desarrollar tintas cromogénicas de peróxido y pH para la fase colorimétrica de creatinina, creatina, sarcosina, urea y pH.
- Síntesis de macroesferas de quitosano por el método de precipitación y entrecruzamiento.
- Inmovilizar las enzimas de creatinina, creatina, sarcosina y urea sobre las macroesferas de quitosano.
- Caracterizar bioquímicamente las enzimas inmovilizadas.
- Construir curvas de calibración para detección de urea y creatinina por medio de procesamiento de imágenes para el método colorimétrico.
- Diseñar, construir y evaluar un prototipo microfluídico para multi-sensado colorimétrico de creatinina, creatina, sarcosina, urea y pH.

5 Hipótesis

5.1 Hipótesis

La inmovilización enzimática de creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa, peroxidasa y ureasa en plataformas de quitosano, además, añadiendo un indicador cromogénico podrá brindar una estabilidad y condición química para el desarrollo de un biosensor colorimétrico que permita un análisis cuantitativo por medio de técnicas colorimétricas con procesamiento de imagenología para el diagnóstico de biomarcadores de daño renal.

6 Marco teórico

6.1 Enfermedad renal crónica

Los riñones son un par de órganos ubicados en el retroperitoneo a ambos lados de la columna vertebral, en la parte baja de la espalda, llevan a cabo una gran variedad de funciones para el cuerpo, de las cuales la mayoría son esenciales para la vida. Una de las actividades esenciales del riñón es la capacidad de filtrar el plasma y reabsorber el filtrado de plasma con el fin de mantener la homeostasis hídrica y química y contribuir a la estabilidad hemodinámica, eliminando los desechos de los productos terminales de los procesos metabólicos y regulando el equilibrio de agua del cuerpo a través de la filtración y producción de orina; el producto de orina va a la vejiga y se elimina al orinar (McCauley et al., 2022; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2018).

La función de la excreción de los desechos metabólicos es de suma importancia para mantener los sistemas biológicos estables. La mayoría de estos productos metabólicos no tienen ninguna función en el cuerpo y en concentraciones altas son perjudiciales para la salud. Algunos de estos productos son la creatinina (derivada del metabolismo muscular esquelético), urea (derivada de las proteínas), ácido úrico (de los ácidos nucleicos), entre otros muchos (Eaton & Pooler, 2006). Los riñones también tienen la capacidad de producir hormonas que ayudan a controlar la presión arterial, regular la producción de vitamina D, producir glóbulos rojos y mantener los huesos fuertes, cuando se dañan los riñones, se alteran estas funciones y su función principal (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2018).

La enfermedad renal crónica (ERC) representa una carga económica y de salud global cada vez mayor, debido a la naturaleza interdisciplinaria de la enfermedad y a la falta y comprensión que existía de una definición precisa de la ERC. Una mayor conciencia para ralentizar la progresión de esta enfermedad, han llevado a restablecer los criterios de clasificación uniformes para la ERC y mejorar la comprensión de una terminología

uniforme y el reconocimiento temprano de la enfermedad (Pereira et al., 2005; Yang & He, 2020). La National Kidney Foundation (NKF) en su Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) desarrolló una definición uniforme para la ERC en el año 2002, que fue respaldada por la organización global Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) en el 2012. Esta definición proporciona fundamentos y criterios esenciales que ayudan a estandarizar la comunicación médica actual sobre la ERC, además enfatiza una mejor comunicación para el paciente. La definición también facilita a identificar y enfocar la investigación en la mejora de los tratamientos y en el desarrollo de nuevos métodos de detección, para apoyar la prevención y el tratamiento oportunos de la ERC, mejorando la calidad de vida de los pacientes (Himmelfarb & Ikizler, 2019; Pereira et al., 2005).

La ERC es una afección de los riñones y se define como anomalías en la estructura del riñón o de la función de este, presentes por más de tres meses, con complicaciones para la salud. Se caracteriza por la pérdida gradual y lenta de la función renal que persiste por este periodo de al menos 3 meses (Bombardieri & Bakris, 2011; Yang & He, 2020). La ERC afecta su función de filtración, por ende, el equilibrio de agua se altera y el filtrado de los desechos de la sangre se ve afectado, ocasionando que se acumulen o alteren sus niveles en el cuerpo, desarrollando complicaciones como enfermedades cardiovasculares, anemia, trastornos minerales y óseos y enfermedades del sistema nervioso (McCauley et al., 2022; Yang & He, 2020).

6.1.1 Etapas

En 2002, la NKF publicó las pautas de práctica clínica para la ERC, clasificándolas en 5 etapas establecidas en las guías K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative) como se muestra en la Tabla 1 (American Kidney Fund, 2022; Vaidya & Aeddula, 2022). Estas etapas se asocian de acuerdo con el resultado de la prueba analíticas de sangre del índice de filtración glomerular estimada (eGFR, por sus siglas en inglés) a fin de estimar la función de los riñones de filtrar los desechos y el exceso de líquido de la sangre, y así

facilitar el desarrollo de un plan de acción clínica para tratar la ERC (Pereira et al., 2005). Para los riñones con daño leves se clasifica con la etapa 1 y a medida que avanzan las etapas, el daño de los riñones es mayor y su función de filtración es menor o que los riñones dejen de funcionar completamente. La finalidad de la clasificación de las etapas de la ERC es tomar medidas para retardar el daño a los riñones y mantenerlos funcionando el mayor tiempo posible. (American Kidney Fund, 2022).

Tabla 1. Etapas de la Enfermedad Renal (American Kidney Fund, 2022).

<i>Etapas</i>	<i>Descripción</i>
<i>Etapa 1</i>	La ERC en esta etapa la eGFR es de 90 o mayor, presenta daños muy leves en los riñones y la función renal es normal, por lo que es posible que no tenga ningún síntoma. Se pueden presentar señales, como la presencia de proteínas en la orina.
<i>Etapa 2</i>	La ERC en etapa 2 aún se considera un daño renal temprano y significa que su eGFR se ha reducido en un rango de 60 y 89. Aun sus riñones siguen funcionando correctamente la mayor parte del tiempo y es posible que no se presenten síntomas, pero los riñones pueden presentar daños físicos más obvios y de igual forma, la presencia de proteínas en orina.
<i>Etapa 3</i>	En la Etapa 3, significa que tiene una eGFR de 30 a 59 y la pérdida de la función renal es moderada, los riñones dejan de funcionar como deberían, por ende, la filtración de los desechos y el exceso de líquido de la sangre pueden empezar a acumularse, causando otros problemas de salud, como presión arterial alta y enfermedades óseas. Se pueden presentar síntomas, como hinchazón en las manos y los pies, dolor de espalda, sentirse débil y cansado u orinar más o menos de lo normal.

En 2008, el Instituto Nacional de Salud y Excelencia Clínica (NICE, por sus siglas en inglés) subdividió la etapa 3 en dos subetapas según su eGFR, de 45 a 59 (etapa 3a) y de 30 a 44 (etapa 3b).

Etapa 4

En esta etapa, la ERC tiene una eGFR entre 15 y 29 con daños moderados a graves. Los riñones no funcionan adecuadamente y no tienen la suficiente capacidad de filtrar los desechos y el exceso de líquidos en la sangre, teniendo mayor posibilidad de sufrir un problema de salud, como presión arterial alta, anemia, enfermedades óseas y enfermedades del corazón. Esta etapa puede presentar síntomas parecidos a los de la etapa 3.

Etapa 5

La ERC en etapa 5 presentan daños graves en los riñones, con un resultado inferior a 15 de eGFR. El daño puede causar el fallo total de los riñones, por ende, no tienen la capacidad de llevar a cabo la filtración de los desechos y exceso de líquidos de la sangre, provocando enfermedades graves y otros problemas de salud que ponen en riesgo la vida del paciente.

La eGFR en etapas 1 y 2 sin evidencia de daño renal no se considera ERC, sin embargo, se toman en cuenta en la ERC dado a que en cualquier etapa se presentan riesgo de complicaciones que pueden conducir a la muerte sin progresión a insuficiencia renal. Y considerando las subdivisiones a y b de la etapa 3, es debido a que la etapa 3b corresponde un alto riesgo de complicaciones y muerte en la ERC a las que presenta la etapa 3a. El principal objetivo de clasificar la ERC en etapas es tomar medidas para detener y retardar el daño a los riñones y mantenerlos funcionando el mayor tiempo posible (Himmelfarb & Ikizler, 2019).

6.1.2 ¿Es posible tener enfermedad renal, aunque la eGFR sea normal?

Las pruebas de análisis de eGFR a veces presentan cierta incertidumbre, arrojando resultados normales, aunque ya hayan aparecido algunas señales de daños renales, especialmente en personas menores de 18 años, en mujeres embarazadas y en personas con mucho sobrepeso o muy musculadas, e incluso los resultados se ven afectadas por la deshidratación. Los médicos en ocasiones recomiendan hacerse la evaluación dos veces para mejorar la confiabilidad de los resultados e incluso, a veces se hacen otras pruebas, como los ultrasonidos o la biopsia renal para investigar la causa de la ERC (American Kidney Fund, 2022). La clasificación mejorada de la ERC por NKF ha beneficiado el proceso de análisis de eGFR e identificar indicaciones pronósticas relacionadas con la disminución de la función renal. Sin embargo, el uso de la clasificación de las etapas de la ERC supone un problema, que es el posible sobrediagnóstico para los pacientes, especialmente en los ancianos, lo que deriva a una carga económica para las familias de los pacientes (Pereira et al., 2005).

El daño a sus riñones no se puede revertir. Pero si los médicos detectan la ERC a tiempo, hay maneras de evitar que el daño empeore, como seguir un plan de alimentación saludable para los riñones, mantenerse activo y tomar ciertos medicamentos.

6.1.3 Causas y factores de riesgo

La ERC puede ser el resultado de varias condiciones o causas, pero las dos causas más comunes de acuerdo con National Kidney Foundation (NKF) son la diabetes y la presión arterial alta, o hipertensión, principalmente en todos los países industrializados y en varios países subdesarrollados y en países de Asia y África subsahariana incluyen algunas enfermedades glomerulares también causa principal de la ERC. Sin embargo, también existen factores que contribuyen a la carga de la ERC, como la contaminación ambiental, los pesticidas, el abuso de analgésicos, los medicamentos a base de hierbas y el uso de aditivos alimentarios, y sumando factores de susceptibilidad genética que

conducen a la ERC, por ejemplo, la poliquistosis renal (Monika Gööz, 2012; Yang & He, 2020).

La ERC es una condición progresiva complicada y se tiene más probabilidades de desarrollar en consecuencia de varias comorbilidades como se muestra en la Figura 3 (Akinnibosun et al., 2022).

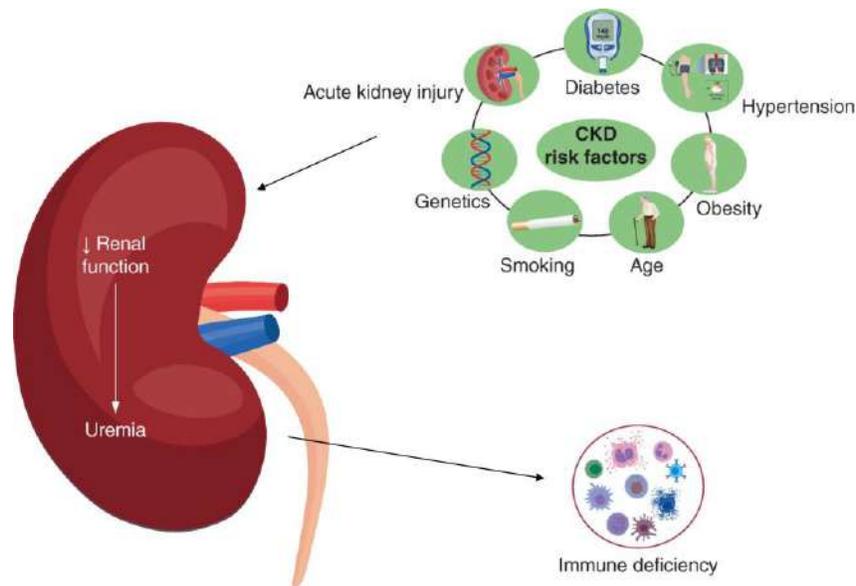


Figura 3. Enfermedad renal crónica y fisiopatología (Akinnibosun et al., 2022).

Estas comorbilidades asociadas a la ERC pueden integrar enfermedades crónicas en varios niveles como (Kazancioğlu, 2013; NIDDK, 2016; Vaidya & Aeddula, 2022):

- Diabetes. Un alto nivel de glucosa en la sangre puede dañar los vasos sanguíneos de los riñones que puede encaminar al desarrollo de ERC. La diabetes es la principal causa de ERC, 3 a 5 de cada 10 personas con diabetes tiene ERC.
- Hipertensión. La presión arterial alta de igual forma puede dañar los vasos sanguíneos de los riñones. Se estima que casi 3 de cada 10 adultos con hipertensión tiene ERC, siendo esta la segunda causa de la ERC.

- Otras causas. enfermedad cardíaca, edad, obesidad, glomerulonefritis, trastorno genético (Poliquistosis renal), nefritis lúpica, enfermedades hereditarias o quísticas, cáncer de riñón, infección, medicamentos tóxicos para los riñones, síndrome urémico, etc.

Considerando el sistema de salud segmentado de México, la situación de la ERC se vuelve más compleja en consecuencia de una transición epidemiológica, debido al aumento de la prevalencia de diabetes e hipertensión, además de la creciente población anciana (Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020; Yang & He, 2020). La preocupación de la ERC causada por la diabetes en el sistema de salud de México se ha centrado en sus complicaciones, representa casi el 50 % de los casos de ERC en etapa terminal en México. Además, la diabetes es la primera causa de ingreso a los programas de tratamiento de reemplazo renal (diálisis y trasplante de riñón); sin embargo, aproximadamente el 30 % de la población de ERC, se desconoce la causa de la enfermedad (Martínez-Valverde et al., 2022; Vasquez-Jimenez & Madero, 2020).

6.1.4 Síntomas y complicaciones

Es muy posible que en la pérdida de la función renal inicial en la ERC no presente ningún síntoma y las manifestaciones clínicas ocurren hasta una etapa avanzada de la afección. Las etapas 1 y 2 de la clasificación de la ERC muestran una función renal disminuida leve sin síntomas ni signos, o pueden presentar daños tenues en el riñón (Himmelfarb & Ikizler, 2019; Vaidya & Aeddula, 2022).

La ERC en las etapas 1 y 2 es temprana y a menudo progresa lentamente, y dado a que la disfunción renal generalmente es clínicamente silenciosa tanto los pacientes como los médicos comúnmente no reconocen su aparición de la ERC. La función renal en la etapa 3 de la enfermedad ya se considera grave, esto es resultado de la falla de los riñones, dado que se ha dañado aproximadamente la mitad de su estructura y función (Monika Gööz, 2012). Pese a que la etapa 3 se considera grave, normalmente en las etapas que se

empiezan a manifestar los primeros síntomas de la ERC son en las etapas 4 y 5 (Vaidya & Aeddula, 2022). Sin embargo, los síntomas que se presentan en etapa avanzada de la ERC suelen ser inespecíficos y por lo general las complicaciones se atribuyen a otras enfermedades comórbidas preexistentes, o en el caso de los adultos mayores, son derivadas por su edad avanzada más que a la ERC. Además, estas complicaciones vienen acompañados de una alta carga en los problemas psicosociales y económicos por sus altos costos de atención (Pereira et al., 2005; Yang & He, 2020).

Posiblemente ninguna otra enfermedad sea tan compleja y complicada como la ERC, ya que la tasa de progresión de la falla renal está condicionada por una amplia gama de factores que pueden o no estar influenciados directamente por la ERC o causada por otras enfermedades comórbidas preexistentes. Y los síntomas varía entre individuos y resultan de la interacción constante de múltiples sistemas biológicos y no hay evidencia que justifique la diferencia de las personas sintomáticas y las asintomáticas en la población general de la ERC (Monika Gööz, 2012; Vaidya & Aeddula, 2022).

6.1.5 Incidencia, prevalencia y mortalidad

La incidencia y prevalencia de la ERC representa una enorme carga creciente y de gran relevancia para los sistemas sanitarios de todo el mundo. Esta epidemia se ha convertido en un es un problema de salud pública mundial con un incremento en la incidencia y prevalencia en todas sus etapas, y a causa se deriva una alta mortalidad de la ERC en la población. El crecimiento acelerado de la incidencia y prevalencia de la ERC puede estar relacionado con diversos factores que aumentan la población de la enfermedad como los cambios demográficos, epidemiológicos, cambios en el estilo de vida y las enfermedades que pueden derivar a la ERC (p. ej., diabetes e hipertensión), la incidencia y prevalencia seguirán aumentando inevitablemente en un futuro próximo (Cortés-Valencia et al., 2022).

Además, la diabetes e hipertensión, dos de las principales causas de la ERC, dos enfermedades que se encuentran con gran frecuencia en la población mundial se están convirtiendo en epidemias en nuestras sociedades y siendo unas de las principales causas de muerte con un aumento en la incidencia y prevalencia de estas enfermedades (Abbafati et al., 2020; Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020; Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2019).

A nivel global, en 2017, la prevalencia se estimó de aproximadamente del 9.1% (95% IU 8.5% a 9.8%), registrando casi 700 millones de casos en todas las etapas y responsables de alrededor del 4.6% (UI: 4.3% a 5.0%) de las muertes en el mundo, lo que equivale a 1.2 millones de muertes, donde la tasa de mortalidad mundial en todas las edades aumento un 41.5% desde el año 1990 al 2017, lo que la convierte en la 12ª causa principal, en comparación con la 17ª en 1990. Y en comparación con otras enfermedades, la ERC ha tenido uno de los aumentos recientes más rápidos de todas las enfermedades crónicas no transmisibles (Bikbov et al., 2020; Cortés-Valencia et al., 2022).

La ERC tiene un efecto importante en el desarrollo social y económico, reflejado en la carga tanto en las finanzas de los sistemas sanitarios, como en el efecto negativo psicosocial de los enfermos por sus consecuencias médicas, sociales y económicas tanto para ellos como para sus familiares. Esto derivándose tanto como causa directa de la incidencia y prevalencia global como un factor de riesgo importante de mortalidad (Bikbov et al., 2020; Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2019).

La tasa global de mortalidad asociadas con la ERC es sorprendente, en 2009 la tasa ajustada de mortalidad en pacientes con ERC fue de 56% mayor que la de los pacientes sin ERC y, para los pacientes en etapa 4 y 5 la tasa ajustada fue un 76% mayor, y en América del Norte, América Latina central y Asia central, la mortalidad por ERC ha aumentado aproximadamente un 60%; estas tasas se consideran y se ajustan de acuerdo con la edad, sexo, raza, comorbilidad y hospitalizaciones previas (Canzano, 2015; Cortés-Valencia et al., 2022). en 2017, la ERC fue la segunda causa de muerte en América Central (Cortés-

Valencia et al., 2022). Sin embargo, la carga de la incidencia y prevalencia de la ERC es difícil de determinar y difiere sustancialmente entre países y regiones, asociado a los diferentes estudios realizados asociado fuertemente con la evidencia disponibilidad reducida. Como resultado, pocos estudios informan la incidencia y prevalencia de la ERC, además de existir incertidumbre en los datos relacionados con la ERC debido a la que la enfermedad en la mayoría de los casos es asintomática, por ende, las personas que la padecen no se dan cuenta que están enfermas.

La magnitud y el impacto de la ERC varía sustancialmente en todo el mundo, al igual que su detección y tratamiento. En muchos entornos la morbilidad y mortalidad están definidas por factores sociales, económicos, culturales y políticos, lo que genera discrepancias significativas en la carga de la enfermedad y se espera que el número de pacientes con ERC aumente continuamente en todo el mundo (Crews et al., 2019). La planificación del sistema de salud requiere una evaluación metódica y diligente de la epidemiología de la ERC, pero actualmente los censos y registros son escasos o inexistentes en muchos países (Bikbov et al., 2020).

6.1.6 ERC en México

La enfermedad renal crónica (ERC) se considera un problema de salud importante y con un crecimiento acelerado. Solo en México, las cifras de muertes son alarmantes, además está relacionada con enfermedades que representan de las primeras causas de muerte; en pacientes con diabetes mellitus ocasiona el 25% de las muertes y, 28% de las muertes relacionadas con cardiopatía hipertensiva están relacionadas con trastornos ocasionados por la enfermedad renal crónica (Baumelou et al., 2005; Chávez-Gómez et al., 2017).

Esto constituye actualmente un problema de salud pública a nivel global, debido al incremento en su incidencia y prevalencia, en 2008, alcanzó la mayor incidencia de enfermedad renal terminal en el mundo. En México entre los años 1990 y 2010, se estimó

un incremento de más del 300% de la ERC; una cifra preocupante, además de ocupar los primeros lugares de morbilidad y mortalidad (Chávez-Gómez et al., 2017; Méndez-Durán et al., 2010). Se estima que la ERC afecta aproximadamente del 8% al 15% de la población a nivel mundial. Además, el sistema médico debe soportar altos gastos médicos debido a su complejo tratamiento y manejo multidisciplinario, y esta situación se ve agravada por los recursos económicos insuficientes que se requieren para tratar a los pacientes con tales patologías. La ERC acorta la esperanza de vida, reduce la calidad de vida del paciente y provoca discapacidades laborales, lo que a su vez repercute en la economía (Chávez-Gómez et al., 2017; Perales-Montilla et al., 2012).

¿Qué causa la mayoría de las muertes?

- Enfermedades contagiosas, maternas, neonatales y de la nutrición
- Enfermedades que no son contagiosas
- Lesiones

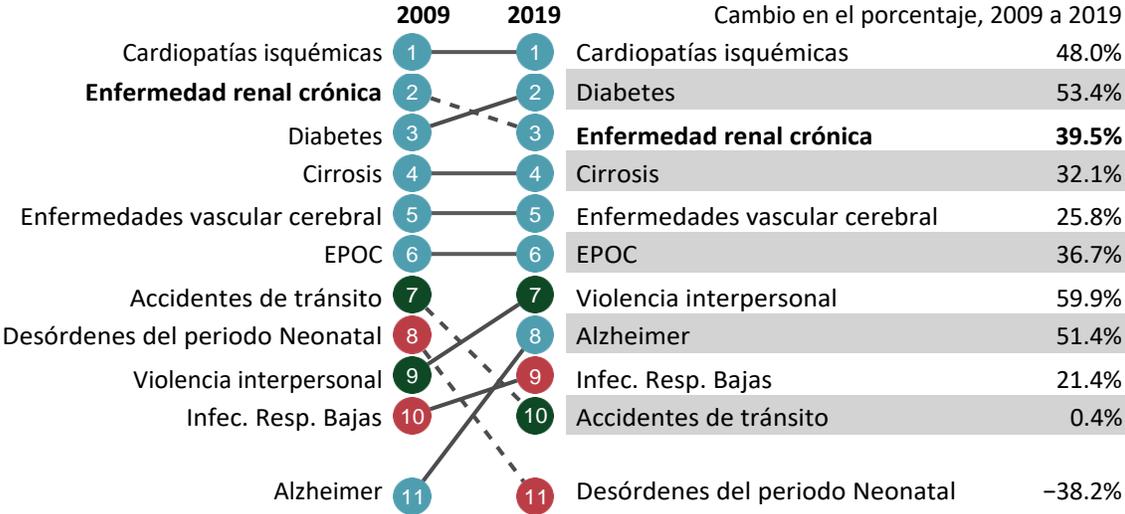


Tabla 2. Las 10 causas principales de muerte en México y su cambio en el porcentaje entre 2009 y 2019 (Mexico | Institute for Health Metrics and Evaluation, 2019).

La enfermedad renal crónica es el resultado de diversas enfermedades crónico-degenerativas, entre las que destacan la diabetes y la hipertensión, fenómeno que ocurre de manera similar en todo el mundo, lamentablemente, si no se trata. En las últimas

décadas ha aumentado la relevancia de la ERC en México. Además de lo anterior, el costo de la atención de estas enfermedades es uno de los más altos. En México, no tenemos estadísticas confiables sobre ERC (Arreola et al., 2019).

6.1.6.1 Incidencia, prevalencia y mortalidad de la ERC en México

La enfermedad renal crónica (ERC) es considerada una epidemia silenciosa, en especial en países de bajos y medianos recursos donde existe evidencia documentada de un mayor de casos de ERC, además las estadísticas muestran un gran aumento reciente acelerados en todo el mundo en comparación con otras enfermedades crónicas no transmisibles (Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020). Exhibiendo la información documentada referente a la ERC en México con datos alarmante, teniendo una de las tasas de incidencia y prevalencia de ERC más altas del mundo, además tiene la sexta tasa más alta de muertes prematuras en el mundo. Esta enfermedad es una emergencia de salud pública en México (Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020; Vasquez-Jimenez & Madero, 2020).

Los verdaderos datos de incidencia y prevalencia de la ERC en México presentan estados de incertidumbre o son difíciles de determinar dado que la ERC avanza de forma lenta, silenciosa e irreversible, además derivado a la naturaleza asintomática de la ERC temprana a moderada, los pacientes pueden no saber que la tienen durante años (Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020; Vasquez-Jimenez & Madero, 2020). En México, como en otros países de ingresos bajos y medios los antecedentes de prevalencia están limitados debido a los que los estudios que se realizan solo están enfocados en su mayoría en ERC en etapa terminal, y como resultados de esto, existe una alta tasa de pacientes subdiagnosticados, además de la escasez de los procedimientos de rutina para detectar y diagnosticar la ERC y la falta de estudios estadísticos de las instituciones u organismos que generan y difunden información geográfica que abarquen datos de la incidencia y prevalencia de la ERC más

regulados para cuantificar la magnitud de la ERC (Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020; Vasquez-Jimenez & Madero, 2020).

Sin embargo, de acuerdo con varios estudios, las estimaciones de la prevalencia estandarizada de la ERC en México en el año 2017 se considera que fue de 12.2% con más de 14.5 millones de casos (95% IU 13.57 millones a 15.61 millones), y otros datos del Instituto de Métrica y Evaluación de la Salud (IHME, por sus siglas en inglés) exponen que la diabetes y la hipertensión arterial han influido fuertemente en la epidemiología de la ERC, siendo las principales causas de esta enfermedad, lo que puede estar reflejada al aumento de la incidencia y prevalencia de la ERC; así mismo también del incremento significativo de las muertes causadas por esta enfermedad en México (Colli et al., 2022; Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2015; Valdez-Ortiz et al., 2018). Otro estudio reportó que en México la calidad de la atención médica para la ERC está comprometida debido a que esta enfermedad se diagnostica tardíamente en pacientes con diabetes, y cuando se identifica se encuentran en estadios avanzados de diabetes y en una progresión más acelerada a insuficiencia renal terminal (Martínez-Valverde et al., 2022).

Además, la hipertensión arterial, la diabetes y la obesidad, las cuales son las principales causas de la ERC y que reflejan una gran carga sanitaria con tasas de prevalencia muy altas en México. Y datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 reportó que en la población de 20 años o mayores fue diagnosticada con diabetes el 10.3% y con hipertensión el 18.4%; y el 75.2% de los mayores adultos en México presentaba sobrepeso u obesidad. Estos datos reflejan un gran impacto en la progresión de la ERC, aumentando las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad de la enfermedad (Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020).

En nuestro país estas cifras son alarmantes, y a nivel global México tiene la sexta tasa de mortalidad por ERC más alta del mundo lo que representa en 58.1 muertes por cada 100,000 habitantes. Exponiendo estos datos en un periodo de 1990 a 2017, la tasa de

mortalidad por ERC estandarizada por edad aumento de 28,7 a 58,1 (por cada 100 000 habitantes), esto representa un crecimiento en la tasa de mortalidad preocupante del 102,3 %. Además, en 2017 la ERC representó la segunda causa de muerte, mientras que en 1990 fue la 11ª causa de muerte, un ascenso grave y alarmante. (Agudelo-Botero, González-Robledo, et al., 2020; Cortés-Valencia et al., 2022b). De acuerdo con algunos estudios, estos notables aumentos alarmantes en la tasa de mortalidad se han relacionado con cambios demográficos y epidemiológicos acelerados que contribuyen al crecimiento excesivo y se explica principalmente por los siguientes factores (Agudelo-Botero, González-Robledo, et al., 2020):

- El aumento de la incidencia y prevalencia de factores de riesgo como diabetes, hipertensión y obesidad que influyen en la carga creciente de la ERC.
- Se identificaron barreras en el acceso de recursos, información, el contacto con los servicios de salud y la disponibilidad de intervenciones preventivas que apoyen el manejo temprano de la enfermedad.
- El obstáculo de un diagnóstico temprano que identifique las causas desde las primeras etapas debido a la ausencia de síntomas de la ERC.
- acceso limitado disponibilidad de terapia de reemplazo renal, principalmente en la población con dificultades económicas y emocionales.

Otro estudio expresa que, de las muertes por enfermedades cardiovasculares el 7,6 % (6,5 a 8,8) se atribuyeron a la insuficiencia renal, lo que representan 1,4 millones (1,2 a 1,6) de muertes (Bikbov et al., 2020). Todas estas cifras relejan una gran grieta en mejorar la calidad de vida de la población, y de todas las enfermedades crónicas no transmisibles, la ERC comprendió uno de los aumentos recientes más rápidos en todo el mundo. Por otro lado, no existe suficientes especialistas ni centros sanitarios que ayuden a frenar esta epidemia, debido a que México tiene pocos nefrólogos y centros de diálisis y hemodiálisis. En 2017, se reportó contar con solo con 920 nefrólogos, de los cuales el 21% (193

nefrólogos) estaban afiliados al Ministerio de Salud, lo que posiciona a México muy por debajo de los estándares internacionales (Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020).

Así mismo, varios estudios informan que la ERC representa un gran desafío en los servicios sanitarios en México debido a la naturaleza asintomática de la enfermedad y complementario a esto, es que la mayor necesidad sanitaria es la prevención, diagnóstico temprano y atención de la ERC. Además, en la ERC en etapas terminales donde se requiere un tratamiento de reemplazo renal, representa una desigualdad en el acceso a los servicios de salud en el país porque solo una pequeña proporción de pacientes reciben este tratamiento. Las personas más desfavorecidas son las que no están afiliadas a los servicios de seguridad social y no tiene acceso a un tratamiento íntegro de reemplazo renal, dado que se incluye en los beneficios de afiliación en las instituciones públicas bajo la gestión del Ministerio de Salud, además por sus los altos costos económicos que las familias de los pacientes no pueden cubrir (Martínez-Valverde et al., 2022).

La evaluación de las necesidades sanitarias es un marcador importante para mejorar la planificación de los programas de atención médica que incorporen técnicas y tecnología modernas que favorezcan el diagnóstico temprano y accesibles al usuario, ya que se podrían prevenir sus consecuencias y el progreso de la ERC. En contexto con esto, el Programa de Evaluación Precoz del Riñón (KEEP) reporto que en México los casos más frecuentes son en etapas 1 y 2, y hasta el 98% de los casos de ERC derivados por diabetes se encuentran en etapas 1 al 3, es por ello la importancia de la evaluación de un programa que integre técnicas sanitarias que favorezcan un diagnóstico temprano que ayuden a retrasar y controlar la ERC, ayudando a mejorar el impacto de la enfermedad en etapas terminales y sus altos costos (Colli et al., 2022; Martínez-Valverde et al., 2022).

6.1.6.2 Carga financiera

La carga de la ERC y sus factores de riesgo relacionados se vuelve más compleja en México, y está teniendo un impacto significativo en las finanzas de las instituciones de

salud y en la economía familiar, que deterioran el desarrollo social, psicológico, económico y sanitario amenazando en la calidad de vida de la población (Colli et al., 2022; Juan Carlos Flores, 2010). En 2014, el gasto promedio anual en salud para el Ministerio de Salud por paciente para la ERC fue de US\$ 8 966 y, mientras que para Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) fue de US\$ 9 091. La ERC represento la más costosa de las enfermedades crónicas (EC) tanto en el Ministerio de Salud como en el IMSS (Colli et al., 2022; Figueroa-Lara et al., 2016; INSP, 2020). Esta carga financiera de ambas instituciones de salud se derivó de la intensidad de uso de las consultas médica, asimismo la tasa de hospitalización más alta por EC se debió por pacientes con diagnóstico de ERC, representando el 35 %. Además de los diagnosticados con ERC se les ordenaron exámenes de laboratorio que elevaban los gastos considerablemente; y con respecto a la diálisis renal, el Ministerio de Salud gastó US\$ 8,546 más en comparación con lo gastado por el IMSS (Figueroa-Lara et al., 2016; INSP, 2020).

¿Cuánto dinero se gasta en la salud, ahora y en el futuro, y de qué fuentes?

- Gastos privados prepagados
- Gastos por cuenta propia
- Gastos del gobierno en la salud pública
- Ayuda al desarrollo para la salud

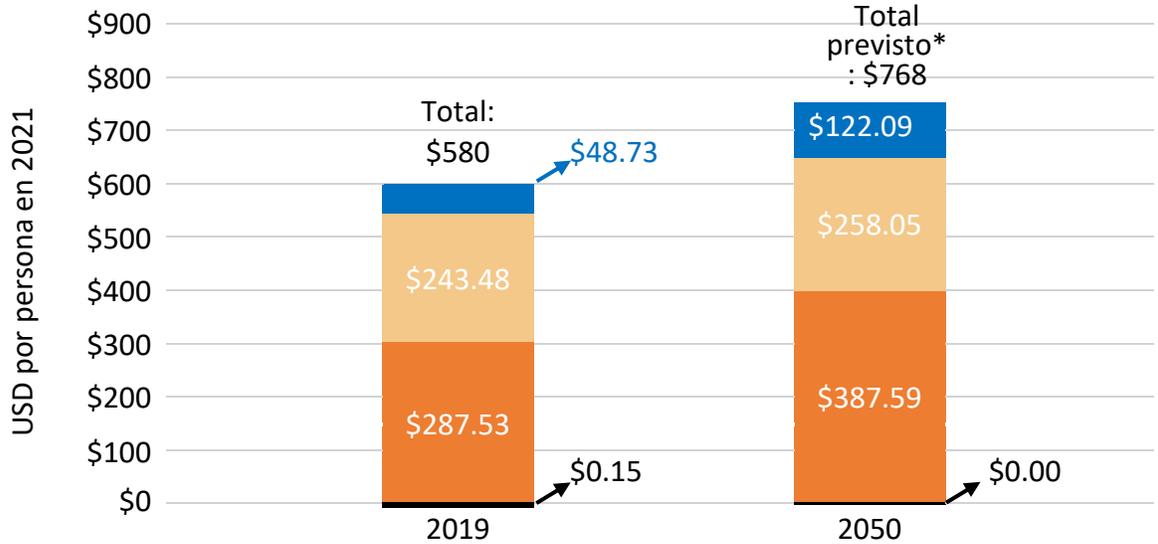


Tabla 3 Fuentes principales de gastos para costear problemas de salud y una proyección para el año 2050 (México | Institute for Health Metrics and Evaluation, 2019).

La carga financiera desde la perspectiva de las categorías de gasto, la intervención médica con diálisis renal representó el 45% del gasto anual de EC para el Ministerio de Salud, lo que equivale a US\$ 639 millones (La carga financiera de la atención médica de CD fue de US\$ 1 420 millones en el Ministerio de Salud) y en cuanto al IMSS, la diálisis renal representó el 11% de la carga financiera total de CD, lo que equivale a US\$ 435.6 millones (La carga financiera de la atención médica de CD fue de US\$ 3 960 millones en el IMSS) (Figueroa-Lara et al., 2016).

El costo del tratamiento con diálisis y terapias de reemplazo renal (TRR) para la ERC representa una enorme carga financiera para los sistemas e instituciones de salud y un enorme gasto para los pacientes y sus familiares (Yang & He, 2020). En la Tabla 3 se muestran las principales fuentes de ingreso para cubrir gastos anuales de salud por personas en México en el año 2021 y una proyección futura para el año 2050 basada en el crecimiento pasado (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2019; Micah et al., 2023).

En un estudio de Epidemiología de la ERC en México, publicado en el año 2010, se destacó que cada año se sumaban 40 mil nuevos casos de ERC en el país, aunque es verdad que en México no existe un registro de pacientes en terapias dialíticas, por lo que no se cuenta con datos precisos (INSP, 2020; Jha et al., 2013). En dicho estudio, se incluyó a pacientes prevalentes con ERC en tratamiento de diálisis peritoneal (DP) y hemodiálisis (HD). En el mismo se identifican el sexo, la edad y la frecuencia de la ERC por grupos. De los grupos de estudio, el 66 % se encontraba en tratamiento de DP y el 34 % de HD. De modo que los resultados fueron los siguientes (Méndez-Durán et al., 2010):

1. Con respecto al tratamiento DP:
 - a. 94 % eran adultos de los cuales:
 - i. 53 % eran varones
 - ii. 47 % mujeres

- b. 6 % pediátricos, de los cuales
 - i. 50 % varones
 - ii. 50 % mujeres
- c. El grupo de edad más prevalente fue de 40-49 años.
- d. Las causas de la IRC fueron:
 - i. Diabetes mellitus (43 %)
 - ii. Hipertensión arterial (17 %)
 - iii. Glomerulopatías crónicas (14.4 %)
 - iv. No determinadas (9.2 %)
 - v. Riñones poliquísticos (4.7 %)
 - vi. Malformaciones congénitas de la vía urinaria (4 %)
 - vii. Nefropatía lúpica (3.3 %)
 - viii. Otras (4.4 %)

2. Con respecto al tratamiento HD:

- a. 99 % adultos, de los cuales:
 - i. 51 % varones
 - ii. 49 % mujeres
- b. 1 % pediátricos, de los cuales:
 - i. 72 % varones
 - ii. 25 % mujeres
- c. El grupo de edad más prevalente fue el de 60-69 años.
 - i. Las causas de IRC, fueron:
 - ii. Diabetes mellitus (54 %)
 - iii. Hipertensión arterial (21 %)
 - iv. Glomerulopatías crónicas (11 %)
 - v. No determinadas (5.6 %)
 - vi. Riñones poliquísticos (4.3 %)
 - vii. Malformaciones congénitas de la vía urinaria (2.1 %)
 - viii. Nefropatía lúpica (1.2 %)

ix. Otras (0.8 %)

Además, después del momento en que se diagnosticó la ERC en los pacientes, se enfrentaron a otro impacto de la ERC en la carga económica de los pacientes y sus familiares. Los pacientes se enfrentaron a dificultades financieras para cubrir los múltiples gastos indirectos de la enfermedad, y continuar con el procedimiento de consultas y tratamientos después de su diagnóstico, debido a que tenían que costear los servicios de transporte, alojamiento y alimentación. Como resultado de las dificultades financieras, existía una falta de fondos que causa un tratamientos intermitente o discontinuado de la enfermedad, principalmente trabajadores no asalariados, desempleados y población económicamente inactiva que no cuenta con seguro de salud (Agudelo-Botero, González-Robledo, et al., 2020; Agudelo-Botero, Valdez-Ortiz, et al., 2020). Y las instituciones que ofrecen servicio de salud ya sea a través del Ministerio de Salud en forma de asistencia pública o a través del Seguro Popular, no tienen cobertura gratuita de la ERC y las terapias de reemplazo renal (TRR), por ende, los gastos deben ser cubiertos por los pacientes y sus familiares (Valdez-Ortiz et al., 2018).

6.1.7 Ciclo de la urea

El ciclo de la urea es un conjunto de seis reacciones químicas que eliminan el exceso de amoníaco producido durante la degradación de los aminoácidos y otros compuestos que contienen nitrógeno. Los cambios en el ciclo de síntesis de la urea producirán la acumulación de amoniaco en las células de nuestro organismo, que por su neurotoxicidad puede derivar en enfermedades como la encefalopatía aguda y crónica (Gil Ortega, 2018).

El deterioro del funcionamiento renal está relacionado con la función renal. Cuando el riñón pierde su capacidad para filtrar los productos de desecho en la sangre, cuando se acumula el nivel de moléculas dañinas como la urea y la creatinina, provocará un

desequilibrio de la función sanguínea, lo que conduce al desequilibrio de otros componentes biológicos y sistemas (Gil Ortega, 2018; Nelson & Lee, 2005).

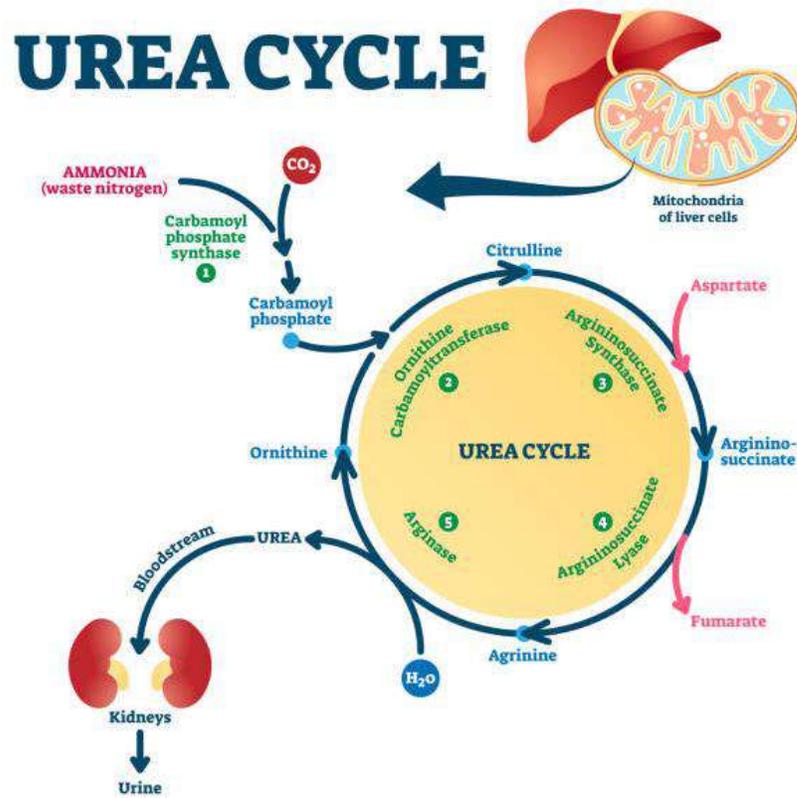


Figura 4. Representación del ciclo de la urea (Yokoyama, 2021).

Las altas concentraciones de sustancias nitrogenadas como la urea y la creatinina en la sangre son biomarcadores característicos de la lesión renal. El ciclo de la urea comienza dentro de las mitocondrias del hígado, aunque los siguientes tres pasos ocurren en el citoplasma; por lo tanto, el ciclo contiene dos compartimentos celulares (Ye et al., 2020). Este tipo de enfermedades metabólicas se consideran raras ya que afectan a 650-1000 individuos por millón y son de difícil diagnóstico. El análisis de la urea se utiliza junto a la creatinina para el diagnóstico de enfermedad renal y para monitorizar pacientes

con disfunción o fallo renal, por ende, un repaso de la creatinina y urea es importante para un mejor entendimiento de las enfermedades renales (Crespo, 2018).

6.2 Biosensores

Durante la última década, la ingeniería y el campo de la investigación biomédica ha tenido un impacto significativo en el diseño y desarrollo de biosensores portátiles para aplicaciones biomédicas. Estos avances han traído una atención considerable tanto en la comunidad científica, en los sectores sanitarios y en la industria, mejorando las áreas de diagnóstico clínico y el control y monitoreo de enfermedades (Cooper & Cass, 2004; Higson, 2012).

Este enfoque puede ser proyectado en la pandemia actual reciente, tal situación ha resaltado tecnologías como las pruebas de PCR que son rápidas, sensibles y confiables, sin embargo, limitadas al uso de un personal calificado y equipo de laboratorio; y los biosensores colorimétricos de flujo latera que son extremadamente rápidos, aportan resultados en solo 15 minutos y son confiables. Estos dispositivos de biosensores colorimétricos de flujo latera y otros dispositivos emergentes como se muestran en la Figura 5 facilito el diagnostico en algunas áreas donde los centros médicos, los recursos y el transporte eran escasos, por ende, no era viable enviar muestras a laboratorios especializados para sus análisis clínicos para abordar la pandemia (Mak & Ho, 2022).

La aceptación de diagnóstico con biosensores en esta pandemia dependió en gran medida del costo, la portabilidad, la facilidad de uso y el tiempo de respuesta de dichos dispositivos (Higson, 2012; Mak & Ho, 2022).

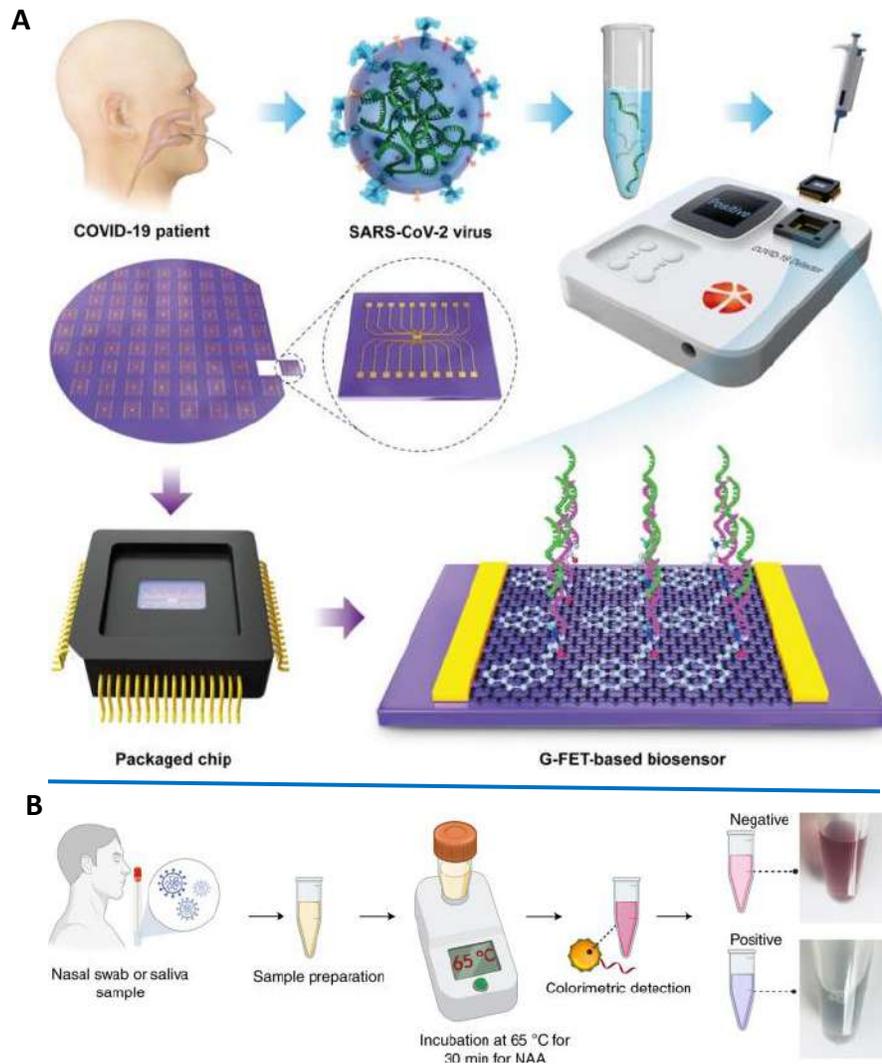


Figura 5. (a) Biosensores basados en transistores de efecto de campo para diagnóstico de COVID-19 en un PoC; este biosensor ofrece una respuesta en tiempo real (Science China Press, (Moabelo et al., 2021). (b) prueba colorimétrica nanoamplificada para el diagnóstico clínico de COVID-19 (Alafeef et al., 2021).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció aspectos importantes a considerar bajo el acrónimo ASSURED para el diagnóstico de pruebas rápidas con biosensores con las siguientes características de la Tabla 4 (Drain et al., 2014; Land et al., 2018; Mak & Ho, 2022):

Tabla 4. Criterios ASSURED de la Organización Mundial de la Salud.

Asequible	Los diagnósticos asequibles y rentables siguen siendo fundamentales en entornos con recursos limitado para aquellos en riesgo de infección.
Sensible	Las pruebas deben minimizar o eliminar la posibilidad de falsos negativos, especialmente cuando el diagnóstico este destinado a la detección.
Específico	Los diagnósticos deben tener tasas bajas de falsos positivos. Lo ideal es donde la sensibilidad y la especificidad se aproximen a las de los ensayos de laboratorio.
Fácil de usar	Independencia operativa de la capacitación del personal de laboratorio.
Rápido y robusto	Resultados disponibles entre 15 y 60 minutos después de la recolección de la muestra para permitir el tratamiento en la primera visita. Y la robustez se refiere a la capacidad de no requerir condiciones adicionales de transporte y almacenamiento refrigerado (a menudo costosas).
Sin equipo	Realizar fuera de laboratorios sofisticados que no requieren instrumentación compleja (se puede operar en pequeños dispositivos portátiles).
Entregable a los usuarios finales	Optimizar la selección y adquisición de datos y herramientas para almacenar, distribuir, enviar y garantizar que llegue a los usuarios finales, sin importar los entornos con recursos limitados.

A partir de estos criterios, ASSURED se ha convertido en un punto de referencia estándar para la investigación y el desarrollo de dispositivos y métodos en las pruebas en el punto de atención (POCT) (Mak & Ho, 2022). En Europa, América del Norte y Asia-Pacífico se ha visto un crecimiento de pequeñas y medianas empresas que buscan nichos de mercado y el desarrollo de biosensores con aplicaciones POCT (Figura 6), potencializado por las necesidades de los sectores de la salud y servicios sanitarios durante la pandemia (Cooper & Cass, 2004; da Silva et al., 2017; J. Kim, 2018).

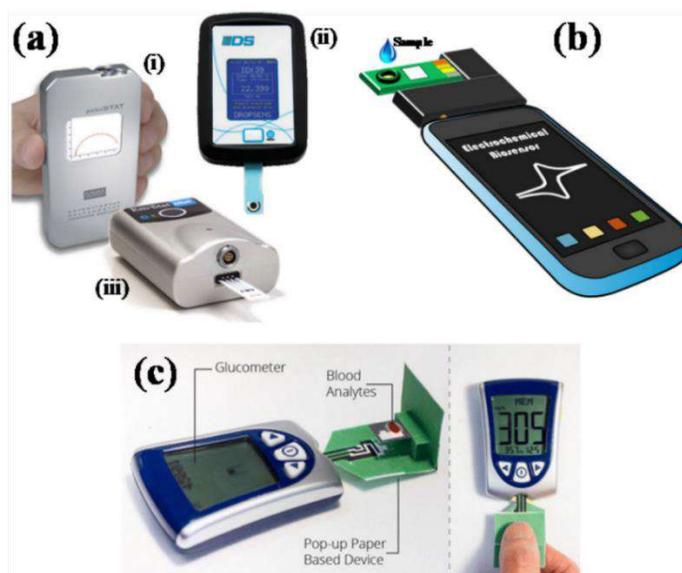


Figura 6. Ejemplos representativos de biosensores portátiles. A) Potenciostatos de bolsillo. B) Potenciostatos basados en teléfonos inteligentes. C) Glucómetro convencional (da Silva et al., 2017).

La demanda de la atención médica para atender los problemas de salud global sigue siendo un gran desafío en los servicios sanitarios de todo el mundo, y en los últimos años se han desarrollado muchos tipos de biosensores utilizados en una variedad de entornos analíticos, incluidos los biomédicos, ambientales, de investigación y otros; priorizando los dispositivos no invasivos, portátiles, rápidos, en tiempo real y económicos (Higson, 2012).

Un biosensor es un dispositivo analítico integrado por un transductor y un componente biológicamente sensible y selectivo, capaz de proporcionar información analítica

cuantitativa o semicuantitativa específica (Zhu et al., 2017). La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define un biosensor como un “dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos, generalmente por medios eléctricos, térmicos o señales ópticas” (Nagel et al., 1992).

Los biosensores son herramientas de detección y diagnóstico importantes que han ganado gran popularidad en la sociedad; su integración en nuestras vidas cotidianas y en los sectores de salud ha inspirado importantes innovaciones para crear nuevos métodos de análisis, materiales de detección, softwares, dispositivos de hardware, técnicas de transducción reducidas e integración de dispositivos que mejoren drásticamente la ingeniería de biosensores en el desarrollo de futuros sistemas de diagnóstico claves para el control y la vigilancia de enfermedades (Inamuddin et al., 2019). Los biosensores tienen amplias ventajas relevantes comparado con otros métodos de bioanálisis y biodetección, especialmente por su diagnóstico rápido de enfermedades, incluso el monitoreo en tiempo real de su estado de salud (Rasooly & Herold, 2009).

En la actualidad, comúnmente un biosensor consta de tres partes: un elemento de reconocimiento biológico (ligando o bioreceptor), una unidad de conversión de señal (transductor) y un electrónico amplificador asociado que son los responsables principales de la visualización de las señales respuesta (procesador de señales) como se muestra en la Figura 7 (Pandey & Malhotra, 2019). El bioreceptor facilita la unión específica con un objetivo, mejorando las reacciones bioquímicas, por lo tanto, sus características son indispensables porque determina la especificidad y sensibilidad del biosensor (Rasooly & Herold, 2009; Zhu et al., 2017). Cuando una molécula diana específica interactúa con un bioreceptor, se genera una señal de respuesta a nivel del transductor proporcional a la concentración de la solución, lo que permite a los biosensores medir las concentraciones de un componente de interés o varios presentes en un ambiente biológico y procesos químicos, con respuestas rápidas y costos accesibles en comparación con las técnicas analíticas tradicionales (Narang et al., 2017).

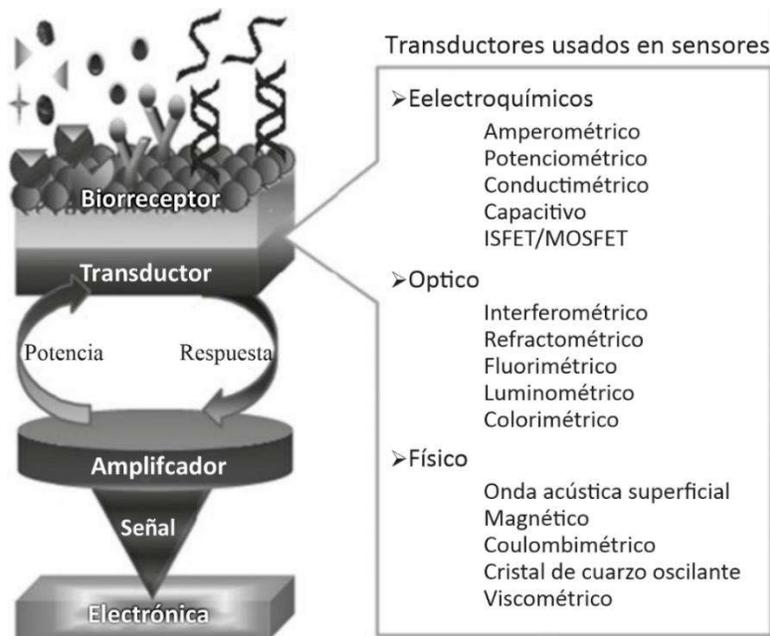


Figura 7. Esquema básico de un biosensor mostrando sus tres etapas: bioreceptor, transductor y amplificador (Pandey & Malhotra, 2019).

Los biosensores tienen amplias aplicaciones y en el ámbito de la atención médica son utilizados ampliamente como alternativas prometedoras a los equipos analíticos de laboratorios robustos, costosos y sofisticados que requieren ser operados por un personal profesional, además el proceso de operación de la toma de muestra puede ser lento e invasivo, asimismo el tiempo de respuesta puede ser extenso. En el transcurso de los últimos años, la investigación y el desarrollo de biosensores analíticos ha sido un área de gran interés en el área médica. Y muchos de estos dispositivos se desarrollan con el propósito de detectar diferentes analitos específicos utilizando diversos sistemas de reconocimiento, y en cada uno de estos sistemas hay varios tipos de transductores, incluidos los ópticos, piezoeléctricos o químicos, (Inamuddin et al., 2019; Pandey & Malhotra, 2019). El crecimiento de la investigación en la ingeniería de materiales y ciencias biomédicas ha creado asimismo un aumento de nueva tecnología de transductores, lo que permite numerosos avances importantes en el campo de los biosensores gracias a la experiencia de la física, la química, la bioquímica y la ingeniería (Zhu et al., 2017).

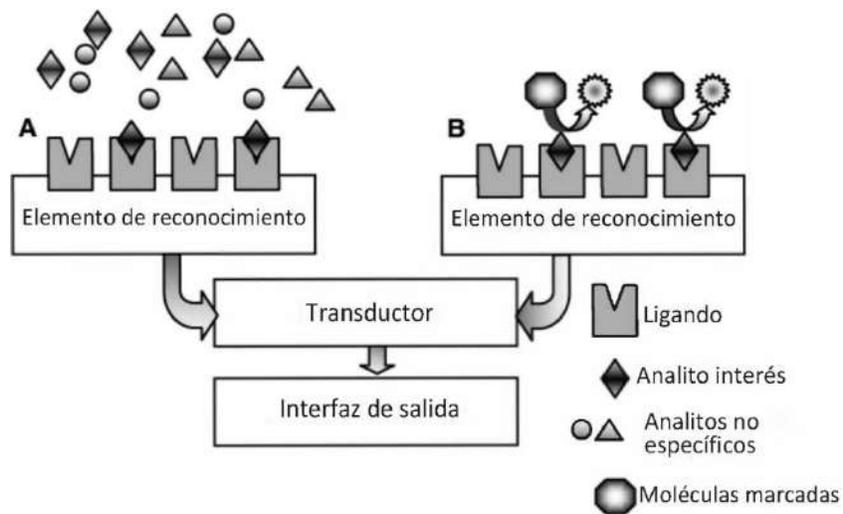


Figura 8 Categorización de los biosensores. a) biosensores de detección directa. b) biosensores de detección indirecta (Rasooly & Herold, 2009).

El sistema de reconocimiento o el bioreceptor es el componente que nos permite categorizar los biosensores en dos grupos de acuerdo con el tipo de reconocimiento que se lleva a cabo (Figura 8), esta categorización nos proporciona información útil en el desarrollo de estos dispositivos. El primer grupo de biosensores es un tipo de sensor de reconocimiento directo sin la necesidad de utilizar etiquetas (p. ej., enzimas, anticuerpos, etc.) para la detección y son dispositivos en los cuales la reacción biológica se mide. Este grupo de sensores suelen medir cambios físicos inducidos por la interacción biológica, como cambios en las propiedades ópticas, mecánicas o eléctricas directamente (Rasooly & Herold, 2009). Los biosensores de reconocimiento directo son más simples y rápidos, sin embargo, existe una limitación en las aplicaciones biomédicas de este tipo de sensores derivado a su baja sensibilidad y especificidad, lo que puede alterar los resultados en un ambiente biológico por sus múltiples y diferentes interferentes. El segundo grupo de biosensores son sensores de detección indirecta, que se basan en elementos secundarios (etiquetas) para la detección. Estos biosensores son dispositivos que requieren una molécula etiquetada para unirse al objetivo en comparación del primer grupo de biosensores, que miden directamente los cambios inducidos por las interacciones biológicas sin la necesidad de una etiqueta (J. Kim, 2018; Rasooly & Herold, 2009). En el caso de los

biosensores de detección indirecta, la unidad detectora consiste en áreas modificadas con sistemas de reconocimiento biológicos complejos y variados, de los cuales los que más destacan en los últimos años en la fabricación de biosensores son las enzimas. Las etiquetas más utilizadas son las enzimas (p. ej., glucosa oxidasa, ureasa, peroxidasa de rábano picante, creatininasa, etc.), existiendo un gran crecimiento de estudios en la investigación sobre su aplicación en biomédica y el desarrollo de biosensores (Inamuddin et al., 2019; Rasooly & Herold, 2009).

Para todo tipo de biosensor, los ligandos de reconocimiento o bioreceptores toman una importancia fundamental en las características de los biosensores y sus aplicaciones. Los bioreceptores es una biomolécula de reconocimiento que se une a un compuesto específico conocido como molécula diana a detectar (analito). Las características más importantes de los bioreceptores son la sensibilidad, afinidad y la especificidad (Rasooly & Herold, 2009).

Existe un gran crecimiento en el desarrollo de numerosos tipos de biosensores y el empleo de esta tecnología es cada vez mayor, integrándose en nuestras actividades de nuestra vida cotidiana y el monitoreo de nuestra salud cada minuto del día, sin embargo, para una aplicación en particular de un biosensor o detectar un analito específico, existe una gran complejidad en la elección de un sistema empleado y adecuado debido a diversos factores, como la especificidad y precisión al biosensor, el tipo de analito específico a detectar, el ambiente en que interactúa este tipo de analito, la naturaleza de la aplicación, el o los biomarcadores utilizados (si se usan), la sensibilidad requerida, el número de canales y dimensiones de los mismos, el costo, la velocidad de detección necesaria, las técnicas utilizadas, el rendimiento, portabilidad, etc. (Rasooly & Herold, 2009).

De acuerdo con la literatura la investigación y el desarrollo de biosensores ha sido un área de mayor interés y crecimiento, emergiendo nuevas técnicas sofisticadas y nuevos materiales que mejoran los diversos factores utilizados en una aplicación en particular de un biosensor. Con el progreso en las mejoras de estas áreas, la aplicación de los

biosensores en biomédica podría convertirse en una herramienta de vital importancia en el campo del diagnóstico y monitoreo de enfermedades. En modo que, la investigación se está encaminando hacia la simplificación de los biosensores para su uso en la detección preliminar desde el hogar y ser operado por el mismo usuario sin la necesidad de conocimientos múltiples ni complejos (Zhu et al., 2017).

Los biosensores se emplean en aplicaciones como el control de enfermedades en fluidos corporales (sangre, orina, saliva, sudor), el descubrimiento de fármacos y la detección de contaminantes (Bhalla et al., 2016; Naresh & Lee, 2021). Los avances recientes del desarrollo de biosensores han popularizado en el campo de la investigación en la última década debido a la amplia gama de aplicaciones de biosensores. Estos grandes progresos de la tecnología e investigación en aplicaciones biomédicas son considerables y con un progreso significativo en la biosensibilidad portátil, con capacidades de monitoreo continuo no invasivo mediante la miniaturización de la electrónica, la integración con microfluidos y alta selectividad, pero todavía existe una falta total de sensibilidad en los electrodos (Naresh & Lee, 2021; Ye et al., 2020).

El biosensor combina un elemento biométrico y un sensor que responde a la sustancia medida, y su función es convertir el cambio observado en una señal medible. Los elementos biológicos pueden ser biocatalizadores (enzimas, microorganismos, materiales tisulares) o ligandos biológicos (anticuerpos, ácidos nucleicos, capas lipídicas). La importancia del desarrollo de biosensores radica en introducir esta herramienta en centros de salud que incluso no están dotados de equipo especializado de instrumentación analítica o que requieren ser operados por personal especializado, inclusive que pueda ser operados por el propio paciente desde su hogar con capacidades de detección no invasivas, no irritantes y en tiempo real (Ye et al., 2020).

6.2.1 características de un biosensor

Cada biosensor debe disponer de ciertos atributos estáticos y dinámicos. Comprender los comportamientos de las características de estos atributos es de vital

importancia porque reflejan el rendimiento de un biosensor altamente efectivo y capaz. Las características más importantes de un biosensor se muestran en la Tabla 5. características más importantes de un biosensor (Bhalla et al., 2016; Kalantar-zadeh, 2013; Naresh & Lee, 2021; Soleymani & Li, 2017; Thévenot et al., 2001).

Tabla 5. características más importantes de un biosensor.

<i>Características</i>	<i>Descripción</i>
<i>Selectividad</i>	La selectividad es la capacidad de un biorreceptor para detectar un analito específico en una muestra que contiene otras mezclas y contaminantes. Esta característica es crucial en el desarrollo de un biosensor en la etapa de seleccionar un biorreceptor. Un biorreceptor puede detectar una molécula de analito particularmente deseada en una muestra con contaminantes no deseados que pueden interferir en la selección si no existe un buen biorreceptor.
<i>Sensibilidad.</i>	La sensibilidad es la cantidad mínima necesaria de un analito que puede detectar un biosensor correctamente. En varias aplicaciones biomédicas se requiere de una gran sensibilidad para detectar bajas concentraciones (ng/mL o fg/mL) en un analito para verificar la existencia de trazas de analito en la muestra.
<i>Tiempo de respuesta</i>	El tiempo de respuesta del biosensor es el tiempo que se toma para obtener el 95% de la señal de respuesta después de haber estado expuesto el receptor biológico con el analito objetivo y depende sensiblemente del transporte del analito a la superficie del sensor.
<i>Estabilidad</i>	La estabilidad es el grado de susceptibilidad a las perturbaciones ambientales alrededor y dentro del sistema de biodetección. La estabilidad es una de las características crucial en el desarrollo de

biosensores donde se requiere un monitoreo continuo. Existen factores que pueden perturbar la estabilidad como la afinidad del biorreceptor (el grado de unión del analito al biorreceptor) y la degradación del biorreceptor con el tiempo. Estos factores pueden causar una perturbación en las señales de salida de un biosensor lo que puede alterar los datos de salida de la concentración medida y puede afectar la precisión y exactitud del biosensor.

Reproducibilidad

La reproducibilidad es la capacidad de generar respuestas idénticas para una configuración experimental duplicada y la precisión (salida similar cuando la muestra se mide más de una vez) y exactitud (capacidad de un sensor para generar un valor medio más cercano al valor real cuando la muestra se mide cada vez) del transductor y la electrónica del biosensor. Las señales de salida brindan alta confiabilidad cuando se cumplen estos parámetros.

Linealidad

La linealidad contribuye al atributo que muestra la precisión de los resultados medidos en relación con una línea recta, es decir, la cercanía de la curva de calibración a una línea recta específica muestra la linealidad de un sensor. Cuanto mayor sea la linealidad, mayor será la detección de concentración del analito. Este atributo de linealidad se asocia con la resolución del biosensor y el rango de concentración del analito. La resolución del biosensor se define por el cambio más pequeño en la concentración del analito para producir un cambio en la respuesta del biosensor. El rango de concentración es el rango lineal objetivo del biosensor el cual la respuesta cambia linealmente con la concentración. Es importante mencionar que el biosensor también puede seguir curvas que no sean lineales derivadas por los parámetros dinámicos.

En el transcurso de los años, diversos biosensores se han desarrollado para la detección de diversos analitos en fluidos biológicos y el análisis clínico rápido, esencialmente el monitoreo en tiempo real puede proporcionar información inmediata a los usuarios que podría facilitar la detección de enfermedades, aumentar las tasas de detección más temprana y la mejora del pronóstico (Inamuddin et al., 2019).

Además, tomando en cuenta las características mostradas en la Tabla 5. características más importantes de un biosensor, los biosensores deben de ser capaces en distinguir entre la molécula diana y las moléculas de fondo sin interés con alta precisión, detectar el analito con la más pequeña presencia de la molécula diana, la respuesta debe de ser reproducible sin fallos, evitar considerablemente los resultados falsos negativos y falsos positivos, resistente contra daños mecánicos y químicos, evitar sistemas de usos complicados de tal forma que al operarse sea fácil de manejar y no requiera personal capacitado, los procesos de análisis deben ser bajos para proporcionar resultados en tiempo real, ser rentable sin comprometer la sensibilidad, la especificidad y otras características de interés dependiendo de la aplicación del biosensor (Bhalla et al., 2016; Inamuddin et al., 2019). De tal forma que las aplicaciones tecnológicas de los biosensores sean aceptadas como una herramienta para las soluciones de problemas clínicos en el control de la salud, se deben de cumplir diferentes criterios importantes y disponer de ciertos atributos mencionados en la Tabla 5. características más importantes de un biosensor (Higson, 2012).

6.2.2 Biomarcadores para daño renal

La ERC avanza y evoluciona en el transcurso de los años, en el que la enfermedad es clínicamente asintomática, lo que dificulta el diagnóstico, la evaluación y el tratamiento de los pacientes, por lo tanto, considerar la importancia de emplear biomarcadores esenciales que estén relacionados a la afección de la función renal para su evaluación y

diagnóstico de la ERC. Los biomarcadores o marcadores biológicos son moléculas endógenas utilizados como un indicador medible cualitativa y/o cuantitativamente de un estado biológico específico para identificar procesos fisiológicos o fisiopatológicos, especialmente relevantes para determinar el riesgo, la presencia o el estadio de una enfermedad (Sakhuja et al., 2021; Younes-Ibrahim & Younes-Ibrahim, 2022). Los biomarcadores pueden ser proteínas, lípidos, miRs (micro-ARN), genes, metabolitos o células presentes en un fluido biológico (Moore, 2020). Los biomarcadores en el área clínica suelen usarse para poder detectar, diagnosticar o monitorear la actividad de enfermedades y evaluar la respuesta terapéutica de un tratamiento (Sakhuja et al., 2021).

En los últimos años ha aumentado la investigación de biomarcadores empleados en patologías para su diagnóstico y evaluación, esto ha cambiado radicalmente la forma en que se emplean técnicas y tecnologías (como microarrays, lab-on a chip, proteómica, genómica, lipomática, metabolómica, etc.) en el diagnóstico y la investigación de enfermedades (Preedy & Patel, 2015). Estos avances han permitido el descubrimiento de nuevos biomarcadores para problemas relacionados con la ERC que se pueden clasificar según las características morfofisiológicas de la nefrona, asociadas con la función renal glomerular y tubular (Preedy & Patel, 2015; Younes-Ibrahim & Younes-Ibrahim, 2022).

Sin embargo, en la actualidad la eGFR sigue siendo el marcador clínico más utilizado para medir la función renal. Desafortunadamente, este marcador tiene varios puntos desfavorables a causa de sus pruebas que pasan a través de métodos tradicionales o convencionales, esto conlleva un mayor tiempo de operación y de respuesta, debido al uso de equipo sofisticado y costoso. Para reducir el tiempo de respuesta, generalmente las pruebas de eGFR se estiman a partir de ecuaciones que estén ligadas a otros marcadores como la filtración de endógenos como la creatinina sérica y la cistatina C (Lopez-Giacoman & Madero, 2015; Preedy & Patel, 2015).

Las enfermedades renales son complejas y heterogéneas, además la evaluación clínica está limitada en la función del glomérulo, la unidad de filtración especializada del riñón.

Este paradigma unidimensional dificulta un diagnóstico óptimo para la ERC y un tratamiento oportuno de la enfermedad, esto desenlaza a mayores problemas que dificultan la situación actual de la enfermedad en la población, como las cifras de la ERC continúa superando el manejo clínico y el diagnóstico de estas condiciones se detectan demasiado tarde en el curso de la enfermedad (W. R. Zhang & Parikh, 2019). Y la tecnología actual de diagnóstico aún está limitada a tratamientos efectivos para frenar la ERC y minimizar el daño renal para cambiar el curso de la enfermedad en disminuir las cifras de morbilidad y la mortalidad asociadas (Fassett et al., 2011; W. R. Zhang & Parikh, 2019)

El desarrollo y el uso clínico de biomarcadores urinarios para ERC, como la creatinina y urea, no han sido calificados para pruebas clínicas, sin embargo, estudios recientes evidencia que la incorporación de estos biomarcadores urinarios puede ayudar a comprender la condición renal (Preedy & Patel, 2015). La orina es muy abundante en biomarcadores útiles para monitorear la condición de salud de un paciente, con excelentes ventajas como la disponibilidad de recolección de muestra por medios no invasivos, lo que alivia la carga de los pacientes que requieren pruebas constantes. Desde este punto de vista fisiológico y debido a que la orina es un producto metabólico excretor del riñón para mantener la calidad y cantidad de los fluidos corporales, además de la disponibilidad de biomarcadores presentes en la orina y una alteración fisiológica en las propiedades de la orina puede representar la presencia de problemas renales (Preedy & Patel, 2015; Younes-Ibrahim & Younes-Ibrahim, 2022). La orina como fuente de biomarcadores clínicos de ERC tiene las siguientes características generales (Preedy & Patel, 2015):

- La orina representa una fuente abundante de biomarcadores para el uso clínico.
- La disponibilidad de muestras se favorece debido a métodos no invasivos.
- Debido a que la orina es un producto que se genera en el riñón, las propiedades de la orina se pueden ver afectado por problemas renales.

- Para reducir la incertidumbre y aumentar la confiabilidad de los resultados, se debe requerir cualquier método corrector.

Además, estudios han demostrado que el uso de biomarcadores urinarios relacionados a ERC, pueden tener grandes ventajas en la aplicación clínica en comparación con biomarcadores tradicionales como la creatinina sérica y eGFR (Preedy & Patel, 2015; Sakhuja et al., 2021). Para optimizar estas ventajas, los biomarcadores tienen ciertas características que depende en gran medida de la enfermedad de interés, sin embargo, existen características generales que son importantes para cualquier biomarcador (Bennett & Devarajan, 2017; Sakhuja et al., 2021):

- Fuentes de fácil acceso para la obtención de la muestra (orina, sudor, saliva, lagrimas, etc.).
- Presentar alta sensibilidad que permita el diagnóstico temprano.
- No invasivo, de respuesta rápida, económicos y medición fácil.
- Alta especificidad; que no se vea afectado por condiciones comórbidas.
- Los cambios de los niveles del biomarcador deben variar para reflejar la gravedad de la enfermedad y la respuesta del tratamiento.
- Tiene que ser convincentes y proporcionar información sobre el mecanismo subyacente de la enfermedad.

Sin embargo, es demasiado complicado que un biomarcador cumpla con todas las características ideales, pero se analiza cada una característica de acuerdo con los requisitos que se necesitan y al método utilizados para el diagnóstico (Bennett & Devarajan, 2017).

Los biomarcadores asociados con la función renal son prometedores para estimar la gravedad y la naturaleza de la lesión renal que evalúan el funcionamiento de los riñones para el diagnóstico de la ERC (Sakhuja et al., 2021). Cada biomarcador renal tiene un papel fundamental y sumamente importante en el diagnóstico preciso de la ERC asociados

con cada proceso biológico relacionado con los riñones, con el fin de evaluar el riesgo y adaptar una terapia de manera más conveniente que mejore los resultados clínicos del paciente.

Durante años, el interés de introducir biomarcadores como la creatinina, urea y el pH para el diagnóstico de la ERC ha revolucionado la investigación y la tecnología de biosensores sustancialmente, incorporándose en dispositivos de biosensores lab-on a chip que permite conseguir enormes propiedades que benefician el diagnóstico temprano y accesible (Gowda et al., 2010; Preedy & Patel, 2015).

6.2.2.1 Urea

La síntesis de urea tiene lugar principalmente en el hígado y es el principal producto final nitrogenado del metabolismo. Se genera a partir del catabolismo de proteínas y aminoácidos y es transportado por la sangre a los riñones donde es eliminado del cuerpo casi exclusivamente por los riñones, en donde se excreta por medio de la orina. Los índices clínicos determinados de la medición de la concentración de urea para estimar la función renal han tenido aplicación clínica desde hace más de 150 años (Gowda et al., 2010b; Higgins, 2016b). El uso de este biomarcador en conjunto con la creatinina es de gran utilidad para el diagnóstico diferencial de la ERC y las afecciones prerrenales en la que una relación de concentración de urea: creatinina cambia (Gowda et al., 2010b).

La urea resalta en la historia de los analitos y biomarcadores utilizados actualmente en la aplicación clínica o en el punto de atención. La disciplina de la patología química o química clínica tiene origen cuando se aplicó la química a la medicina principios del siglo XVIII, cuando el fluido corporal con mayor acceso en esa época (la orina) se utilizó por primera vez en análisis químico. Desde este evento, debido a las características de la orina donde su mayor constituyente no acuoso es la urea, surgió el estudio de este analito. Sin embargo, este hecho de la identidad de la urea con la que se encuentra en la orina se confirmó hasta 1822, y añadido a esto también demostró la presencia de urea en

sangre. Aunque estos avances eran de gran impacto en el análisis químico en la atención médica, la metodología para la determinación de la concentración de urea en sangre no era fiable, sino hasta los primeros años del siglo XX (Higgins, 2016b; Kurzer & Sanderson, 1956). No obstante, a la metodología clínica fiable, ya se conocía que la reducción de excreción urinaria de urea se relacionaba con un deterioro de la función renal y a esto se estableció el empleo de la estimación de la urea con fines clínicos. Con la nuevas aplicaciones y tecnología emergente que se iban desarrollando durante esa época, se estableció un nuevo analito para el diagnóstico clínico de la función renal, la estimación de la creatinina plasmática que se convirtió en el analito destacado para la evaluación de laboratorio de la función renal (Higgins, 2016).

La urea es una molécula orgánica polar, altamente soluble en agua y de carga neutra que comprende un grupo carbonilo (C-O) y dos grupos amino (NH₂) enlazados al C:

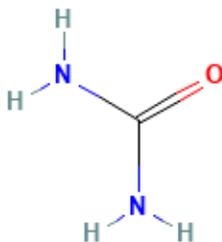


Figura 9. Estructura molecular de la urea; fórmula molecular CO(NH₂)₂; peso molecular 60,056 g/mol (National Center for Biotechnology Information, 2023).

La urea se forma por medio del ciclo de la urea (representa una serie de cinco reacciones enzimáticamente controladas) a partir de amonio, CO₂, aspartato y bicarbonato que comprende del catabolismo de proteínas y aminoácidos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), este proceso tiene lugar exclusivamente en el hígado (Eaton & Pooler, 2006; Higgins, 2016; Nelson & Lee, 2005).

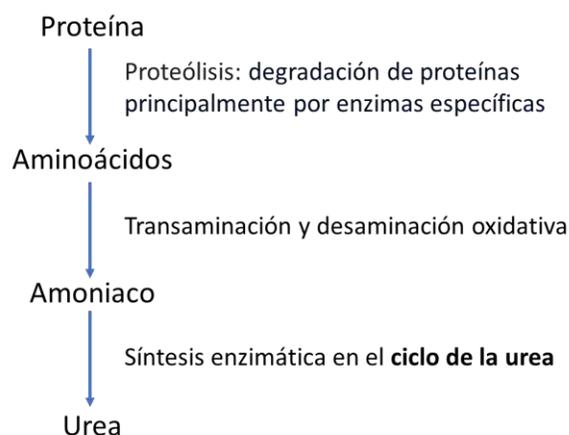


Figura 10. Síntesis de urea durante el proceso de catabolismo de proteína y aminoácidos (Burtis et al., 2012).

Las proteínas químicamente se constituyen de polímeros de cadenas de aminoácidos y son liberados al degradarse la proteína y que a su vez se, los aminoácidos de degradan y liberan nitrógeno en forma de amoniaco (NH₃), que es tóxico. Este exceso de nitrógeno (amoniaco tóxico) resultante del catabolismo de proteínas y aminoácidos se convierte en urea no tóxica y se transporta al hígado y los riñones (Eaton & Pooler, 2006; Higgins, 2016b; Nelson & Lee, 2005). Su eliminación del cuerpo es mediada por dos fuentes; una pequeña cantidad es excretada a través del sudor y del intestino, sin embargo, este medio solo representa menos del 10% y gran parte de la urea producida se transporta en la sangre a los riñones durante la filtración glomerular para eliminarla del cuerpo por vía renal a través de la orina. Esta cantidad de urea está determinada principalmente por la tasa de filtración glomerular (TFG) que da como resultado alrededor del 30-50% de la urea filtrada se excrete en la orina (Higgins, 2016).

El aumento de los niveles de concentración de urea en sangre puede ser causado por una menos excreción de urea en orina, esto se puede enlazar fisiológicamente a la eliminación urinaria reducida de urea causado por una menor filtración de urea durante la ERC. A medida que la TFG disminuye, la excreción de urea urinaria también disminuye y a su vez los niveles de urea en sangre aumentan (Higgins, 2016; Weiner et al., 2015).

Existen nuevos estudios sobre la comprensión del valor clínico de la determinación simultánea de las concentraciones de urea y creatinina y de la relación urea: creatinina para mejorar el diagnóstico clínico. La justificación del uso de estos dos biomarcadores en el diagnóstico clínico para evaluar la función renal en la ERC se sustenta en que los niveles tanto la creatinina y la urea se asocian con TFG, que es el parámetro preeminente para medir la función renal actual; como se mencionó en capítulos anteriores este parámetro y la gravedad de la ERC asociados con la disminución de este parámetro (Higgins, 2016; Mahdiasanti et al., 2019). A medida que la TFG disminuye durante la ERC, repercute en los niveles concentración de urea y creatinina, reduciendo la excreción de estos dos biomarcadores renales (Higgins, 2016).

6.2.2.1.1 Niveles de la urea

Los rangos de referencia tanto de las de las concentraciones excretadas de urea en orina como de urea en sangre están determinadas de la edad, la dieta y el equilibrio de género de la población de referencia, por ende, la decisión de los nefrólogos sobre la participación al modificar estos rangos de referencia tiene una importancia en particular de acuerdo al caso para uso rutinario (Rifai et al., 2018). De acuerdo con los estudios, los intervalos de referencia de concentraciones son (Nemiwal et al., 2022; Nur Ashakirin et al., 2022; Pundir, Jakhar, et al., 2019):

- De urea en sangre/plasma (o suero) es de 2.1 a 7.1 mmol/L; otros estudios sustituyen estos niveles de la urea expresándolos como nitrógeno ureico (BUN) en un intervalo de 6 a 20 mg/dL.
- Para un nivel normal de urea en orina oscila entre los 7 y 20 mg/dL.

Como se mencionó anteriormente, la existencia de un gran crecimiento que analizan los marcadores renales útiles en la clínica para la detección y diagnóstico de la función renal durante la ERC, y actualmente la justificación de la investigación de biosensores en la

aplicación clínica o en el punto de atención que trata de introducir multi-sensado y la relación de estos en una patología; esto trata de introducir más de un analito o biomarcador para su medición simultánea, reduciendo e incluso eliminando falsos positivos ocasionados por factores o procesos biológicos no renales que pueden alterar los niveles de concentración de los biomarcadores específicos a una patología (Higgins, 2016a; Langenfeld et al., 2021; Rifai et al., 2018).

Los niveles de urea son indicativos de función renal y la importancia de disponer de valores referenciales de la urea radica en que la concentración de este metabolito puede ser un indicador de enfermedades renales. La detección de niveles de urea en conjunto con los niveles de creatinina se utiliza para discriminar patologías perrenales (creatinina normal) y renales o post renales (creatinina aumentada) (Cordero et al., 2008).

6.2.2.2 Creatinina

La creatinina (2-amino-1-metil-5H-imidazol-4-ona) es una pequeña molécula orgánica (Figura 11) derivado de dos fuentes, la creatinina endógena es un producto sanguíneo de desecho procedente de los tejidos musculares producida por la descomposición de la creatina y la creatinina exógena proveniente del metabolismo de las proteínas que se encuentran de la carne en la dieta (Dong et al., 2022).

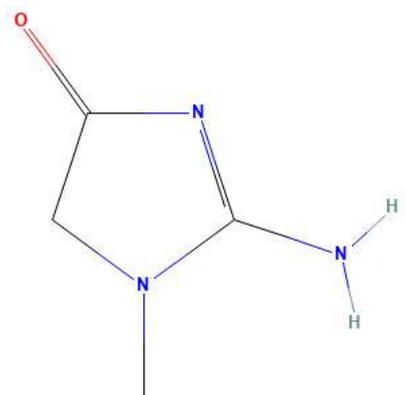


Figura 11. Estructura molecular de creatinina (National Center for Biotechnology Information, 2023).

En procesos fisiológicos del riñón saludables, los niveles de creatinina se conservan normales y se filtra la sangre por medio de los riñones y se excreta por medio de la orina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Cuando la función de los riñones empieza a disminuir, la capacidad de excretar la creatinina se ve alterada y los niveles en sangre y orina empiezan a cambiar, esto puede ser signo de ERC (Molina et al., 2010; Rosado, Edith; Villalobos, 2019).

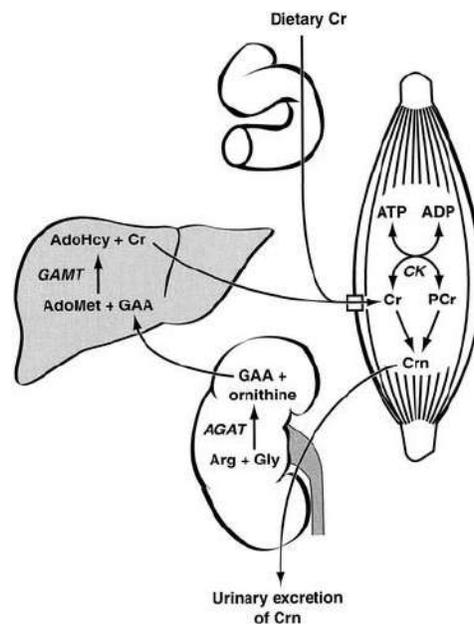


Figura 12. Metabolismo de la creatina y la creatinina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

La adopción global de este enfoque para la ERC, con su énfasis en la rutina y la estimación de la TFG a partir de la creatinina ha mejorado el reconocimiento de la ERC en muchas poblaciones y entornos en los que antes no se la reconocía. Una mayor conciencia de la ERC y los criterios de clasificación uniformes también han llevado a una mejor comprensión de la carga de enfermedades que acompañan a la ERC, un mayor enfoque en el desarrollo de métodos para retrasar la progresión de la ERC y un mayor énfasis en el reconocimiento temprano y la prevención de las complicaciones asociadas con la ERC (Himmelfarb & Ikizler, 2019).

En la práctica clínica, el uso del cambio de las concentraciones de la creatinina en orina y sangre como biomarcadores son prometedores como indicadores de procesos biológicos anormales que se puede reflejar en una afección o una enfermedad, esto nos permite el empleo como un biomarcador útil para la detección, estadificación y seguimiento de la enfermedad renal (Dong et al., 2022; Pundir, Kumar, et al., 2019). La determinación de este biomarcador en fluidos biológicos (orina, sangre, saliva, sudor, lagrimas, etc) por medio de dispositivos que faciliten la medición clínica es cada vez más popular en la sociedad e importante para el diagnóstico de la ERC. Se ha demostrado que ERC disminuye la tasa de filtración glomerular, que puede desequilibrar los electrolitos séricos y subproductos metabólicos, como creatinina y urea (Pundir, Kumar, et al., 2019).

6.2.2.2.1 Valores de creatinina

Si bien, existe un gran crecimiento en la investigación de nuevos biomarcadores para aplicaciones no invasivas, a pesar de ello, aún existe incertidumbre en los datos y la investigación sobre los niveles "altos" o "bajos" de la creatinina en orina. Además de que existen diversas causas que pueden derivar a excreciones de creatinina en orina tan altos como 300 mg/dL. También la elevación de las concentraciones de creatinina puede ser resultado de un cambio en los procesos biológicos asociados a alguna deficiencia renal por ERC, sin embargo, en este escenario los resultados del cambio de la concentración de la creatinina se mantendrán persiste por un periodo de al menos 3 meses, como lo define la NKF y KDIGO (Barr et al., 2005; Cary, 2021).

A menudo se utilizan directrices de las concentraciones de creatinina para determinar si la muestra de orina es válida; determinadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se recomiendan muestras de creatinina con concentraciones en orina mayores a 30 mg/dL, si estas concentraciones son menores, la muestra se determina como demasiada diluida y se debe recolectar otra orina. De la misma manera, la OMS recomienda concentraciones de creatinina menores a 300 mg/dL, si sobrepasa este límite se aconseja recolectar otra orina (Barr et al., 2005).

Los niveles normales de creatinina en suero y plasma son:

- En varones es de: 0,7 - 1,3 mg/dL (debido a que la masa muscular es mayor) y en mujeres es de: 0,6 - 1,1 mg/dL: Durante el estado grávido la eliminación creatinina se incrementa, lo que se traduce en niveles séricos más bajos (American Kidney Fun (AKF), 2023; Cordero et al., 2008; Rodríguez de Cossío & Rodríguez Sánchez, 2011).

Los niveles normales de creatinina en orina son:

- Algunos estudios realizados muestran que el rango de los niveles de creatinina en orina es de alrededor de 20 a 275 mg/dl en mujeres y de 20 a 320 mg/dl en hombres (Fox et al., 2021; Kwon & Na, 2014).

La urea y la creatinina, de acuerdo con algunos estudios comparativos si los niveles de estos biomarcadores son anormales o si se sabe que el paciente tiene una enfermedad subyacente que afecta los riñones, como diabetes o presión arterial alta, las pruebas de creatinina y urea pueden usarse para controlar la disfunción renal y la eficacia del tratamiento (Tricoli & Neri, 2018; Ye et al., 2020).

6.2.2.3 pH

La evaluación de pH es una medida de la acidez o la alcalinidad que va en un rango de 0 a 14, en esta escala de pH el 7 representa un estado neutro, en tanto que si es mayor de 7 se considera base o alcalino, mientras que si es inferior a 7 indica acidez ((Mesmer & Holmes, 1992). La medición de pH de la orina es un indicador clínico que mide la acidez de la excreción de la orina para la evaluación de pacientes con alteraciones clínicas. Diferentes estudios han demostrado la asociación de un pH alto y bajo con diferentes patologías, una de ellas se relaciona con alteración de los riñones que puede indicar problemas causada por la ERC (Landry & Bazari, 2012; Rifai et al., 2018).

Normalmente el pH de la orina es ligeramente ácido, alrededor de los 6, sin embargo, varios profesionales e investigadores han establecido un rango normal de pH en orina de 4.5 a 7.8 y normalmente se obtiene un pH alcalino después de ingerir algún alimento para equilibrar la excreción de ácido gástrico que aumenta en el proceso digestivo, y esto a su vez aumenta el pH de la orina (He et al., 2022; Landry & Bazari, 2012). Otros estudios han definido la orina ácida con un pH inferior a 5.5 (He et al., 2022). Cuando los niveles de pH están fuera de este rango normal (4.5 a 7.8), existe una alta posibilidad de estar en riesgo de tener un cálculo renal, una infección urinaria, un problema relacionado con la ERC (National Kidney Foundation, 2014).

El pH urinario mayor a 7 se considera muy alcalino y sugiere una gran relación de una infección que provoca la división de la urea, y por ende las concentraciones de esta y de los niveles de amoníaco (NH_3) se ven alteradas (Clarkson et al., 2010; Kraut & Madias, 2012). Un pH urinario más bajo ($\text{pH} < 5,0$) se considera un pH ácido de la orina, y esta comúnmente relacionado con la prevalencia de alteraciones clínicas complicadas de gran impacto sanitario como la diabetes y la ERC. La disminución de pH a un estado ácido se produce principalmente por dos factores (Kamel et al., 2002; Ogawa et al., 2015):

- una mayor tasa de secreción distal hidrógeno (H^+), esto aumentan los de iones de H^+ que después se excreta en la orina, este factor se debe al incremento de H^+ en la sangre (acidosis) o al incremento de la secreción de H^+ de los túbulos renales a la orina.
- El segundo factor podría deberse a una menor disponibilidad de NH_3 en el compartimento intersticial medular, esto representa la disminución de la eliminación de H^+ urinario debido a una disminución de suministro de amonio (NH_3) a la orina.

Como se mencionó en capítulos anteriores, la ERC influye en la alteración de los niveles de urea y amoníaco, y esto a su vez, contribuye a la alteración del pH en la orina, principalmente la disminución de este. Existen investigaciones recientes que informan la

relación de la disminución de pH urinario y la ERC, esto permite utilizar esta alteración de pH como un factor predictivo de ERC. Estos informes recientes de la disminución de pH utilizado como un biomarcador, tiene un gran valor clínico significativo para el diagnóstico o predecir trastornos derivados de la ERC (Ogawa et al., 2015).

Los resultados de *He et al* respaldan la investigación clínica del pH ácido en la orina en pacientes con ERC, donde publicó sus resultados de un modelo de análisis de regresión logística que muestran un factor de riesgo significativo de padecimiento de ERC en la población con un pH urinario mayor a 5, en comparación con la población que tenía un pH entre 6.2 y 6.9 (He et al., 2022). Y otro estudio del 2012 informo que existe una mayor presencia de la ERC en pacientes con un pH urinario en ayunas entre 5.0 y 5.5, principalmente en ERC en estadio 3, y otros estudios informaron que un pH de la orina bajo es un biomarcador útil para predecir el daño renovascular en pacientes diabéticos que pueden conducir a una ERC (Tutak & Findikli, 2021). Estos resultados se complementan y sustentan con otras investigaciones que informan que la disminución de un pH a ácido, principalmente por el primer factor de la lista anterior, se relaciona con una tasa acelerada de la disminución de la TFGe entre los hipertensos con ERC (He et al., 2022; Kamel et al., 2002; Ogawa et al., 2015; Scialla et al., 2012; Tutak & Findikli, 2021).

En la ERC contribuye al daño estructural glomerular, lo que significa la pérdida de la masa nefronal o el progresivo deterioro de las nefronas funcionales, esto aumenta la excreción de ácido para compensar la pérdida de nefronas que, esto da como consecuencia el daño tubulointerstitial y contribuye a la progresión de la ERC (He et al., 2022; Ogawa et al., 2015).

El análisis clínico de la orina tiene un gran impacto en la historia de la medicina y, esto ha sido favorecido y respaldado por el enorme crecimiento científico en el desarrollo de tecnología de biosensores en el punto de atención. Con este soporte científico y tecnológico, el análisis de orina muestra una variabilidad biológica considerable y facilita un informe significativo sobre la presencia y actividad sobre la ERC, además se puede

emplear en pruebas adyuvantes en el diagnóstico de infección urinaria y alteraciones en la función del riñón causadas por otras patologías o enfermedades (Rifai et al., 2018; Tutak & Findikli, 2021). Y un análisis de pH en la orina en la aplicación clínica para el diagnóstico de la ERC muestra la capacidad del funcionamiento del riñón para expresar la concentración normal de hidrogeniones en la sangre, por ende, el análisis favorece en análisis clínico dado que no son invasivas y además reducen los costos y tiempo de respuesta en comparación con el análisis de sangre (Ogawa et al., 2015; Tutak & Findikli, 2021).

6.2.3 Enzimas como biorreceptores en biosensores catalíticos

6.2.3.1 Creatininasa

La creatinina amidohidrolasa, también conocida como creatininasa, es una enzima presente en los microorganismos, que cataliza reversiblemente la hidrólisis de la creatinina en creatina (Figura 13). Y con respecto a la función, la enzima pertenece a la familia de las enzimas amidohidrolasas cíclicas que actúan sobre enlaces amida (sobre enlaces carbono-nitrógeno que no sean enlaces peptídicos) (Beuth et al., 2003). La concentración de creatinina está presente principalmente en el citoplasma y las mitocondrias del tejido cerebral, músculo esquelético, músculo cardíaco y músculo liso, y es una cinasa importante relacionada con el movimiento de energía intracelular, la contracción muscular y la regeneración de ATP (Beuth et al., 2003; Rikitake et al., 1979).

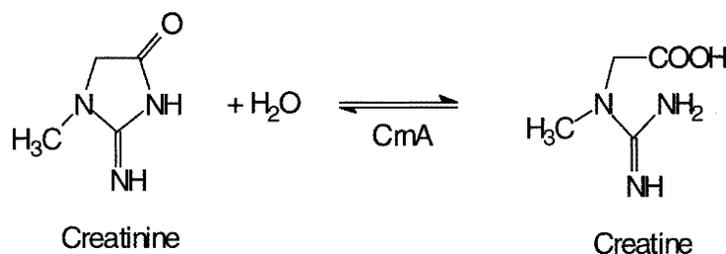


Figura 13. Conversión creatinina – creatina (Beuth et al., 2003).

La creatinina amidohidrolasa, también denominada "creatininasa" o "creatinina hidrolasa" es una enzima binuclear Zn^{2+} de amplia distribución que se intercambia abundantemente y que es causante de la hidrólisis de creatinina para formar creatina. De acuerdo con Berberich et al., la reacción de la creatininasa está representada según el esquema presentado en la Figura 14, donde se muestra la modificación química de la misma (Berberich et al., 2005). Esta enzima está conformada por una gran familia de proteínas que está constituida por > 11.000 secuencias de proteínas, y en esta familia se hallan las dos subfamilias deformilasa FAPy y la micofactocina peptidasa, ambas asociadas con la biosíntesis de cofactores o cofactores putativos (Ayikpoe et al., 2018). Su estructura y secuencia permiten que utilicen la creatinina como fuente de carbono y nitrógeno (Beuth et al., 2003).

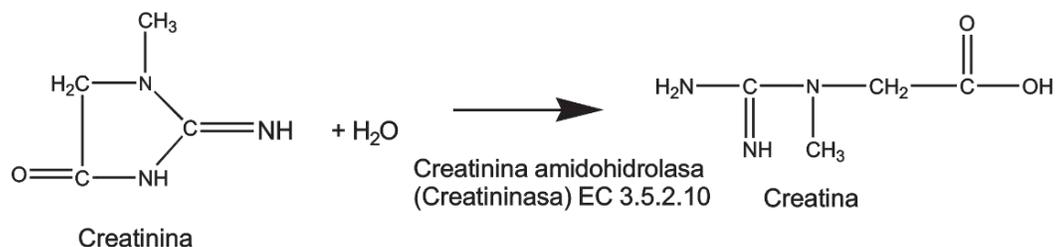


Figura 14. Hidrólisis de creatinina catalizada por creatinina amidohidrolasa (Berberich et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, la creatinina amidohidrolasa cataliza la ruptura hidrolítica reversible de la amida cíclica creatinina para producir creatina, lo que refiere a que, con respecto a su función esta enzima pertenece a la familia de las amidohidrolasas cíclicas que actúan sobre los enlaces amida, y es la primera enzima de un sistema de enzima de la descomposición en cadena de la creatinina mostrada en la Figura 15 (Beuth et al., 2003; Pundir, Kumar, et al., 2019; J. Zhang & Chen, 2021).

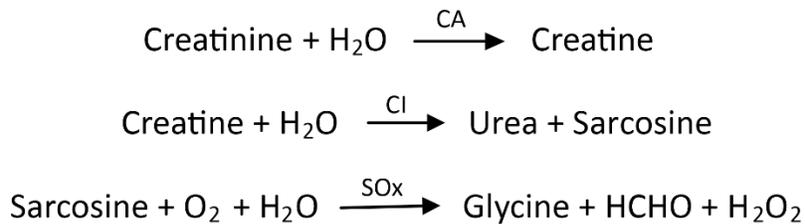


Figura 15. sistema basado en tres enzimas, creatinina amidohidrolasa (CA), creatina amidinohidrolasa (CI) y sarcosina oxidasa (Sox) (Pundir, Kumar, et al., 2019).

Los microorganismos que involucren esta vía metabólica en su sistema utilizan principalmente la creatinina como fuente de nitrógeno para llevar a cabo actividades bioquímicas (J. Zhang & Chen, 2021). Acorde a Beuth et al., hasta el momento se ha descubierto creatininasa en varias especies de arqueas y bacterias como *Alcaligenes* y *Pseudomonas*, y dichas especies admiten que sus células utilicen creatinina como fuente de carbono y nitrógeno como se mencionó anteriormente (Amini-Bayat & Bakhtiari, 2017).

Por el contrario, se ha reportado en la literatura que los mamíferos no tienen una función de la actividad creatininasa, por ende, la creatinina se derivó de forma de una reacción de ciclación no enzimática de la creatina y el fosfato de creatina (una fuente del grupo fosfato de alta energía en el músculo) a un ritmo constante que se absorbe en los riñones y se libera en la orina (Amini-Bayat & Bakhtiari, 2017; Beuth et al., 2003). De acuerdo con este concepto, hallazgos experimentales plantean una relación entre las alteraciones del metabolismo de la creatinina y diversas enfermedades renales, de modo que medir la concentración de creatinina en sangre y orina brinda información importante sobre la ERC (Beuth et al., 2003). Su medición y monitoreo se realiza a partir de reacciones enzimáticas acopladas que involucran creatininasa, lo que quiere decir que esta enzima es muy trascendente en el diagnóstico médico; por ejemplo, una de las formas de realizar dicha medición es a partir del uso de biosensores, los cuales actualmente son objeto de estudio en diversas e intensas investigaciones debido al interés técnico en la estructura de la creatinina amidohidrolasa (Beuth et al., 2003; Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). El empleo

de métodos enzimáticos en dispositivos de biosensores mejora significativamente tanto la exactitud, como también la precisión de las mediciones de creatinina (Amini-Bayat & Bakhtiari, 2017).

6.2.3.2 Creatinasa

La creatinasa o también llamada creatina amidinohidrolasa es una enzima catalítica que hidroliza la creatina en presencia de H₂O para producir sarcosina y urea Figura 16. Es una enzima homodimérica (formadas por dos monómeros idénticos) con un dominio N-terminal pequeño y un dominio C-terminal grande (Hosaka et al., 2003). Los dos sitios dinámicos están en la interfaz que convergen los dos monómeros y es simplemente dinámico (Hosaka et al., 2003; A. Khan et al., n.d.). Por su función y estructura, esta enzima se clasifica como miembro de la familia de enzimas hidrolasas, aquellas que actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno distintos de los enlaces peptídicos, particularmente en las amidinas lineales (Hosaka et al., 2003).

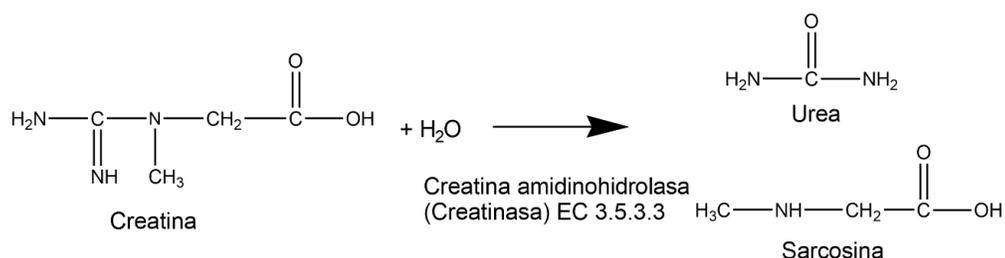


Figura 16. Hidrólisis de creatina catalizada por creatinasa (Berberich et al., 2005).

La creatinasa es una enzima amidinohidrolasa, y esta actúa en la catálisis de la eliminación del grupo guanidina de la molécula de creatina Figura 17, específicamente actúa en la escisión hidrolítica de los enlaces C-N a través de intermedios tetraédricos (Todd et al., 2001).

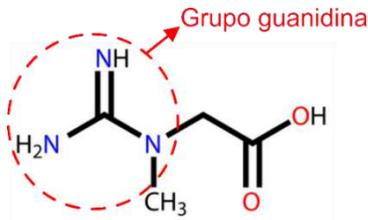


Figura 17. grupo guanidina de la molécula de creatina.

6.2.3.3 Sarcosina oxidasa

La sarcosina oxidasa (sarcosina oxidasa monomérica) es una flavoenzima que cataliza la sarcosina para dar como producto glicina, formaldehído (CH₂O) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como se muestra en la Figura 18 (Wagner & Jorns, 2000).

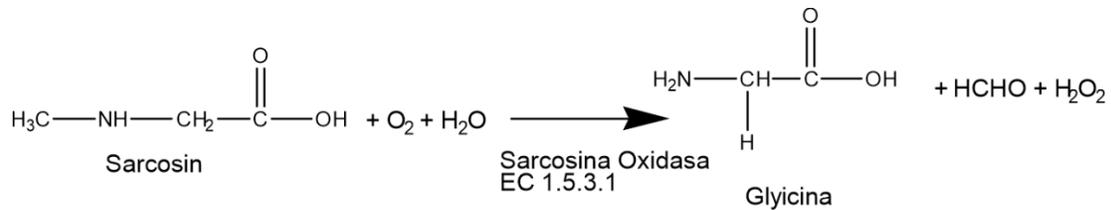


Figura 18. Hidrólisis de sarcosina catalizada por sarcosina oxidasa monomérica (Berberich et al., 2005).

La sarcosina oxidasa es una proteína con 1 mol de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) unido covalentemente. De acuerdo con el grupo de investigación de Willie et al, las enzimas de sarcosina oxidasas se han descrito en dos clases principales de enzimas (Willie et al., 1996):

- Enzimas heterotetraméricas: estas enzimas son proteínas que contienen flavina tanto covalente como no covalente.
- Enzimas monoméricas: son enzimas que contienen solo flavina covalente

Entre las diversas enzimas que integran en la familia de sarcosina oxidasas, las más utilizadas en la investigación de aportación clínica son las de clase de sarcosina oxidasa

monomérica, especialmente las que contienen solo flavina unida covalentemente (Damião, 2019; Guo et al., 2006). La sarcosina oxidasa monomérica es una proteína oxidorreductasa que catalizan la desmetilación oxidativa de un enlace N-metilamina de aminoácidos de la sarcosina (N-metilglicina) que conducen a la formación de especies de imina intermedias, este producto es un grupo funcional inestable que experimenta espontáneamente reacciones no enzimáticas que luego se descomponen en diferentes reacciones espontáneas como hidrólisis, desmetilación o también formación de enlaces C-C, ocasionando una serie de productos diferentes como se muestra en la Figura 19 (Damião, 2019; Lahham et al., 2021).

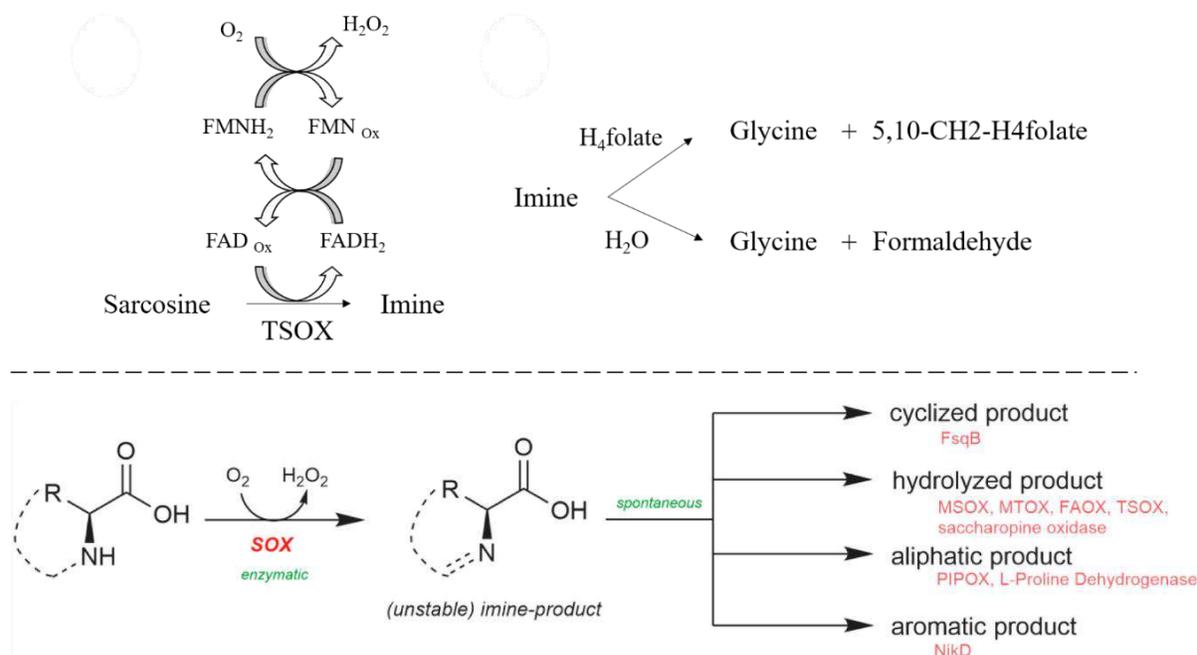


Figura 19. Reacción redox de sarcosina para producir especies de imina (Damião, 2019; Lahham et al., 2021).

La mayor parte de estas enzimas utilizan oxígeno como aceptor de electrones. De acuerdo con la literatura de las características de la flavoenzima de sarcosina oxidasa,

generalmente las reacciones de oxidación catalizadas por estas enzimas se pueden dividir en dos semirreacciones (Lahham et al., 2021):

1. semirreacción reductora: las enzimas de sarcosina oxidasa oxidan un enlace carbono-nitrógeno del sustrato mediante la transferencia de un hidruro equivalente a la flavina, esto conduce a la formación de una especie de imina intermedia.
2. semirreacción oxidativa: la base nitrogenada flavina es oxidada por un aceptor de electrones. La flavina reducida provocará directamente una reacción con el dióxígeno lo que producirá peróxido de hidrógeno en el caso de las flavoproteínas oxidasas

La oxidación de sarcosina en los mamíferos es mediada por una deshidrogenasa mitocondrial que está estrechamente vinculada a la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. En los mamíferos, la enzima de sarcosina deshidrogenasa participa en la eliminación oxidativa del grupo metilo de la sarcosina (Reuber et al., 1997). Estas enzimas están ampliamente presentes en la naturaleza, principalmente se han encontrado en varias especies que van desde bacterias hasta *Homo sapiens*, y su participación en varias vías biológicas se ha estudiado considerablemente por su importancia en estos procesos biológicos (Lahham et al., 2021b).

Y como se mencionó anteriormente, la sarcosina oxidasa monomérica es una enzima oxidorreductasa con muchas aplicaciones clínicas, esta enzima por su participación en diferentes procesos metabólicos cuando es combinada con otras enzimas como la creatinasa y la creatininasa, tiene la capacidad de usarse como una herramienta de diagnóstico para evaluar la función renal, por ende, la sarcosina oxidasa se considera una enzima diagnóstica esencial para la cuantificación del nivel de creatinina en diferentes fluidos biológicos (Damião, 2019; Willie et al., 1996).

desencadena un rápido aumento general del pH del ambiente correspondiente a la producción de amoníaco como producto. Este efecto de alcalinización es utilizado por numerosos estudios científicos para la cuantificación de la urea para aplicaciones clínicas para el diagnóstico y seguimiento después del tratamiento, y es un candidato para uso como biomarcador de ERC (Gowda et al., 2010; Konieczna et al., 2012; Mazzei et al., 2020).

6.3 Inmovilización de enzimas

La demanda global actual de la atención sanitarias ha incrementado en los últimos años, y consigo mismo se han mejorado la productividad de herramienta, técnicas, protocolos y dispositivos que mejoren la atención médica. Esto converge a la investigación y desarrollo de dispositivos portátiles para mejorar el diagnóstico clínico, por ende, el desarrollo de biosensores analíticos tiene un impacto significativo en esta demanda global de la atención sanitarias (Datta et al., 2013).

De acuerdo con *Oujji et al.* la inmovilización enzimática es considerada el primer y más importante requisito para el desarrollo de un bioensayo, (Oujji et al., 2014). El uso estos biocatalizadores (enzimas) en la vida moderna ha impactado favorablemente en las aplicaciones de diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades (Hassan et al., 2019). Las enzimas mejoran los procesos de bioensayos aumentando la capacidad de velocidad de reacciones químicas sin cambiar el equilibrio entre reactivos y productos, y también sin modificarse ni consumirse totalmente debido a las interacciones (Hassan et al., 2019). La enzima inmovilizada aumenta su velocidad de reacción a más de un millón de veces; en consecuencia, para tener lugar los procesos bioquímicos de las reacciones tardaban un periodo largo en completarse en ausencia de estimulación (algunas tardan años en completarse) pueden ocurrir en fracciones de segundo en presencia de la enzima adecuada y las características adecuadas de la inmovilización (Hassan et al., 2019; Wahba & Hassan, 2017).

Estos requisitos son indispensables para facilitar el desarrollo económico y a gran escala de un dispositivo confiable para las pruebas de ensayo clínico. La inmovilización de enzimas es una tecnología que tiene la capacidad de conseguir una actividad catalítica y especificidad, además, mejora la estabilidad de la enzima al pH y la temperatura, obteniendo enzimas más estables, activas y reutilizables (Datta et al., 2013; Xu et al., 2022).

El principio de concepto de inmovilización de enzimas surgió cuando se descubrió que las enzimas podían realizar catálisis y actualmente la inmovilización de enzimas se puede definir como moléculas de enzimas físicamente confinadas o localizadas sobre o dentro de un soporte o matriz con retención total o parcialmente mayor de sus actividades catalíticas, y que pueden ser separadas y reutilizables (Aggarwal & Pundir, 2016; Hassan et al., 2019; M. R. Khan, 2021). De acuerdo con esta definición, el objetivo principal de la inmovilización enzimática es asociar este biocatalizador a una matriz insoluble para ser separada fácilmente después de su aplicación y que tenga la capacidad de volver a ser reutilizables en condiciones estabilizadas (Hassan et al., 2019).

La tecnología de inmovilización de enzimas es una herramienta muy extendida que ha evolucionado enormemente para aumentar varias propiedades mejoradas y adicionales con respecto a su estado soluble, como la disponibilidad de enzimas más estables (en condiciones físicas y químicas), mayor actividad enzimática, reducir la pérdida de enzimas durante el proceso con la posibilidad de reutilización, más tiempo de almacenamiento, permite un control más sencillo del proceso, una amplia gama de actividades en presencia de varios factores físicos y químicos, así como una recuperación más fácil del producto lo que significa beneficios económicos (Dwevedi, 2016; Sastre et al., 2020).

La inmovilización de enzimas integra un sistema el cual constituye principalmente de tres componentes: las enzimas, la matriz o soporte y el método de unión de la enzima a la matriz (Hassan et al., 2019; M. R. Khan, 2021). Las características del soporte utilizado son fundamental en el proceso de inmovilización ya que esto amplificara la estabilidad

operativa del sistema de inmovilización, beneficiara en las propiedades del sistema catalítico producido y determinara la eficacia del sistema de inmovilización enzimática (Hassan et al., 2019; Zdarta et al., 2018).

Aun cuando existe un crecimiento potencial en la investigación de la inmovilización de enzimas, no existe un soporte universal; sin embargo, existen muchas características recomendables que se deben considerar al seleccionar el material utilizado para la matriz o soporte resumidas en la

Tabla 6 (Brena et al., 2013; Zdarta et al., 2018).

Tabla 6. Características de los materiales del soporte o matriz.

Las principales características requeridas de los materiales utilizados en el soporte para una inmovilización eficaz de enzimas

- Estabilidad química y térmica.
- Insolubles en condiciones de reacción.
- Alta afinidad por las enzimas.
- Biocompatibilidad.
- Presencia de grupos funcionales reactivos.
- Alta disponibilidad y bajo costo.

Las propiedades físicas de las enzimas inmovilizadas son afectadas por el material de soporte, como la resistencia a la compresión, hidrofilia, inercia frente a las enzimas, biocompatibilidad, resistencia al ataque microbiano y disponibilidad a bajo costo. En general, las propiedades físicas del sistema de la inmovilización de enzimas son las del material de soporte (Datta et al., 2013; M. R. Khan, 2021). El soporte utilizado para la inmovilización de enzimas también afecta las propiedades químicas de la enzima, como el pH (Keyes & Saraswathi, 1985). Estos cambios forman la base de un gran número de

aplicaciones y soluciones a diversos problemas relacionados con los sectores industrial, medioambiental y salud, como la síntesis de complejos intermedios de fármacos; remediación de agua, aire y suelo contaminados; y diagnóstico de enfermedades y su tratamiento (Dwevedi, 2016).

La selección del material de soporte apropiado depende en gran medida del tipo de las enzimas, así como del tipo y las condiciones del proceso catalítico, de ahí que las propiedades tanto de la enzima como el material del soporte utilizado afectaran el proceso y determinarían las propiedades de la reacción soportada por la enzima inmovilizada. Esta interacción entre enzima y soporte, mejoran principalmente las propiedades mecánicas, químicas, bioquímicas y cinéticas específicas de la enzima inmovilizada (Brena et al., 2013; Hassan et al., 2019). Y a efecto de las pautas anteriores y de la revisión de la evidencia científica el paso preliminar para inmovilizar la enzima es determinar el material de soporte en función de la aplicación final, y el siguiente paso es elegir el método de inmovilización (Hassan et al., 2019; Zdarta et al., 2018).

La selección del método de inmovilización adecuado desempeña un papel clave en el proceso de inmovilización, puesto que determinara la actividad y las propiedades de la enzima en una reacción particular (Hassan et al., 2019; Lee et al., 2017). A efecto de la revisión de la literatura, los métodos de inmovilización se pueden dividir en dos categorías generales de acuerdo con el tipo de unión entre el soporte de inmovilización y la enzima descritos en la Tabla 7 (Costa et al., 2005; Hassan et al., 2019; Mohamad et al., 2015; Ozkan et al., 2023).

Tabla 7. Principales categorías de inmovilización de enzimas.

Métodos de inmovilización	
<i>Métodos químicos</i>	Se caracterizan por interacciones monovalentes más débiles; un ejemplo de

ellos son enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, unión por afinidad, interacciones hidrofóbicas, unión iónica de la enzima con el material de soporte o contención mecánica de la enzima dentro del soporte.

Métodos químicos

En estos métodos se involucran la formación de enlaces covalentes debido por enlaces éter, tioéter, amida o carbamato entre la enzima y el material utilizados para el soporte

De esta categorización se extienden cinco métodos principales disponibles para la inmovilización de enzimas: adsorción, unión covalente, atrapamiento, encapsulación y reticulación (Figura 22) (Bernal Juarez, 2013; Hassan et al., 2019; Sánchez-Ramírez et al., 2014; Xu et al., 2022):

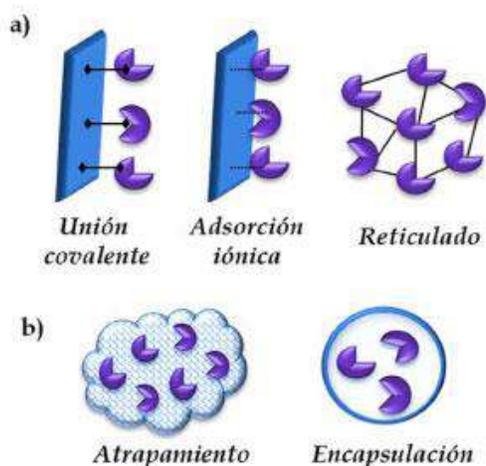


Figura 22. Esquemas de las técnicas de inmovilización de enzimas más comunes. a) unión química. B) retención física (Sánchez-Ramírez et al., 2014).

El método utilizado para la inmovilización de enzimas debe priorizar la actividad enzimática máxima y conservar la conformación tridimensional de la enzima, especialmente en su sitio activo (Oujji et al., 2014). Se han evaluado considerablemente todos los métodos de inmovilización enzimática en numerosas investigaciones y publicaciones científicas, lo que evoluciona continuamente desarrollando nuevos materiales de soporte utilizados mejorando los métodos; estos métodos descritos en la Tabla 8 exponen sus ventajas y desventajas de acuerdo a la literatura (Bernal Juarez, 2013; Brena et al., 2013; Hassan et al., 2019; Mohamad et al., 2015; Ozkan et al., 2023; Sánchez-Ramírez et al., 2014; Xu et al., 2022):

Tabla 8. Tipos de inmovilización de enzimas.

Método

<i>Unión covalente</i>	Es el método más utilizado para la inmovilización de enzimas. Consiste en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccione con nucleófilos de las enzimas (cadenas laterales de lisina [grupo ϵ -amino], cisteína [grupo tiol] y ácidos aspártico y glutámico [grupo carboxílico]).
<i>Ventaja:</i>	Proporcionan una unión enzima-soporte es muy fuerte y debido a su gran estabilidad de los enlaces, la enzima no es liberada en el entorno de reacción permitiendo su reutilización con más frecuencia que con otros métodos de inmovilización disponibles.
<i>Desventaja:</i>	Pérdida de actividad enzimática. Requiere de protección del centro activo de la enzima para evitar su alteración.
<i>Adsorción iónica</i>	Es uno de los métodos de inmovilización reversibles más simples que implica en la unión de la enzima al soporte a través de fuerzas débiles mediante interacciones iónicas (a través de enlaces salinos),

fuerzas de Van der waals y por puente de hidrógeno.

Ventajas:

Fácil y rápido de realizar; usualmente preserva la actividad catalítica de la enzima, es un método reversible y por lo que resulta económicamente atractiva.

Desventajas:

La unión soporte-enzima es muy débil y se forman derivados pocos estables lo que puede existir problemas de pérdida de enzima

Reticulado o entrecruzamiento

Es un método irreversible que no requiere de un soporte para evitar la pérdida de enzima en la solución del sustrato y consiste en el uso de reactivos bifuncionales (dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos o diaminas activadas con carbodiimida) que origina uniones intermoleculares entre las moléculas de la enzima.

Ventajas:

Enzimas insolubles con enlaces resistentes a condiciones extremas de pH y temperatura. Estabilidad de la enzima debido a su rigidez de la estructura.

Desventajas:

Algunos reactivos de reticulación pueden desnaturalizar la enzima.

Atrapamiento

Es un método irreversible más sencillo de inmovilización de enzimas e implica que las enzimas queden restringidas físicamente en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa o dentro de una red polimérica (polímero orgánico, sílica sol-gel), que permite que el sustrato y los productos pasen, pero retienen el enzima.

Ventajas:

Mejorar la estabilidad de la enzima sin pérdida de actividad y normalmente se evita la desnaturalización ya que la enzima no sufre alteraciones químicas entre el material de soporte.

Desventajas:

La enzima puede desprenderse del soporte y los problemas de

	transferencia de masa a través membranas o geles
<i>Encapsulación</i>	Este es un subtipo de método de atrapamiento que consiste en una cubierta de membrana semipermeable que permite que reaccione con nucleófilos de las enzimas.
<i>Ventajas:</i>	Tiene las mismas ventajas que el método de atrapamiento, pero se este método posibilita la encapsulación simultánea de más de un tipo de enzimas permitiendo llevar a cabo reacciones que suceden en múltiples pasos.
<i>Desventajas:</i>	Existen muchas enzimas y las células en las soluciones son lo suficientemente grandes como para que no puedan salir ni entrar en la cápsula

En general de los métodos físicos y los métodos químicos es que en los físicos da como resultado una pequeña pérdida de actividad enzimática; sin embargo, existen riesgos de desorción y fuga de enzimas. En cuanto los métodos químicos la estabilidad aumenta por sus enlaces químicos, pero conduce a una pérdida de actividad enzimática (Xu et al., 2022). Con las diversas contribuciones científicas surgen nuevas estrategias y oportunidades para seleccionar un método de inmovilización junto con los materiales apropiados del soporte de acuerdo con nuestra aplicación de interés que sin duda producirán un resultado significativo con la capacidad de desarrollo de procesos multi-enzimáticos y estables (Mak & Ho, 2022; Wilson et al., 2023).

Al finalizar el proceso de inmovilización enzimática, el electrodo modificado con la enzima y matriz interactúan con el analito sobre el sistema aplicado, esto nos proporcionara una señal de respuesta en el cambio de una propiedad física forma de corriente, voltaje, cromogénico, oxígeno, etc. (Narang et al., 2017).

6.4 Biosensores microfluídicos colorimétricos

La miniaturización de dispositivos con operaciones bioquímicas busca diferentes ventajas como la disminución de costes, la ergonomía, la velocidad de diagnóstico o la alta sensibilidad, es por esto por lo que cada vez se desarrolla más tecnología microfluídica, pues permiten recrear procesos bioquímicos a una escala microscópica (Rapp, 2017). Los dispositivos microfluídicos son de un tamaño tan reducido que los principios físicos de los fluidos gobiernan su comportamiento, por esto se toma en cuenta un gran número de ramas de la física, desde la dinámica de fluidos la difusión, la relación superficie-volumen, la tensión superficial, la capilaridad, etc. Y estas, están estrechamente ligada a las ciencias biológicas (Bragheri et al., 2016; Juárez Jiménez, 2018).

La definición más aceptada para la microfluídica es definida como un campo de estudio que se centra en el diseño, la fabricación y la formulación de dispositivos y procesos que manipulen y controlen fluidos con volúmenes muy pequeños a través de una red de microcanales que estén sujetos a condiciones químicas y mecánicas que mimetizan funciones biológicas (Narang et al., 2017). Y el término normalmente se acepta cuando se habla de microfluidos y cuando las cantidades que se manipulan son pequeñas, independientemente de que alguna otra parte del dispositivo sea relativamente más grande. Es decir, la microfluídica es el conjunto de actividades en que se toma ventaja o involucra el uso y control del fluido a escalas inferiores a la milimétrica (Fernández Rivas, 2008).

La importancia de la macroescalas del dispositivo radica en la aplicación de interés, las dimensiones van desde milímetros hasta micrómetros considerando el tamaño de la partícula del fluido que lo atraviesa, volumen del fluido y sus características de este. Los fluidos más comunes en la aplicación de dispositivos microfluídicos involucran soluciones de proteínas, soluciones de anticuerpos, soluciones tampón, suspensiones bacterianas o celulares y otras muestras biológicas (p. ej., sangre, sudor; orina; lagrimas, saliva) (Narang et al., 2017). Por medio de la miniaturización en dispositivos microfluídicos para el área de

análisis clínico, se han desarrollado e integrado varios biosensores con el empleo de procesos bioquímicos de muestras biológicas, sus reacciones y el análisis en un dispositivo con dimensiones de unos pocos centímetros, que también se denominan laboratorio en un chip (LOC, por sus siglas en inglés) (Inamuddin et al., 2019). Existen ventajas significativas en la incorporación de técnicas de microfluídica en la investigación biomédica para el desarrollo de dispositivos destinados al sector salud en el análisis clínico (Narang et al., 2017):

- La cantidad de volúmenes de muestra requerida es menor.
- El empleo de reactivos para obtener un diagnóstico es menor en comparación con otros dispositivos.
- El tiempo de respuesta es considerablemente menor en comparación con los ensayos tradicionales utilizados en laboratorios.
- Existen procesos rentables y accesibles para la fabricación de dispositivos microfluídicos.
- Desarrollo de dispositivos LOC altamente complejos para un diagnóstico rápido, accesible y barato en comparación con los análisis de laboratorio.

El crecimiento en la investigación y desarrollo tecnológico de la microfluídica ha atraído mucha atención en diferentes campos tanto interdisciplinarios como multidisciplinarios en la química, la física, la ingeniería, la biomédica, la biotecnología, la nanotecnología, entre otros campos. En el campo de la biomédica existen varios problemas que se quiere resolver principalmente en dos áreas que son inherente en su conexión con la salud humana, las enfermedades y la seguridad alimentaria; el crecimiento de la microfluídica ha favorecido estas áreas con el desarrollo de dispositivos y técnicas que mejoren una biodetección precisa y oportuna, además de un monitoreo adecuado en tiempo real para la atención preventiva y de intervención clínica (Inamuddin et al., 2019; Mak & Ho, 2022).

En 2007, Whitesides y colegas de la Universidad de Harvard anunciaban por primera un artículo que describía un dispositivo emergente de lo que posteriormente se conocería como dispositivos microfluídicos basados en papel o dispositivos analíticos microfluídicos basados en papel (μ PAD, por siglas en inglés) mostrados en la Figura 23 (Kintzios, 2017; Mak & Ho, 2022; Martinez et al., 2007). El grupo de Whitesides proporcionaron un nuevo sector de dispositivos que aprovechaban y combinaban las ventajas de la ciencia y tecnología de flujo lateral y de las tiras reactivas para el desarrollo de una nueva alternativa de las pruebas de laboratorio en el lugar de asistencia (POCT, por sus siglas en inglés) para la detección, diagnóstico y monitoreo de enfermedades de bajo costo portátiles, asequibles y desechables, además con las ventajas de los dispositivos microfluídicos que se mencionaron en la lista anterior (Kintzios, 2017; Mak & Ho, 2022).

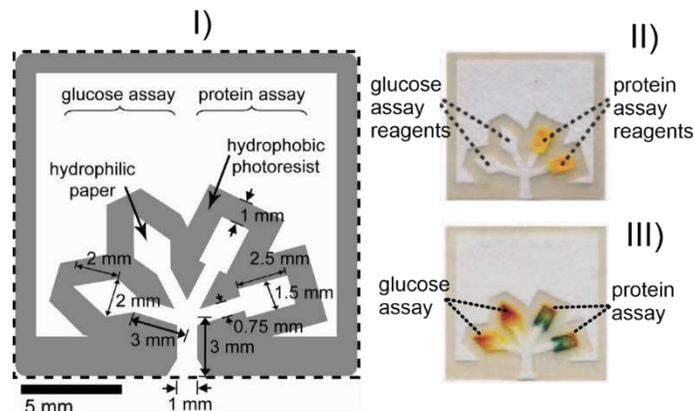


Figura 23. μ PAD fabricado por fotolitografía para detectar glucosa y proteína. II) Esquema de las partes y áreas con los reactivos agregados. III) ensayos de glucosa y proteína desarrollados con el μ PAD (Martinez et al., 2007).

El principal objetivo del grupo de Whitesides era desarrollar una clase de dispositivos de POCT de bajo costo, accesibles y que no requerían de equipo de laboratorio ni de personal calificado para implementarse en entornos con recursos limitados y reducir la carga sanitaria del sector salud mejorando el acceso a la atención médica a la población global (Kintzios, 2017). El mayor impacto de la innovación del grupo de Whitesides fue el desarrollo de un μ PAD que incorporaba las ventajas del papel como su capilaridad, bajo costo y un método fácil para modelar en el papel en un sistema de canales hidrofílicos y

áreas de detección de múltiples analitos para realizar los ensayos clínicos, e incluso, la capacidad de obtener resultados semicuantitativos y cuantitativos hasta cierto punto (Kintzios, 2017; Martinez et al., 2007, 2008).

La investigación del grupo de Whitesides proporciono un enfoque en el desarrollo de nueva tecnología y aplicaciones de los μ PAD para el diagnóstico portátiles de bajo costo, accesible y de fácil operación por el usuario. Y como consecuencia, ha captado la atención de los centros de investigación en un nuevo campo de fluidos en papel y en aplicación en ensayos basados en papel, asimismo, causo una oleada de interés en el sector industrial en el desarrollo de nuevos POCT con la tecnología y ventajas de las aplicaciones de los μ PAD (Kintzios, 2017). Esto impacto en los países en desarrollo, particularmente en las poblaciones con instalaciones médica subdesarrolladas o con poca infraestructura, donde existe una enorme dificultad de acceder a la atención clínica (Mak & Ho, 2022).

Al miniaturizar el sistema analítico, esta tecnología de los μ PAD se ha aplicado ampliamente en biosensores con diferentes enfoques de detección como colorimétricos, fluorescentes, quimioluminiscentes, electroquímicos y otros. Entre estos enfoques de detección, los métodos de detección colorimétrica han resaltado en la comunidad científica capaz de realizar análisis in situ de muestras multiplexadas para la detección de múltiples analitos de forma sencilla y rentable. Estos avances han introducido una alta variedad de μ PAD dirigidos para la detección de enfermedades; patógenos transmitidos por los alimentos; aditivos y contaminantes para la seguridad alimentaria; medio ambiente; residuos y calidad de agua; entre otros.

Estos dispositivos tienen un gran potencial en aplicaciones clínicas en el sector salud, en comparación con las otras áreas, gracias a la evidencia científica en los últimos años de los μ PAD en aplicaciones de ensayos de diagnóstico cualitativos y semicuantitativos enfocados a la detección de más de un analito, incluidos los biomarcadores de interés, proteínas, metabolitos, ácidos nucleicos e incluso patógenos (Mak & Ho, 2022).

Si tomamos en cuenta la atención médica clínica tradicional, hay un gran interés en biosensores de alta calidad para la medición de índices fisiológicos. También con el desarrollo del Internet de las cosas, las técnicas de autoservicio y el énfasis en la atención sanitaria debido a los actuales sucesos de pandemia y enfermedades que cada vez están en aumento en la población, mucha de esta atención se ha transferido de la asistencia sanitaria clínica a la asistencia sanitaria familiar, por ejemplo, el seguimiento a largo plazo de enfermedades crónicas, la prevención de enfermedades y la detección temprana, por lo que servicios clínicos remotos alcanzables para cualquiera son de vital importancia (Wang, 2020).

Esta técnica de dispositivos microfluídicos colorimétricos cada vez está tomando más avances y más aplicaciones en distintas áreas de investigación, por estos podemos verlos involucrados en temas como la detección colorimétrica en μ PAD (Morbioli et al., 2017). Estos dispositivos son bastante usados en el área analítica debido a sus atractivos movimientos pasivos del analito sin fuerzas externas debidas al fenómeno capilar, también debido a su portabilidad, bajo costo y facilidad de uso (Bendicho et al., 2021).

6.4.1 Colorimetría

La colorimetría es una ciencia que estudia y desarrolla el color, es decir, que utiliza los colores según las necesidades de las personas, generando una escala de valores numéricos para después desarrollar estrategias para cuantificar la variedad de estos (Esquerre, Mendoza; Yrma, 2017). Esta es un método físico no destructivo muy utilizado para determinar el color de una muestra. Para realizar la medición del color en las muestras se utiliza un instrumento calibrado llamado colorímetro o un espectrofotómetro, el cual también permite obtener una curva espectral (Carvajal Herrera et al., 2011). Los cambios de color son visibles y medibles desde una cámara de un teléfono inteligente, las pruebas no requieren equipos de medición costosos y se pueden aplicar al análisis de campo y al diagnóstico en el punto de atención (Ávila & d'Electrónica, 2017).

Una convergencia de los últimos avances en materiales, diseño y arquitecturas de dispositivos especializados está comenzando a sentar las bases para una próxima generación de tecnologías en biosensores, donde se combinan las técnicas microfluídica y los análisis colorimétricos, al mismo tiempo que se hace una convergencia de avances en dispositivos portátiles para el monitoreo en tiempo real sin la necesidad de equipo especializado (Koh A., et al. 2016).

Esta técnica de dispositivos microfluidicos colorimétricos cada vez está tomando más avances y más aplicaciones en distintas áreas de investigación, por estos podemos verlos involucrados en temas como la detección colorimétrica en dispositivos analíticos microfluídicos basados en papel (μ PAD) (Gianini G., et al. 2017), Dispositivos analíticos de microfluidos basados en papel para la detección colorimétrica de iones tóxicos (Sriram G., et al., 2017), estos μ PAD son bastante usados en el área analítica debido a sus atractivos movimientos pasivos del analito sin fuerzas externas debidas al fenómeno capilar, también debido a su portabilidad, bajo costo y facilidad de uso. O proyectos como el desarrollo de un biosensor colorimétrico de microfluidos para la detección en el campo de Salmonella en verduras recién cortadas utilizando microesferas de poliestireno tiolado (Man Y., et al. 2021), y un dispositivo microfluídico suave y portátil para la captura, almacenamiento y detección colorimétrica del sudor, o sistemas de microfluidos multifuncionales suaves e integrados en la piel para el análisis colorimétrico de biomarcadores del sudor y Temperatura, (Choi, J., et al. 2019) , estos en los cuales también se utiliza la aplicación de imágenes para monitorear señales colorimétricas.

La detección de biomarcadores por medio de métodos colorimétricos es otra forma de análisis biológico de fluidos in situ no invasivo. Los métodos de detección colorimétrica permiten una evaluación semicuantitativa, rápida, económica y confiable de biomarcadores en el sudor, orina, saliva o sangre. Los análisis químicos incorporados entre el biomarcador del fluido biológico y el reactivo incrustado en la plataforma de detección que responden de manera colorimétrica y producen un cambio medible en la longitud de onda de la luz. Las interfaces inalámbricas para el hardware de captura de imágenes

digitales de alta calidad y la extracción de color se pueden utilizar para capturar información óptica y convertirla en datos cuantitativos, como el pH y la concentración de los analitos. Al comparar los valores RGB extraídos de la imagen digital con una curva de calibración estándar previamente medida en el laboratorio, la concentración de los analitos se puede determinar (Koh et al., 2016; Shen et al., 2012).

La tecnología de detección colorimétrica tiene una variedad de características atractivas, como la facilidad de fabricación a gran escala, el monitoreo simultáneo de múltiples analitos en tiempo real y estructuras livianas y flexibles. Estas características hacen a este tipo de biosensor adecuados para el control de la salud operados por el mismo paciente desde su hogar. Las técnicas y métodos utilizados en la actualidad para la detección de urea y creatinina resultan tener aun complicaciones como el tiempo, costo de análisis y diversas interferencias por la presencia de otros aminoácidos. Por lo tanto, se requieren métodos específicos para la detección de estos analitos, para ello se proponen métodos colorimétricos de bajo continuo y con alta sensibilidad (S. B. Kim et al., 2018; Ye et al., 2020).

La tecnología biomédica emergente ha realizado esfuerzos considerables para optimizar las características de los sensores colorimétricos. Recientemente, se han realizado esfuerzos considerables para mejorar el rendimiento de los sensores colorimétricos de alta sensibilidad por medio de reacciones enzimáticas. Con la implementación de interfaces inalámbricas para el hardware de captura de imágenes digitales que sirven como medio para la cuantificación, y este tipo de biosensores microfluídicos tiene un gran potencial para la monitorización sanitaria de poblaciones vulnerables (Koh et al., 2016).

Publicaciones de este tipo de dispositivos han informado mucho progreso, pues se pueden hacer evaluaciones multi-analito en rangos fisiológicamente relevantes, para esto son importantes los ensayos químicos colorimétricos y las técnicas de imágenes digitales asociadas. Esta dirección de investigación se centra en sistemas de microfluidos delgados, suaves y compatibles que incluyen redes de canales de microfluidos, puertos de entrada /

salida, microdepósitos y sensores colorimétricos para recolección, captura, almacenamiento y análisis de los analitos. Estas características colectivas nos permiten evaluar múltiples biomarcadores de forma simultánea e independiente, en tiempo real, con un solo dispositivo. (Choi, J., et al. 2019)

Estos métodos colorimétricos para el análisis cuantitativo requieren marcadores de referencia de color para funcionar de forma confiable en condiciones ambientales naturales, como un medio para compensar la variabilidad en las propiedades espectrales de la luz de iluminación. Las respuestas colorimétricas de cada ensayo sobre los rangos típicos de concentración para cada una de las químicas objetivo proporcionan información espectral para los marcadores de referencia de color. (Choi, J., et al. 2019). En todos los casos, la profundidad del microdepósito define la longitud del camino para la absorción óptica. Lo que lleva a un aumento de la profundidad que mejora el cambio de color.

De esta forma, los colores absolutos extraídos de las imágenes digitales de los ensayos colorimétricos dependen también de las condiciones de iluminación ambiental y las temperaturas de color asociadas. Estas temperaturas de color se expresan en grados kelvin, algunas de estas durante el día son las siguientes:

- 2500 K (amanecer, atardecer)
- 4000 K (blanco neutro)
- 5500 K (luz del día)
- 7000 K (día nublado)
- 9000 K (sombra bajo un cielo azul).

Sin embargo, estas condiciones afectan los ensayos colorimétricos y los marcadores de referencia de color de manera similar, aunque estudios sistemáticos demuestran que el uso adecuado de estos marcadores puede producir una extracción precisa y confiable de información de color para temperaturas de color que se encuentren entre 2500 y 9000 K, así como en luz amarilla, luz blanca y luz solar.

Las limitaciones de los dispositivos actuales se encuentran principalmente en la gama de reactivos químicos que están disponibles para el análisis colorimétrico preciso de marcadores en los rangos de concentración relevantes. Existe la posibilidad de ampliar los esquemas colorimétricos para incluir reacciones enzimáticas o cromógenos dirigidos a una amplia gama de posibles aplicaciones para el diagnóstico clínico específico u otras aplicaciones. (Koh A., et al. 2016)

Con estas características y posibles incorporaciones tecnológicas, los dispositivos de microfluidos representan poderosas plataformas para la captura, almacenamiento y análisis colorimétrico de biomarcadores. Incluyendo marcadores de referencia de color integrados, proporcionan estimaciones colorimétricas precisas de las concentraciones de analitos en diversas condiciones de iluminación y en entornos remotos. (Choi, J., et al. 2019).

6.4.1 Procesamiento de imágenes.

Hoy en día, los avances tecnológicos recientes en los dispositivos móviles y la literatura científica emergente que describe el uso procesamiento de imágenes para análisis cuantitativas en la progresión o el resultado final de las reacciones colorimétricas, permitiendo el desarrollo de aplicaciones o softwares para la atención clínica más asequibles (Khandual et al., 2013; Travieso-González, 2018). Sin embargo, para explorar estas aplicaciones médicas con procesamiento de imágenes como sensores colorimétricos de bajo costo y no invasivo, es fundamental el empleo de un software capaz de segmentar imágenes y métodos que interactúen con una variedad de espacios de color o sus derivados (RGB, CMYK, HSV, $L^*a^*b^*$, etc.) antes de concluir que será capaz de realizar mediciones precisas (Firdaus et al., 2014; Woolf et al., 2021).

Los sistemas de imágenes de uso común utilizan un esquema de codificación de colores de tres bandas o triples para representar el sistema visual humano. Uno de los métodos más empleados es el espacio de color primario Red Green Blue (RGB) y la intensidad de la

imagen digital suelen ser datos de 24 bits: 8 bits para Red, 8 bits para Green y 8 bits para Blue, con valores individuales que varían de 0 a 255. El valor mínimo de los canales RGB (R=0, G=0, B=0) se refiere al negro puro mientras que para los valores máximos (R=255, G=255, B=255) significa blanco puro. Al usar una combinación de intensidades R, G y B, se pueden mostrar millones de tonos, saturaciones y luminosidad diferentes (16,777,216 colores posibles) (Firdaus et al., 2014; Khandual et al., 2013). Estos amplios colores y sus características de las imágenes aportar la base de datos para el análisis cuantitativo simple y confiable para diferentes biomarcadores en un biosensor utilizando colorimetría digital basada en imágenes. Los datos del canal RGB como respuesta a un análisis colorimétrico, está relacionada en gran medida de las características de los sensores, calidad de la cámara, el entorno de iluminación, entre otros (Khandual et al., 2013).

En todos estos métodos de detección, la cámara del teléfono inteligente ha sido crucial debido a que este recibe resultados de detección precisos. La cámara del teléfono inteligente se utiliza para capturar imágenes de la muestra de referencia y la muestra objetivo, para después digitalizar y descomponer en diferentes espacios de color estas imágenes.

6.4.2 Dispositivos inteligentes destinados para el sector salud.

En los últimos años, varios desarrolladores han introducido dispositivos basados en teléfonos inteligentes y esta tecnología se ha vuelto omnipresente en la sociedad. Además, también tiene potencia de cálculo de repuesta y una cámara incorporada, sustituyendo así muchos procesos y al converger esta tecnología con la medicina, puede traer aplicaciones clínicas potenciales, como el mapeo de la propagación de enfermedades infecciosas, biosensores colorimétricos, etc. (Ozdalga et al., 2012); (Yu et al., 2022).

Los teléfonos móviles actuales son un dispositivo que se puede usar como cámara, sensor para aplicaciones de seguimiento de la salud y actividad además de ser un cliente de redes

sociales lo que proporciona una plataforma perfecta para el desarrollo de equipos de atención de salud instantánea (Romeo et al., 2016). La aplicación en este sector salud, se usa la avanzada cámara de un teléfono inteligente con el procesamiento de imágenes, que ha permitido abarcar aspectos que antes eran inimaginables como es en el área de la salud para prevención y atención de la mayoría de las enfermedades en tiempo real, o reducir tiempos de respuesta y costos de procesos actuales, además de que es un método no invasivo (Vinisa et al., 2019).

La colorimetría basada en teléfonos inteligente ha sido considerada como una tecnología innovadora y muchas aplicaciones están rápidamente desarrollándose. El mecanismo para una detección colorimétrica se centra principalmente en: inmunoensayos de flujo lateral, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, la quimioluminiscencia y las matrices de patrones de color (Geng et al., 2017).

7 Antecedentes

7.1 Dispositivos para daño renal

Actualmente, existen varios métodos disponibles para evaluar el grado de daño renal en la población. En los últimos años el interés de aplicar un método o utilizar una herramienta que facilite el diagnóstico temprano del daño renal con prácticas que requieran el menor empleo de equipos especializados de laboratorio o de personal capacitado, ha conducido a un crecimiento en el desarrollo y aplicación de pruebas en el punto de atención (POCT), como dispositivos complejos basados en biosensores, tiras reactivas, pruebas de flujo lateral, dispositivos Lab-on-chip, etc. Estos dispositivos contienen componentes en la zona de reconocimiento, que están fijados en la superficie del POCT, que interactúan con los elementos de fluidos biológicos como sangre, saliva, suero, plasma, orina, etc.

Debido a estos avances realizados con respecto a POCT y al desarrollo de nuevos dispositivos emergentes, los biosensores disponibles han sido testigo de un aumento de nuevos conceptos tecnológicos. En la actualidad existen varias opciones de POCT destinados al diagnóstico del grado de daño renal que se pueden aplicar en diferentes entornos clínicos. Sin embargo, solo unos pocos dispositivos en desarrollo llegan al mercado debido a la difícil integración de sistemas de ensayos biológicos complejos que arrojen respuestas confiables, esto ocasionado por su baja sensibilidad, especificidad, selectividad, etc. (Dal Dosso et al., 2018; M. D. S. Shephard, 2011). En este estudio se hace una breve revisión, en la que se analizan una variedad de algunos de los dispositivos POCT más populares para medir la creatinina que se encuentran disponibles en el mercado y, se exponen junto con sus respectivas especificaciones. Los resultados de la investigación se resumen en la Tabla 9 (Dal Dosso et al., 2018; Gbinigie et al., 2014; Krige, 2017; M. Shephard et al., 2010; M. D. S. Shephard, 2011).

Tabla 9. dispositivos POCT de creatinina populares y sus respectivas especificaciones.

SENSOR	Statsensor	i-STAT	ABL 800 Flex	Pentra C200	Reflotron	Dri-Chem 400	Piccolo
Fabricante	Nova Biomedical	Abbott POC	Radiometer	Horiba	Roche	Fuji-Film	Abaxis
Método	Enzimático	Enzimático	Enzimático	Jaffé (Ácido pícrico)	Enzimático	Enzimático	Enzimático
Principio de lectura	Amperométrico	Amperométrico	Amperométrico	Colorimétrico	Reflectancia	Absorbancia	Absorbancia
Tipo de biofluido	Sangre	Sangre, suero o plasma	Sangre, suero o plasma	Suero o plasma	Sangre	Suero o plasma	Sangre, suero o plasma
Volumen de la muestra (μl)	1.2	65	125 - 250	9	30	10	9
Tiempo de análisis (min)	0.5	2	1	8.5	2	5	8.5-12
Rango de detección (μM)	27-1056	18-1768	10-2000	18-2000	45-884	18-2122	18-1768
Precio ~ (USD)	\$3,600	\$5,000	\$3,000	\$3,500	\$2,800	\$6,000	\$4,000

La Tabla 9 proporciona una breve descripción algunos de los dispositivos POCT de creatinina. Estos dispositivos analizan sangre total, suero, plasma o una combinación de estos y, otras investigaciones mencionaban que algunos analizaban la orina. También podemos observar que en todos los dispositivos requieren volúmenes de muestra muy

pequeños y, permiten una medición rápida de los niveles de creatinina en comparación de los métodos tradicionales usados en los laboratorios. Además, podemos observar que el método más común utilizados para el análisis para la determinación clínica de la creatinina es el enfoque enzimático, donde la creatinina produce peróxido de hidrógeno en una cascada enzimática que convierte la creatinina en un producto final para lectura, en la que participan las enzimas de creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa. Y el principio de lectura mayormente utilizado para detectar la señal generada fue amperométricamente (Dal Dosso et al., 2018; M. Shephard et al., 2010). Otro método utilizado es el método Jaffé, donde se usa el ácido pícrico que produce una señal colorimétrica en presencia de creatinina, sin embargo, estudios han demostrado que puede presentar falsos positivos o alteraciones cuantitativas por interferentes (Pundir et al., 2019; Siedel et al., 1988).

Todos estos dispositivos de la Tabla 9 muestran grandes ventajas considerables desde el volumen de la muestra muy bajo; el tiempo de análisis en cuestión de segundos o minutos; el rango de detección; la variedad de biofluidos utilizados, etc. Sin embargo, aún existe una grieta enorme entre la accesibilidad y un diagnóstico clínico de daño renal, debido a los costos elevados de los dispositivos. Esta situación se puede convertir en una oportunidad para lograr un progreso científico real.

8 Metodología

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de procesos biológicos muy potentes, (aumentan la velocidad de reacción), y altamente selectivos, tanto en el sustrato como en la reacción. La función de una enzima se centra en disminuir la energía de activación para facilitar que una reacción química tenga lugar. La cantidad y la calidad de enzima son dos parámetros críticos que definen su aplicación y su tiempo de uso. Entre los factores más importantes que afectan la actividad de una enzima se encuentran la concentración de la enzima, la temperatura y el pH (Villafañe, 2008).

Sin embargo, muchas enzimas son solubles en agua, en su estado puro, y por lo tanto no pueden durar mucho tiempo en este estado debido a la inestabilidad que trae consigo. La inmovilización es una manera de asegurar una larga vida de la enzima. Además, una enzima inmovilizada puede ser recuperada fácilmente para usarse de nuevo, y esto es de suma importancia si se trata con enzimas costosas (Tauber, 1934).

8.1 Síntesis y funcionalización de macromoléculas de quitosano:

8.1.1 Materiales

El quitosano, Ácido acético, Hidróxido de sodio, Etanol 98%, Glutaraldehído, Solución tampón de fosfato (7.5 pH) y Agua desionizada se obtuvieron de Sigma Aldrich.

8.1.2 Método

Para este estudio se desarrolló un derivado de quitosano en forma de macroesferas por método de precipitación (Malar et al., 2021). Ya que en condiciones favorable implica mezclarlo en estado líquido, se disolvió quitosano (2% p/v) en una solución acuosa de ácido acético (2% p/v) poco a poco y con agitación constante hasta tener una dispersión homogénea. Posteriormente, la solución obtenida se añadió gota a

gota a través de una jeringa con un capilar pequeño controlada por una bomba de infusión de jeringa en un líquido de coagulación (hidróxido de sodio 1 N y 26% v/v de etanol) agitando suavemente para evitar turbidez. En la siguiente fase las macroesferas obtenidas se filtraron y se lavaron con agua destilada hasta ajustar su pH a neutralizar. En esta parte de nuestro trabajo, las macromoléculas obtenidas se funcionalizaron por medio de reticulación en una solución de glutaraldehído al 5% agitando suavemente por 4 horas y posteriormente el exceso de glutaraldehído se lavó con agua destilada hasta tener un pH optimo (7.5) para la inmovilización de enzimas (Biró et al., 2008, 2009; Zhao et al., 2011). El grupo de Biró de la Universidad de Panonia y la Academia Húngara de Ciencias informan que estas macromoléculas funcionalizadas para la inmovilización enzimática pueden poseer una superficie específica bastante alta y múltiples sitios activos considerables para que las moléculas de enzima se fijen (Biró et al., 2008, 2009; Malar et al., 2021).

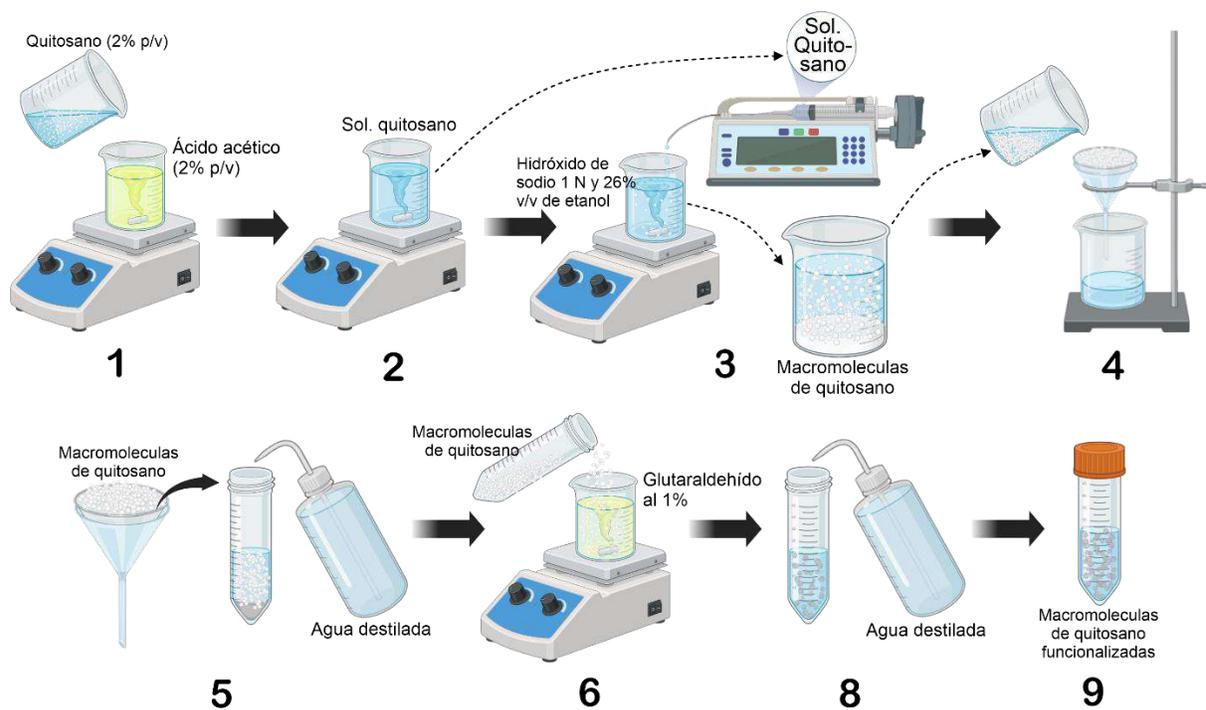


Figura 24. Síntesis de macromoléculas de quitosano.

8.2 Caracterización fisicoquímicas de las macroesferas de quitasano

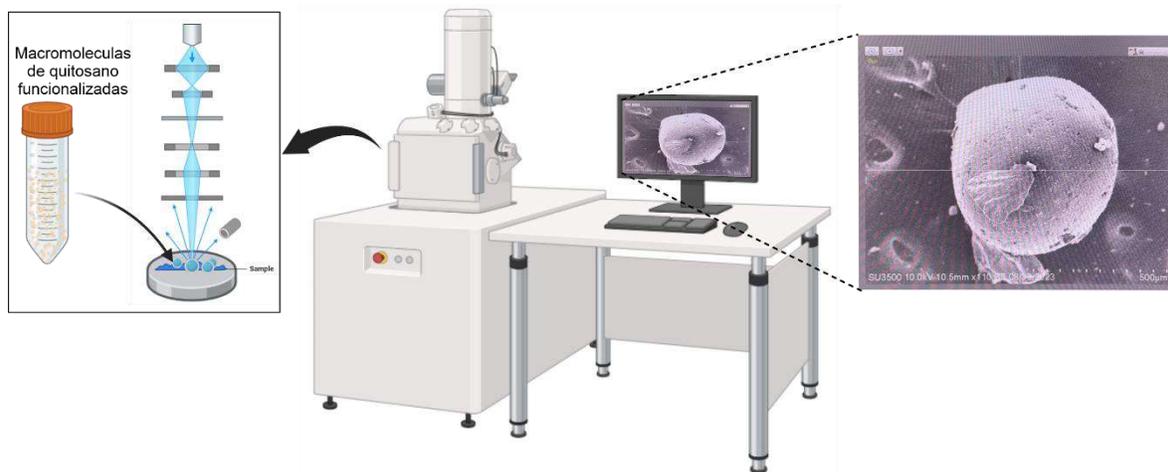


Figura 25. Microscopía electrónica de barrido.

8.3 Fabricación de dispositivos microfluídico basado en papel filtro

Se desarrolló un diseño en forma de estrella para optimizar un flujo de microfluidos uniforme para múltiples áreas de reconocimiento y para llevar a cabo las pruebas colorimétricas por separadas. El diseño se realizó en el software CorelDRAW, buscando un diseño que incorpore un sensado multi-analitico fiable, incorporando una red de canales fluídicos en la plataforma de papel de celulosa y formando barreras hidrofóbicas con un polímero que lleven el microfluido del área de depósito a cada una de las áreas de reacción, tomando en cuenta que en cada una de las áreas se llegue la misma cantidad de muestra. El diseño se le dio una forma en dos dimensiones mediante capas fluídicas y paredes hidrofóbicas, controlando las cuchillas por computadora y un plotter de corte (Lam et al., 2017a; Mak & Ho, 2022). Después de las operaciones de corte, la eliminación del material no deseado se realizó manualmente y se montó capa a capa para armar el dispositivo microfluídico basado en papel 2D como se muestra en la Figura 26.

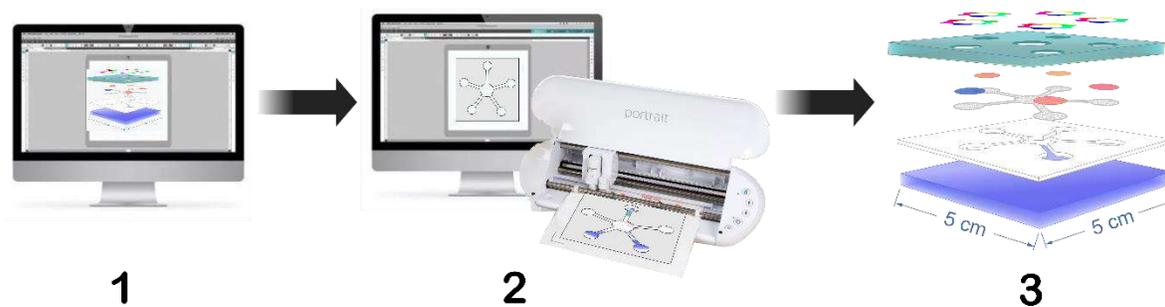


Figura 26. Diseño y corte del material para la fabricación de dispositivos microfluídico basado en papel filtro.

8.4 Inmovilización de las enzimas

8.4.1 Materiales

Solución tampón de fosfato (7, 7.5 y 8.2 pH), Hidróxido de sodio (NaOH), Creatinina, Creatina, Sarcosina, Urea, Creatininasa, Creatinasa, Sarcosina Oxidasa, Peroxidasa de rábano picante, Ureasa, Rojo fenol (reactivo ACS), Rojo de metilo (reactivo ACS), Azul de bromotimol (reactivo ACS), azul de timol (reactivo ACS), Etanol 98%, Fenolftaleína (reactivo ACS), azul de bromotimol, Dimetilsulfóxido, p-dimetilaminobenzaldehído, diclorhidrato de 3,3'-dimetoxibencidina (diclorhidrato de o-dianisidina), Agua destilada, Ácido clorhídrico (HCl), Hidróxido de sodio (NaOH), Polisacarosa 400 (Ficoll tipo 400-DL), Reactivo Nessler y Sulfato de amonio se obtuvieron de Sigma Aldrich.

8.4.2 Creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa

8.4.2.1 Método

Para el ensayo de reacciones en secuencia de la creatinina se preparó una solución cóctel con mezcla de cuatro enzimas: creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa en una proporción de 1:1:1:1 (1 mg/ml) en una solución tamponada con

fosfato de 7.5 de pH. La inmovilización de las enzimas sobre el soporte se llevó a cabo añadiendo 1 gr de partículas de quitosano (peso húmedo) en una mezcla de 3,5 mL de tampón fosfato de potasio (0,02 mol/L [pH 7]) y 1.5 de la solución cóctel de las enzimas. La mezcla se agito suavemente en condiciones ambientales durante 24 h, luego las enzimas inmovilizadas se centrifugaron y se lavaron con tampón fosfato de potasio (0,02 mol/l [pH 7]). Las macroesferas obtenidas se sumergieron en una tinta cromogénica de ODA (25 mg/mL) por 2 horas en agitación suave. Se filtraron las macroesferas antes de depositar en tres círculos de nuestro biosensor para nuestras zonas de creatinina, creatina y sarcosina hasta cubrir cada área de los círculos, se dejará a temperatura ambiente hasta su secado (Lam et al., 2017b; Shariati & Khayatian, 2022; Y. Zhang et al., 2019). El mecanismo colorimétrico que se utilizara aprovechara la reacción de la tinta cromogénica y peróxido, provocando cambios de color respecto a la concentración del peróxido que se cuantificara por medio de análisis de imagen. Esta medición nos permitirá sensar de forma indirecta la concentración de creatinina debido a la reacción en cadena de esta molécula.

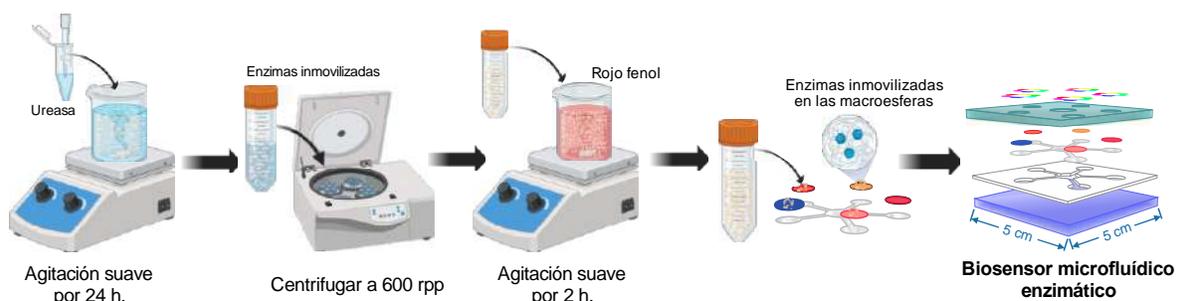


Figura 27. Inmovilización de enzimas creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa sobre un soporte de macroesferas de quitosano.

8.4.3 Ureasa

Para el bioensayo de urea se preparó una solución de ureasa (1 mg/ml) en una solución tamponada con fosfato de 7.5 de pH. La inmovilización de la enzima se realizó de la misma forma que las enzimas anteriores. En la fase de sumergir las macroesferas obtenidas en una tinta cromogénica, se utilizó rojo fenol (0,6 mg/ml) agitación suave por 2

horas. Se filtraron las macroesferas antes de depositar en uno de los círculos de nuestro biosensor para el bioensayo de urea hasta cubrir el área del círculo, se dejó a temperatura ambiente hasta su secado (Kayastha, 2019; Medina Ferrer et al., 2020). Este mecanismo utiliza el cambio de pH provocado por la degradación de urea y la reacción con la tinta cromogénica provocando cambios de color respecto al pH que se medirá por medio de análisis de imagen para cuantificar indirectamente los niveles de urea (Medina Ferrer et al., 2020).

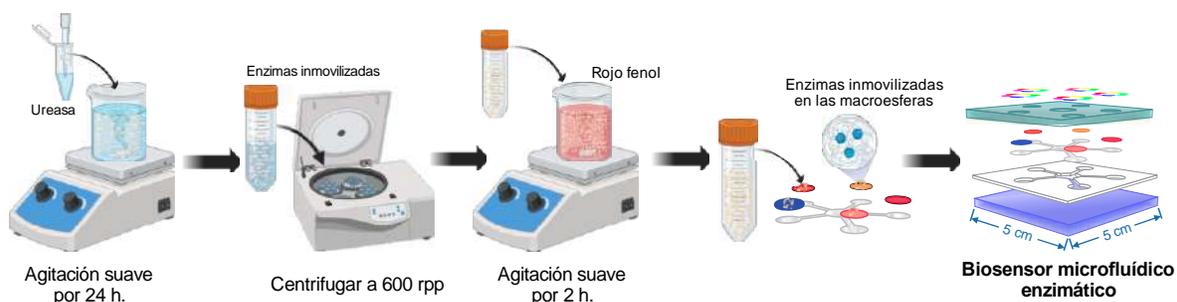


Figura 28. Inmovilización de la enzima ureasa sobre un soporte de macroesferas de quitosano.

8.4.3.1 Evaluación bioquímica

Se preparo una solución del reactivo de color de Nessler (NCR) agregando 15 ml de reactivo de Aldrich Nessler, 15 ml de solución de Ficoll al 0.4 % (p/v) y 45 ml de agua desionizada. Para el blanco de las pruebas, se mezclaron 2.5 mL de solución de urea (65 mM) y 1 mL de solución de NCR. Y para las soluciones de las pruebas se mezclaron en tubos de ensayos 2.5 mL de solución de urea (65 mM), 1 mL de solución de NCR y 20 μ L de solución de ureasa (100 - 150 unidades/ml). Se mantuvo ureasa libre e inmovilizada en los tubos de ensayo para las pruebas y se añadió 1,0 ml de tampón fosfato de 5 a 9 pH, en intervalos de 1 pH y se sometieron a condiciones experimentales de temperaturas crecientes en un rango de 15 a 65 °C con intervalos de 10 °C que contenía las soluciones de las pruebas y luego se determinó la actividad enzimática en condiciones estándar.

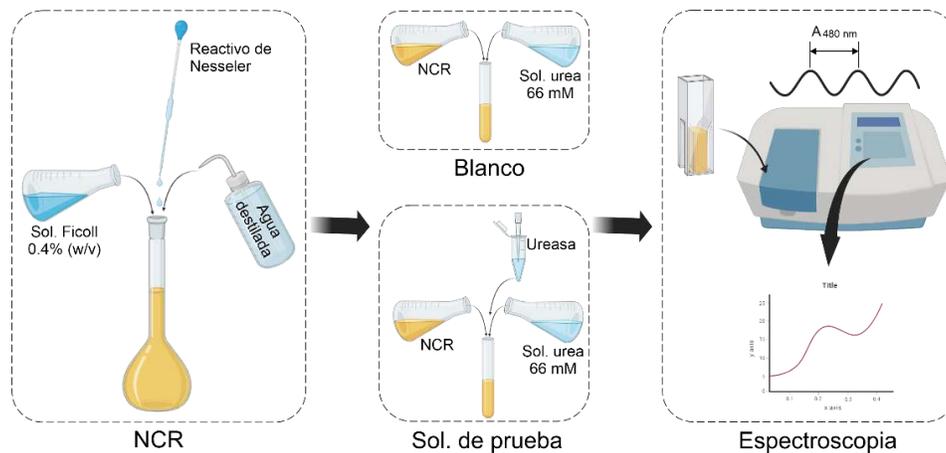


Figura 29. Esquema de metodología para las pruebas bioquímicas de la actividad de la enzima (método de Nessler).

8.5 Pruebas de bioensayo de pH

Existen distintas metodologías en la literatura para los indicadores universales, pero la mayoría se basan en una fórmula desarrollada por Yamada en 1933 (Rasouli et al., 2020). Para este bioensayo se preparó una solución con 9 mg de rojo de metilo y 18 mg de fenolftaleína en 27.5 ml de etanol al 95%. Se mezcló hasta tener una solución homogénea. A la par se preparó otra solución de 21.5 mg de azul de bromotimol en 15 ml de agua destilada, se mezcló hasta homogeneizar. Se mezclaron las dos soluciones y se agregó agua destilada hasta tener un volumen final de 50 ml de solución de indicador universal de pH. Para neutralizar la solución se agregó hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M gota a gota hasta que la solución se tinte a un color verde (Foster & Grunfest, 1937; Rasouli et al., 2020).

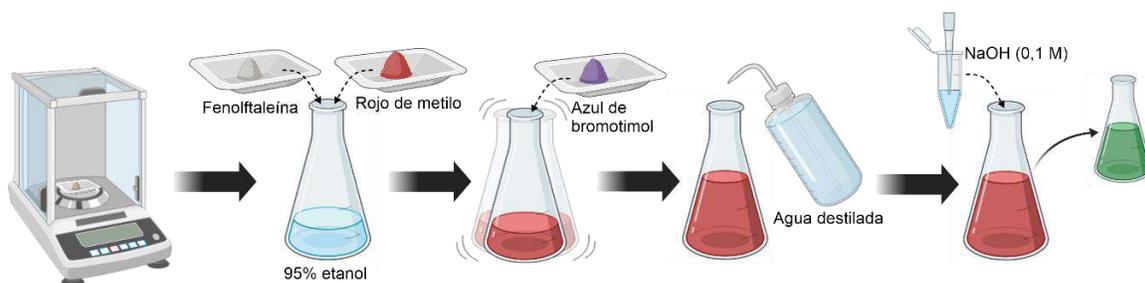


Figura 30. Preparación de tinta universal de pH.

8.6 Procesamiento de imagen para el análisis colorimétrico

El análisis cuantitativo de los analitos será analizado en función del cambio de color en las muestras por medio espectrofotometría y análisis de imagen. Se correlacionará la concentración de creatinina con la formación de peróxido del producto de la reacción enzimática de creatinina, creatina y sarcosina, usando la tinta cromogénica para el peróxido; para la concentración de urea se correlacionará el cambio de pH del producto de la reacción enzimática de la urea, usando la tinta cromogénica de rojo fenol y; para los bioensayos de pH se utilizará el cambio de color producido por el pH y el indicador universal. Se adquirió imágenes con la cámara de un teléfono inteligente (iPhone X) de cada uno de los cambios de color en cada área generados por las reacciones. Las imágenes se cargaron a una plataforma de programación y cálculo numérico (MATLAB R2020b) para realizarle un procesamiento de imágenes.

El área de análisis en cada área se identificó mediante procesamiento de imágenes en MATLAB que se describe en los siguientes puntos (los pasos se realizaron a cada de las imágenes adquiridas por separado):

1. Se cargo la imagen a MATLAB.
2. Se recorto la imagen para obtener solo las áreas de interés.
3. Se aplico segmentación a la imagen para dividir las a sus respectivas concentraciones.
4. Se calcularon los valores promedio dentro de la selección de los:
 - a. Espacios de color (RGB, YCbCr, HSV, L*a*b*, CMYK);
 - b. De cada uno de sus canales individuales del espacio y;
 - c. El valor de gris medio.

Esta es la suma de los valores de la selección dividida por las dimensiones de la matriz de selección (número de píxeles).

5. Se construyó una curva analítica entre el valor promedio y la concentración de cada analito.

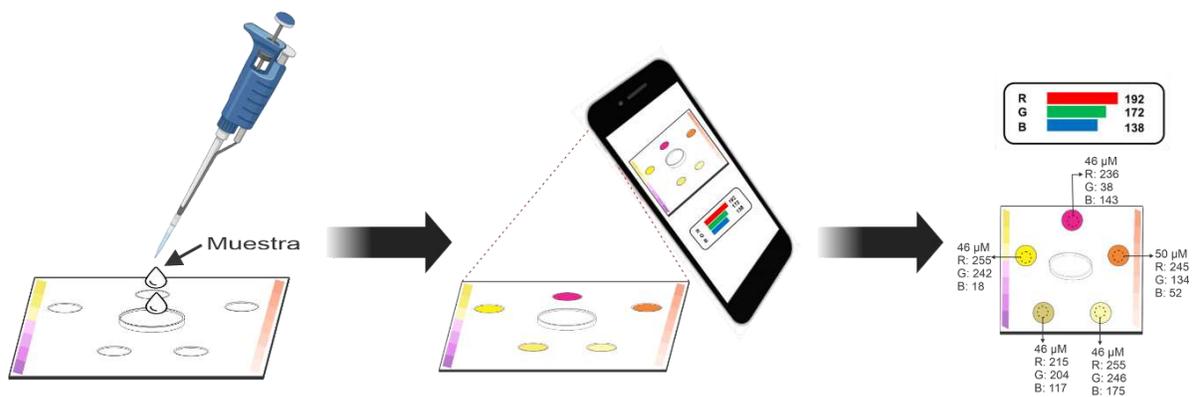


Figura 31. Adquisición de imagen y procesamiento de imagen para el análisis colorimétrico.

9 Análisis y resultados

9.1 Síntesis de macromoléculas de quitosano

Las características de solubilidad del quitosano en un parámetro fundamental a considerar para modificar las formas del quitosano (Malar et al., 2021). Existen numerosos informes disponibles sobre la aplicación de quitosano en forma de macroesferas como soporte con capacidad de formar complejos con proteínas, por lo que se ha empleado como material en la inmovilización de enzimas (Biró et al., 2008, 2009; Malar et al., 2021). En la Figura 32 se puede observar que las gotitas de la solución de quitosano se solidificaron mediante un agente de coagulación. En ampliación de la Figura 32A podemos observar la superficie de las macroesferas con características brillante y lisa. Las condiciones en estado líquido del quitosano (mezclado con ácido acético) favorecieron la manipulación del material al introducirlo a través de una jeringa con un capilar pequeño, puesto que la característica de densidad era de suma importancia a considerar en la etapa de manipulación a través del orificio de la jeringa, controlando el depósito gota a gota y evitando volúmenes grandes que podrían cambiar las proporciones de las macromoléculas.

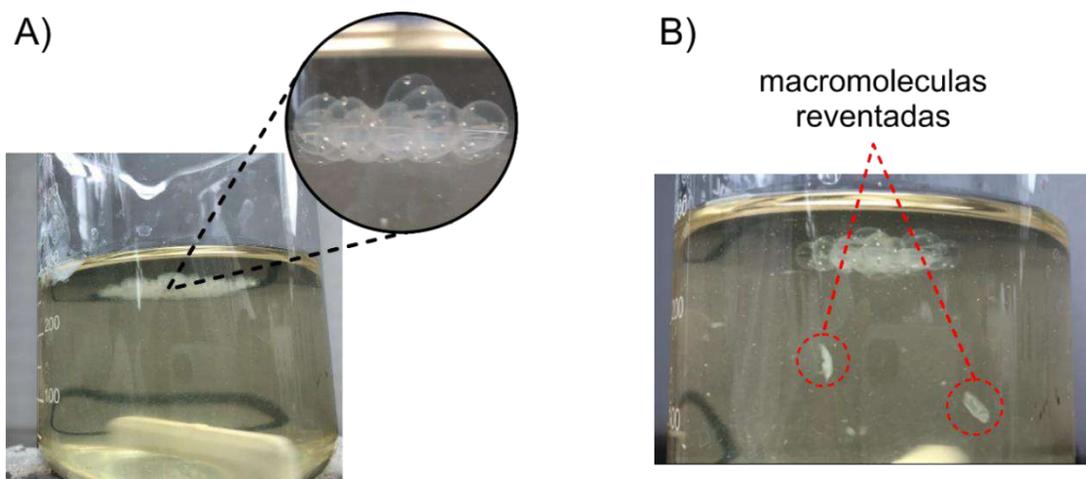


Figura 32. Macroesferas de quitosano.

Sin embargo, el tamaño de las macroesferas de quitosano obtenidas estuvo influenciado por variables que es importante considerar durante el proceso de síntesis de las partículas. Primero, se tomó en consideración la velocidad de agitación, en la Figura 32B podemos observar macromoléculas reventada. Se observó que a cierta velocidad de agitación creaba turbidez lo que afectaba la estructura de las macromoléculas ocasionado su rotura. En esta etapa de coagulación también si pudo observar durante el proceso que la turbidez, ocasionaba que las macromoléculas chocaran entre sí o con el imán de agitación antes de que la macromolécula se coagula por completo ocasionando que se fusionaran, malformaciones o que se reventaran.

Otra variable considerable era la velocidad del depósito de las gotas, en esta fase es importante considerar un tiempo adecuado entre la gota a depositar y la gota depositada anteriormente, considerando que cada gota se haya coagulado por completo para evitar que la nueva gota depositada se una a esta, lo que provocaba macroesferas amorfas o que se reventaran.

Otras consideraciones de importancia basado en las revisiones de la literatura eran las concentraciones de la solución acuosa de ácido acético (en la fase de disolución del quitosano), de la solución de coagulación y del agente reticulante (en la fase de funcionalización) (Biró et al., 2008, 2009; Chauhan & Thakur, 2023; Malar et al., 2021). Para dilucidar los efectos de estas variables durante el proceso de síntesis de las macromoléculas se expusieron a diferentes concentraciones. Con concentraciones altas de ácido acético las macromoléculas no llegaban a coagularse en la solución de coagulación, esto mismo sucedía si se alteraba bastante la concentración de esta solución de coagulación.

En la parte de reticulación se expusieron las macromoléculas a una solución de glutaraldehído al 1% y al 5%. Las macroesferas obtenidas con glutaraldehído al 1% aún se podía percibir un toco blanquizo y conservaban notablemente su estructura; sin embargo, se observaba una superficie irregular. Por otra parte, las macromoléculas que fueron expuestas a un agente reticulante de glutaraldehído al 5% como se observa en la Figura

33, conservó casi por completo su estructura y la superficie lisa de la partícula de quitosano.

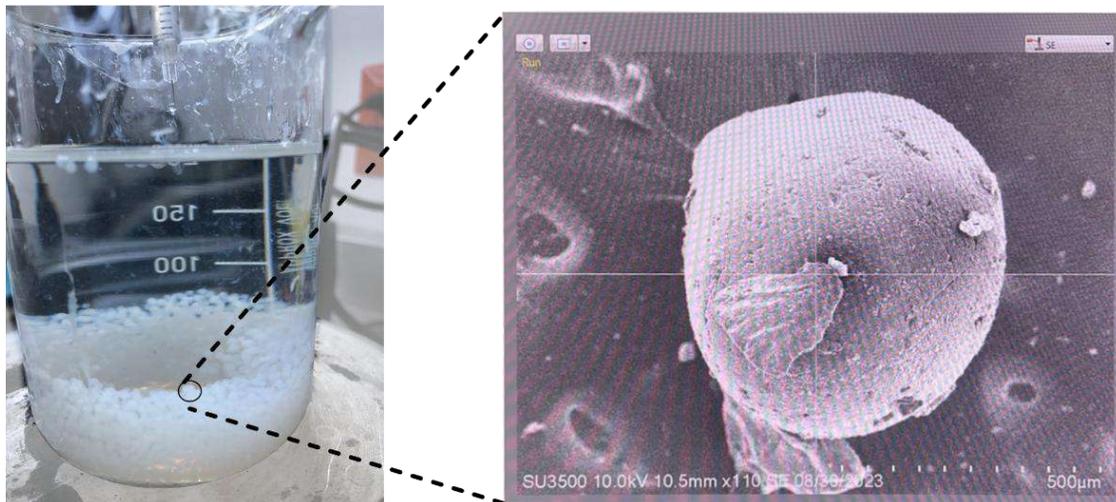


Figura 33. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las macromoléculas de quitosano reticuladas con glutaraldehído al 5%.

La medición del tamaño de las macropartículas y el estudio de la morfología de las partículas se analizó mediante imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las macromoléculas de quitosano reticuladas con un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU3500. En la Figura 33 podemos apreciar las macromoléculas de quitosano con una magnificación de 110X y un voltaje de aceleración de 10kV. Los datos del diámetro de las partículas obtenidas mediante reticulación utilizados para este estudio se determinaron a partir de estas imágenes obtenidas por el SEM, donde se puede observar macromoléculas generalmente esféricas de alrededor de 500-600 μm .

Es importante enfatizar que las imágenes obtenidas por SEM fueron usadas únicamente para examinar la morfología de la superficie de las partículas y comprobar el tamaño de estas; sin embargo, no pueden considerarse totalmente representativas del tamaño de toda la población de las macromoléculas.

9.2 Pruebas bioquímicas

9.2.1 Ensayo de actividad de la ureasa

La inmovilización enzimática en polímeros como la quitina y sus derivados (macromoléculas de quitosano) mejoran la afinidad por el sustrato (urea) y una estabilidad deseable, esto a causa de alteraciones de la estructura enzimática o cambios en el entorno local tras el desempeño de la inmovilización (Chellapandian & Krishnan, 1998; Krajewska, 1991a). Se ha evidenciado que esto puede facilitar el mantenimiento de la actividad enzimática en cambios de pH y temperatura. Y de acuerdo con la literatura, las mejoras en la afinidad y estabilidad dependen de la enzima, la naturaleza del soporte y las condiciones de inmovilización; entre estas condiciones, se ha reportado que el soporte utilizado toma mayor importancia (Chellapandian & Krishnan, 1998).

En esta investigación la ureasa inmovilizada se utilizó para aplicaciones biomédicas en el entorno analítico, acoplándola a un biosensor multi enzimático. Para optimizar la detección colorimétrica, se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática en condiciones experimentales de pH y temperatura comparando la estabilidad de la ureasa inmovilizada en comparación con la enzima libre, utilizando la urea como sustrato.

9.2.1.1 Efectos del pH

Se estudió la dependencia de la altura del pico de ureasa en el cambio de pH del tampón de fosfatos. La representación de dicho estudio se representa en la Figura 34 y, encontramos que la ureasa dio una señal más alta dentro del rango de pH de 6.5 a 8, tanto para la enzima inmovilizada como en estado libre y se puede apreciar que en ambas enzimas el pico después de un pH mayor a 8, la actividad enzimática disminuye ligeramente. Para ambas enzimas exhiben su máxima actividad en el punto más alto del pico a un pH óptimo de 7.

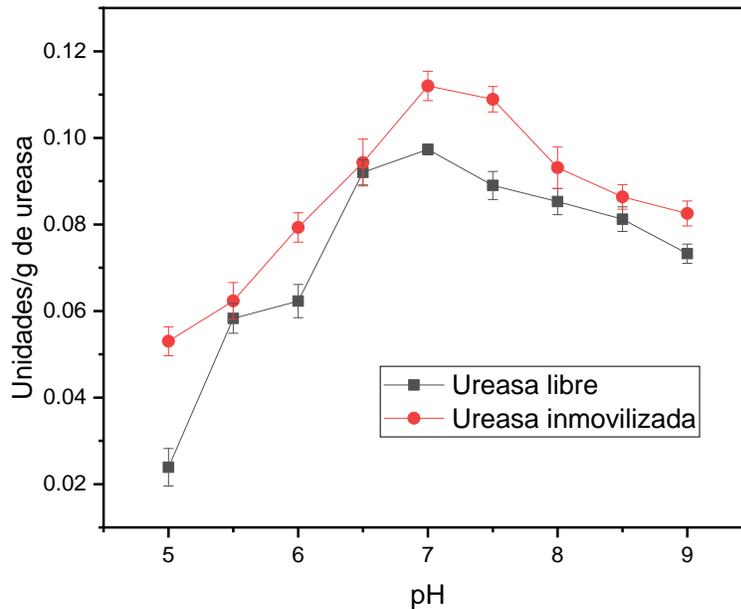


Figura 34. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima ureasa libre e inmovilizada.

Comparando los ensayos de la enzima inmovilizada y la enzima en estado libre el rango de pH de mayores señales (pH de 6.5 a 8), la ureasa inmovilizada mostró una mayor estabilidad del pH mejorada en este rango de pH en comparación con la enzima libre. Se puede justificar estos resultados con varios estudios, donde se informan que la actividad de la ureasa inmovilizada depende de la cantidad de proteína unida al soporte, su naturaleza de este y la técnica de inmovilización utilizada, que alteran la modificación estructural y química de diferentes grupos funcionales que pueden ser superiores para la inmovilización enzimática, lo que probablemente influye en la señal redox de la ureasa y que puede resultar en una variación de nuestra respuesta (Alatawi et al., 2018; Chellapandian & Krishnan, 1998; Srinivasa Rao et al., 1995).

9.2.1.2 Efectos de la temperatura

Para tener en cuenta la influencia del cambio de la temperatura sobre la actividad enzimática de la ureasa libre e inmovilizada y determinar la temperatura óptima, se sometieron a condiciones experimentales de temperaturas crecientes en un rango de 15 a 65 °C con intervalos de 10 °C y, los resultados se muestran en la Figura 35. Se compararon las propiedades de la ureasa libre e inmovilizada y los resultados mostraron que la señal más alta para ambas enzimas fue a una temperatura optima de 55 °C para ambas enzimas. También podemos notar en la Figura 35 que el incremento adicional a temperaturas mayores a 35 °C, aumento la actividad de la ureasa libre e inmovilizada hasta la óptima (55 °C), después del desplazamiento de esta temperatura optima hasta los 65 °C la actividad disminuye, respectivamente.

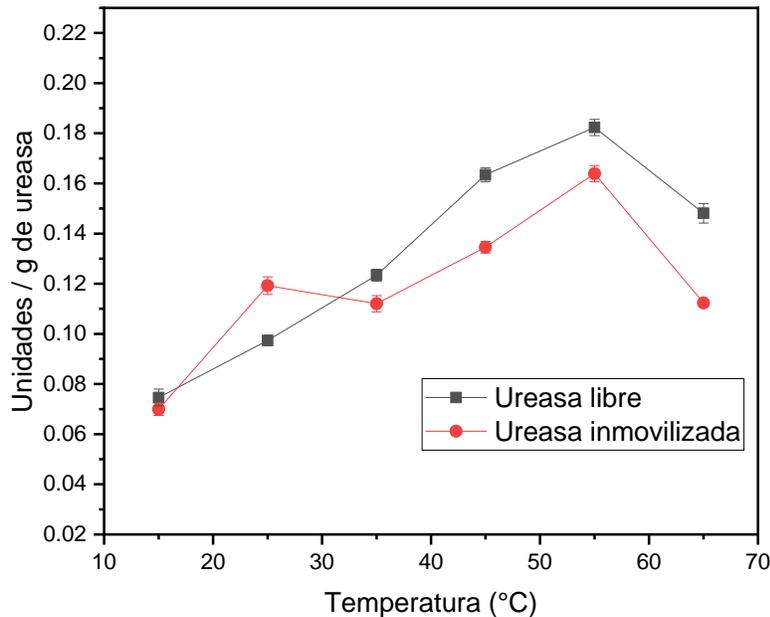


Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima ureasa libre e inmovilizada.

Estos datos de igual modo revelan en este intervalo de temperatura (35 a 65 °C) la actividad enzimática de la enzima inmovilizada se mantuvo más alta que la enzima libre, lo

que exhibe una mayor estabilidad bioquímica tras el desempeño de la inmovilización (Elçin & Elçin, 2000; Kakimoto et al., 1990).

9.2.1.3 Estudio de acoplamiento enzimático de la ureasa en macromoléculas de quitosano

La inmovilización enzimática en plataformas de quitosano es un área de investigación en la que se han explorado diversas técnicas y métodos para mejorar la estabilidad y el acoplamiento de la enzima. En Figura 36 podemos apreciar cómo resultado de la inmovilización, la curva de acoplamiento de la ureasa sobre plataforma de quitosano. Se observó un cambio significativo en la enzima inmovilizada a partir del minuto 30; los resultados en este punto del tiempo revelaron el mayor % de eficiencia de inmovilización. A partir de estos ensayos, se encontró que la cantidad de acoplamiento de ureasa fue del 71% de enzima, utilizando 1 mg/mL de concentración para la experimentación.

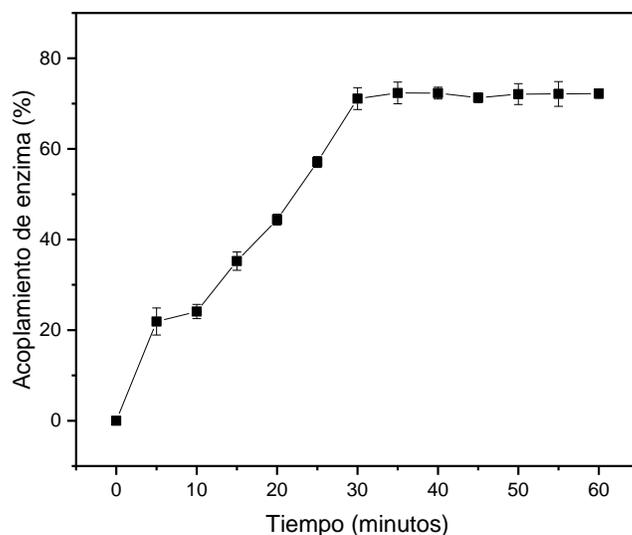


Figura 36. Gráfico del porcentaje de acoplamiento de ureasa sobre plataforma de quitosano.

Con respecto a los resultados de este estudio, las macromoléculas de quitosano mostraron respuestas significantes en el bioensayo del conteo proteico en solución,

además la inmovilización y el método de inmovilización puede ofrecer ventajas como la mejora de la estabilidad bioquímicas de la enzima en condiciones adversas, como altas temperaturas y a diferentes niveles de pH, ya discutidas anteriormente. Adicionalmente a estas ventajas, la técnica de inmovilización utilizada es relativamente sencilla y económica. Estas ventajas potencialmente estarían vinculadas a los cambios estructurales de la ureasa por la inmovilización y del efecto quelante del quitosano (Kakimoto et al., 1990; Krajewska, 1991c, 1991b). Estas curvas se pueden utilizar para caracterizar la actividad enzimática y para comprender los mecanismos de reacción enzimática.

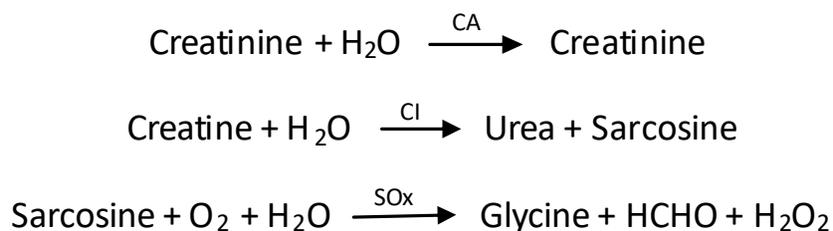
Estos resultados se respaldaron con la evidencia científica, donde reiteran que la inmovilización de ureasa en quitosano es un proceso que se utiliza para aumentar la estabilidad y la eficacia de la enzima (Krajewska, 1991c, 1991b; Krajewska et al., 1990). Mientras que otros estudios comparativos mostraron resultados análogos, *Kayastha & Srivastava* reportó una inmovilización óptima del 64% en perlas de quitosano activadas por glutaraldehído (Kayastha & Srivastava, 2001); *Al-Garawi et al.* reportó una eficiencia de inmovilización del 70.38 % en nanoquitosano (Al-Garawi et al., 2022); *S. Kumar et al.* reportó una eficiencia de la inmovilización del 77 % en perlas quitosano y del 54 % en perlas de alginato (S. Kumar et al., 2009). Y adicionalmente en ese mismo laboratorio (School of Biotechnology, Faculty of Science, Banaras Hindu University, Varanasi 221005, India) se inmovilizaron ureasas en diferentes matrices, reportando las siguientes eficiencias: sobre gelatina funcionalizadas con glutaraldehído al 1% reportó una inmovilización óptima de 67.6 % y del 75 % (S. Kumar et al., 2005; Srivastava et al., 2001); en agar-agar fue del 51.7 % (Mulagalapalli et al., 2007); sobre gel de poliacrilamida y perlas de alginato de calcio, reportando 50 % de inmovilización en ambas matrices (Das et al., 1998); en tiras de papel de celulosa DEAE se reportó un 51 % (Reddy K. et al., 2004).

9.3 Procesamiento de imágenes y análisis colorimétrico

9.3.1 Creatinina

Los dispositivos analíticos de microfluidos basados en papel destinados para la detección han ganado un papel dominante en la medicina clínica debido a su alto rendimiento, portabilidad, simplicidad y bajo costo (Inamuddin et al., 2019). Para este trabajo se presentó un dispositivo de microfluidos basado en papel (μ PAD) dependiente de la combinación de un sistema de reacciones enzimáticas e indicadores cromogénicos, que proporcionan una herramienta para la detección colorimétrica simultánea de diferentes tipos de biomarcadores (creatinina, creatina, sarcosina, peróxido, urea y pH) que pueden reflejar el estado clínico de los problemas renales.

Para el bioensayo de la detección de creatinina depende de la combinación de inmovilización de un sistema de enzimas como la creatininasa (CA), creatinasa (CI), sarcosina oxidasa (SOx) y peroxidasa en el soporte de las moléculas de quitosano. El acoplamiento de estas tres enzimas permite la transformación de la creatinina para su detección que involucran la conversión de creatinina en tres etapas: de creatinina en creatina; la creatina en sarcosina y urea y; la sarcosina produce glicina. Esta reacción en cadena se representa en la siguiente ecuación química (Pundir, Kumar, et al., 2019):



Ecuación 1. Degradación de la creatinina en presencia de creatinina amidohidrolasa (CA), creatina amidinohidrolasa (CI) y sarcosina oxidasa (Sox).

El paso final de la secuencia la sarcosina reacciona con la SOx y se origina el uso del oxígeno electroquímicamente discernible y la liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

y otros productos como la glicina y el formaldehído (HCHO) (Pundir, Kumar, et al., 2019). Nuestro biosensor aprovechara este mecanismo de la formación de peróxido de hidrógeno a partir de la creatinina en una secuencia de reacción. El peróxido de hidrogeno producido reacciona con nuestra última enzima inmovilizada (peroxidasa) que a su vez se cuantifica colorimétricamente mediante acoplamiento oxidativo del agente cromogénico diclorhidrato de 3,3'-dimetoxibencidina (diclorhidrato de o-dianisidina) que produce un color resultante marrón (o-dianisidina oxidada) como se muestra en la Figura 37 (A).

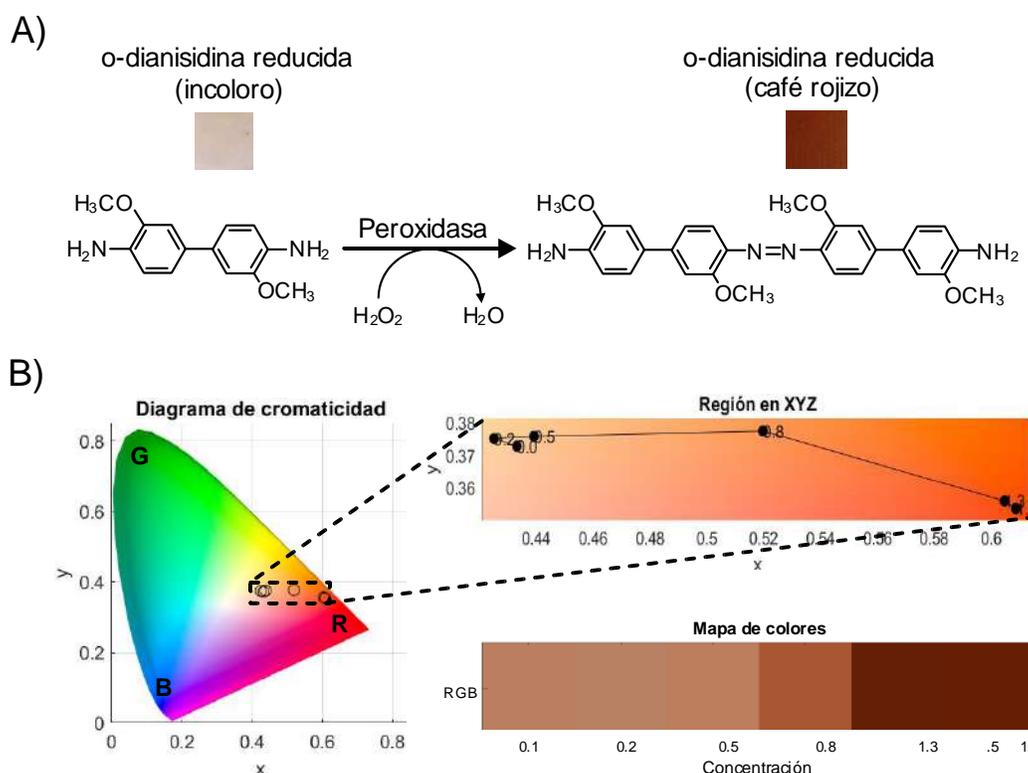


Figura 37. (A) Ilustración esquemática de la reacción enzimática y cromogénica del sistema peroxidasa – o-dianisidina. (B) Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo.

La Figura 37 (B) muestra el perfil de color CIE 1931 como respuestas colorimétricas del sistema peroxidasa-o-dianisidina que se utilizó para analizar las propiedades espectrales

de las diversas concentraciones de 0,00 a 1,50 mM de creatinina; y es la representación de los valores después de la transformación de color de RGB a CIE-xy.

Las intensidades RGB promedios (Figura 37B derecha inferior) se calcularon de los componentes del triplete R, G y B sumando todas las intensidades individuales de cada píxel de una matriz de 26×31 [que representa nuestra región de interés (ROI)] y dividiendo por el número total de píxeles del arreglo ($26 \times 31 = 806$). Estos valores se convirtieron posteriormente a los valores de cromaticidad x e y (Figura 37B izquierda). Los puntos dentro del área de la región en XYZ (Figura 37B derecha superior) representan los puntos resultantes después de proyectar los puntos de prueba de los segmentos del color CIE 1931 y refleja intuitivamente el cambio de color correspondiente al bioensayo de creatinina.

Las coordenadas xy resultantes del espacio de color CIE 193 se emplearon adicionalmente para investigar la relación entre el cambio colorimétrico y la concentración de creatinina. Estos valores junto con las intensidades RGB medias se consideraron como un parámetro analítico en el análisis de imágenes. Y para este análisis, el ROI fue un factor importante para lograr una detección colorimétrica objetiva y un análisis de datos sólido. La explotación y manipulación de imágenes adquirida fue un punto fuerte de este enfoque para determinar un ROI con áreas homogéneas (Figura 38 A), evitando regiones que alteren el análisis colorimétrico.

La Figura 38 A muestra los ROI obtenidos con los cambios de color en respuesta de presencia de peróxido (H_2O_2) de la reacción en cadena de la creatinina que se mencionó anteriormente. Pudimos observar que la presencia de H_2O_2 resalta a un cambio de color café rojizo del sistema peroxidasa - o-dianisidina. Este se intensificó proporcionalmente con el aumento de la concentración de creatinina. Los resultados de análisis de color, tanto de RGB, nivel de gris medio (NGM), canal Red (R), canal Green (G) y canal Blue (B) dependieron de las intensidades cambiantes de estos colores al someter las imágenes de ROI de cada concentración en el procesamiento de imagen.

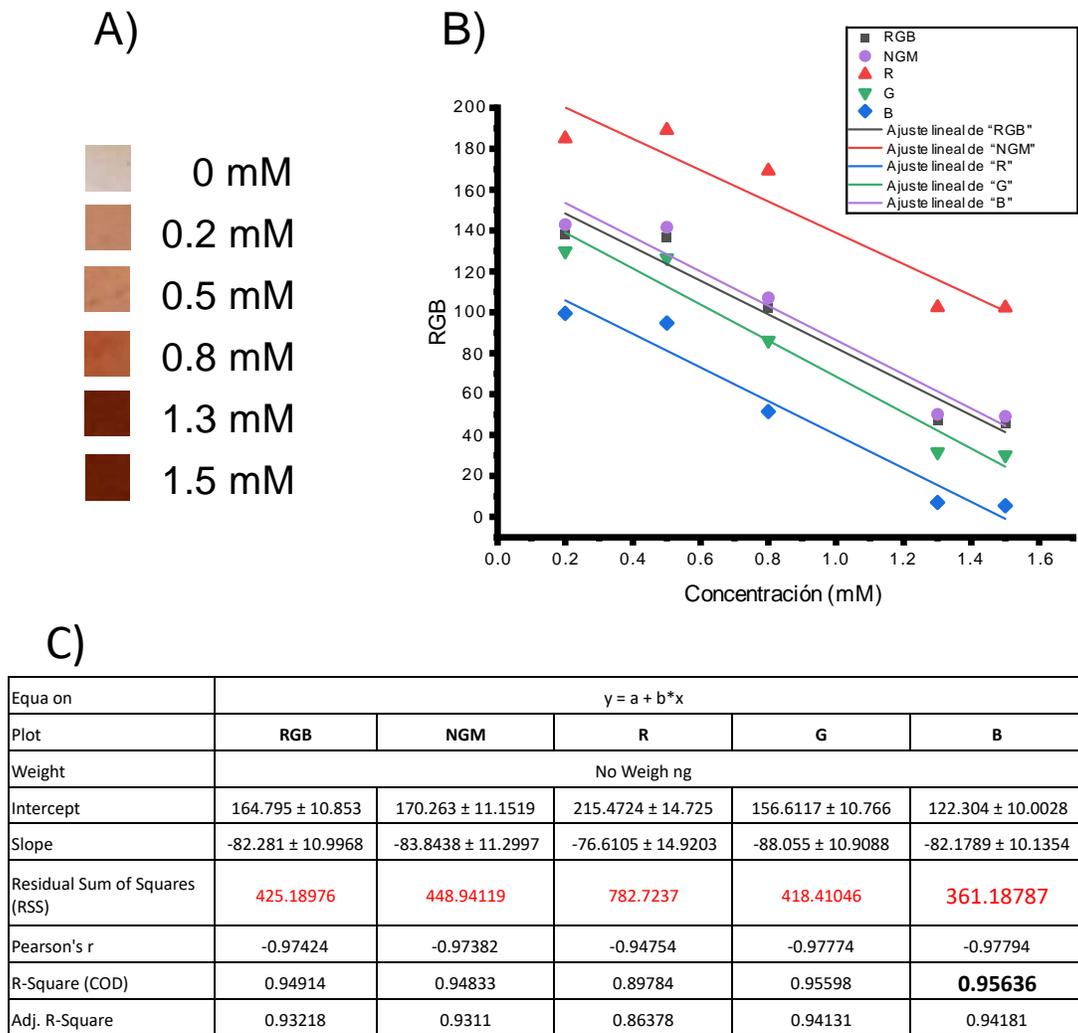


Figura 38. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de creatinina con diversas concentraciones (0-1.5 mM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de creatinina y las respuestas colorimétricas en el espacio. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatinina.

Estos valores resultantes de las intensidades de color ayudaron a obtener el gráfico de calibración para la detección cuantitativa de los valores correspondientes de concentración de creatinina asociados con diversas reacciones químicas. Estas condiciones de los fenómenos de cambio de color proporcional a las concentraciones del analito se pueden presentar en todo un espacio de color o solamente en uno/s de sus componentes. Para la cuantificación de las concentraciones mediante un método analítico basado en colorimetría se sustentó de la existencia de relación proporcional de dicha concentración y

la una señal analítica o respuesta generada por la presencia del analito (leída y procesada por análisis de imagen). Para ello se estandarizó este método colorimétrico mediante un ajuste por mínimos cuadrados apoyado con la prueba de Mandel ISO 8466-1 (Amaya et al., 2005; Ellison, 2006).

Para el primer paso en la estandarización se elaboró una curva de calibración para cada análisis representada en el gráfico resultante de la Figura 38 B; se muestra los datos generados por el análisis colorimétrico en un modelo de color RGB y de cada uno de sus componentes (R, G y B), así como también la curva de calibración de los respectivos datos. Además, la Figura 38 B muestra los resultados de un ajuste de las ROI entre el valor de gris medio (Valor de Gris Medio (NGM): valor de gris promedio dentro de la selección) versus la concentración de creatinina; utilizadas en otras metodologías de investigación para un análisis colorimétrico semicuantitativo y cuantitativo (Condezo Hoyos et al., 2015; Shariati & Khayatian, 2022).

Con el gráfico de la Figura 38 B junto con los datos de la tabla de parámetros estadísticos resultantes de la Figura 38 C, podemos observar que los pares de valores concentración-señal del análisis de canal B se ajustan a una recta $y = -82.17x + 122.3$ y un coeficiente de determinación (COD) de $R^2 = 956$. El coeficiente de correlación lineal tiene una aplicación válida como criterio para un ajuste aceptable si es aplicado en combinación con otros criterios (Andrade & Gómez-Carracedo, 2013). Para esto, se apoyó en la prueba de Mandel como se mencionó anteriormente, utilizado para relacionar el coeficiente de correlación aproximadamente en término de error o con la varianza de los residuos como se representa en la Figura 39 (un buen modelo que se ajuste a los datos de la señal tiene residuos pequeños). Por ende, es importante observar los valores de la tabla estadística resultante de la curva de calibración para establecer una relación entre dichas condiciones del color o los fenómenos de cambio de color y la concentración del analito para la detección cuantitativa de creatinina.

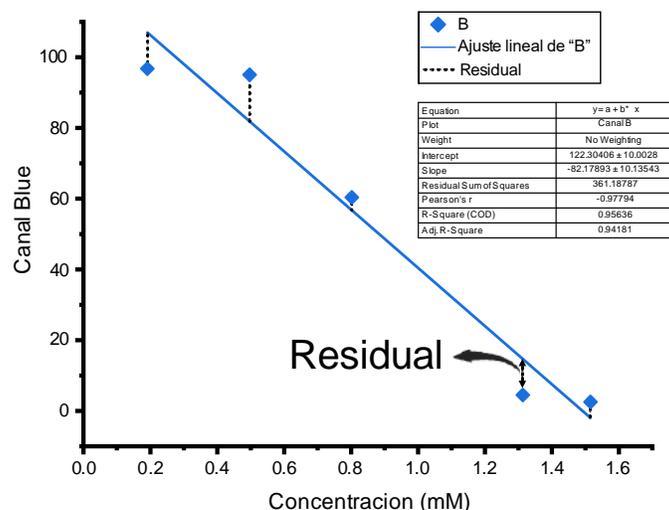


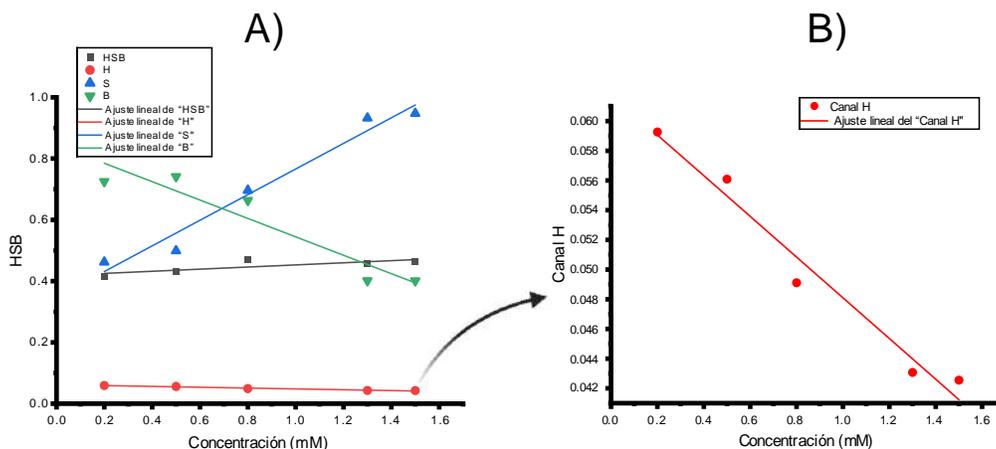
Figura 39. Ajuste lineal y análisis residual de valores colorimétricos de creatinina.

Para este bioensayo los valores del canal B correspondientes a su concentración mostrados en la Figura 39, establecieron un valor aceptable, además el valor de la suma de los cuadrados residual (RSS) fue menor (RSS = 361.1878) en comparación de los otros modelos de RGB, NGM, R y G. Sin embargo, en términos estadísticos, si el valor residual [el residual es la diferencia entre un valor observado y un valor predicho en el análisis de regresión (IBM, 2021), se puede observar su representación en la Figura 39] aumenta, también aumenta el RSS. Y cuanto mayor aumente este valor, peor se ajustará el modelo a los datos.

Tenga en cuenta que es necesario seleccionar el RSS adecuado en el procedimiento de ajuste del modelo para el análisis cuantitativo. Para ello, se emplearon adicionalmente un análisis colorimétrico en una variedad de espacios de colores junto con sus componentes dimensionales para obtener el mejor modelo que se ajuste a nuestros valores. Los resultados del análisis colorimétrico de cada modelo de color se muestran en el anexo.

En base a los resultados, se resaltaron los valores de un análisis dentro del modelo de color HSB (de sus componentes Hue, Saturation y Brightness) mostrados en la Figura 40. Podemos observar que los valores del modelo HSB se ajustan muy bien a nuestra curva de calibración, sin embargo, el componente dimensional de este espacio de color que

sobresale visualmente y también muestra excelentes valores de la señal de respuesta mostrados en los datos estadísticos de la Figura 40, es el canal H (Hue) relacionado al tono o matiz; propiedad relacionada al color.



Equation	$y = a + b \cdot x$			
Plot	HSB	H	S	B
Weight	No Weigh ng			
Intercept	0.41818 ± 0.01419	0.06181 ± 0.00138	0.34775 ± 0.04372	0.84499 ± 0.05775
Slope	0.03468 ± 0.01438	-0.01371 ± 0.0014	0.4182 ± 0.0443	-0.30043 ± 0.05851
Residual Sum of Squares	7.27E-04	6.86E-06	0.0069	0.01204
Pearson's r	0.81232	-0.98479	0.98358	-0.94754
R-Square (COD)	0.65986	0.9698	0.96743	0.89782
Adj. R-Square	0.54648	0.95974	0.95658	0.86376

Figura 40. (A) Relación lineal entre la concentración de creatinina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatinina.

Como resultado en la Figura 40 B se puede observar un mejor ajuste de nuestro modelo y de los valores correspondiente al análisis colorimétrico de las concentraciones de creatinina en un espacio de color HSB. A través de este proceso, el bioensayo exhibió un buen rendimiento colorimétrico mejorado en comparación al espacio de color RGB, que también fue estadísticamente significativo alcanzando una buena respuesta lineal extendida (R^2 0.9698 y RSS 6.86E-06). En consecuencia, en todos los análisis de colorimetría posteriores (para creatina, sarcosina y urea) se emplearon habitualmente

espacios de color RGB y HSB para análisis e informes y se obtuvieron curvas de calibración lineal para la determinación de cada analito.

9.3.2 Creatina

Para el bioensayo de la detección de creatina se aprovechó el mismo mecanismo y reacción en cadena de la degradación de creatinina. Es importante analizar la Ecuación 1; continuando con la reacción que se observa, para la detección de creatina solo se requiere de combinación de tres enzimas: creatinasa (CI) y sarcosina oxidasa (SOx) que degraden la creatina para producir urea y sarcosina, y la sarcosina para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y sus otros productos. Y la última enzima que se utiliza para la respuesta colorimétrica en presencia de H_2O_2 es la peroxidasa.

Para este analito se utilizaron diversas concentraciones de 0,00 a 9 mM y en la Figura 41 podemos observar el diagrama de cromaticidad en un perfil de color CIE 1931 como respuestas colorimétricas asociadas a estas concentraciones. Es interesante comparar estas respuestas de creatina junto con la respuesta colorimétrica de creatinina (Figura 37), tomando el mismo perfil de color CIE 1931 (diagramas de cromaticidad), su área de este diagrama en una región XYZ y, el mapa de colores en RGB.

Para analizar las propiedades espectrales en ambas figuras podemos apreciar un producto colorante marrón efecto del mismo acoplamiento oxidativo del agente cromogénico (o-dianisidina) utilizado en el bioensayo de creatinina y creatina. En la región en XYZ se observa cambio considerable, principalmente en el primer punto ($x=0.4$ y $y=0.338$, aproximadamente). Analizando esta región en XYZ que se muestra en la Figura 41, podemos observar que este punto se separa bastante de los demás, en virtud que se anexo a este análisis colorimétrico un blanco para comparar y apreciar cómo se extiende el área en el diagrama de cromaticidad provocado por un cambio colorimétrico y, por ende, el área de esta región XYZ se extiende.

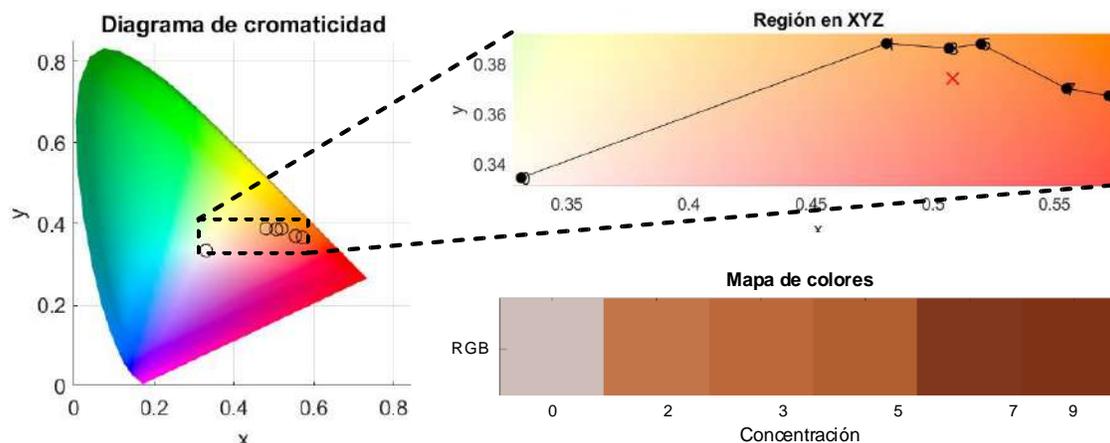


Figura 41. Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo de creatina.

Las intensidades RGB representado en el mapa de colores de la Figura 41 (derecha inferior) en relación con el aumento de las concentraciones de creatina brindan resultados en una escala continua dentro del rango espectral del color café y se puede obtener una lectura visual del aumento de tonalidad en el color. Y para mayor claridad de esto, estos valores se convirtieron en coordenadas colorimétricas en un espacio de color RGB y su triplete dimensional. Los resultados de este análisis colorimétrico se muestran en la Figura 42.

Comparando las ROI del bioensayo de creatina de la Figura 42 versus las ROI del bioensayo de creatinina de la Figura 38, podemos observar similitudes en los cambios colorimétricos provocados por las reacciones enzimáticas y en presencia del agente cromogénico. Dichos cambios de ambos bioensayos están en un rango alrededor del mismo color que se apreciar con mayor claridad en los diagramas de cromaticidad de las Figura 37 y Figura 41.

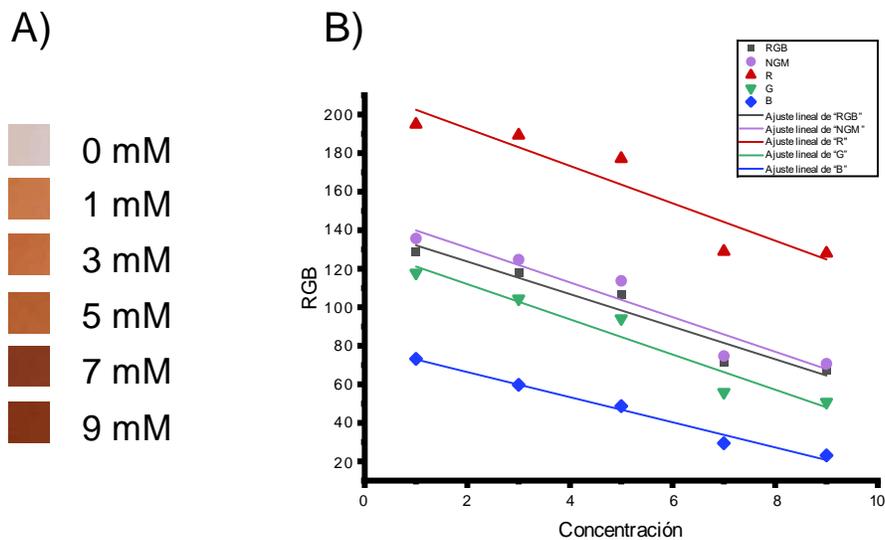
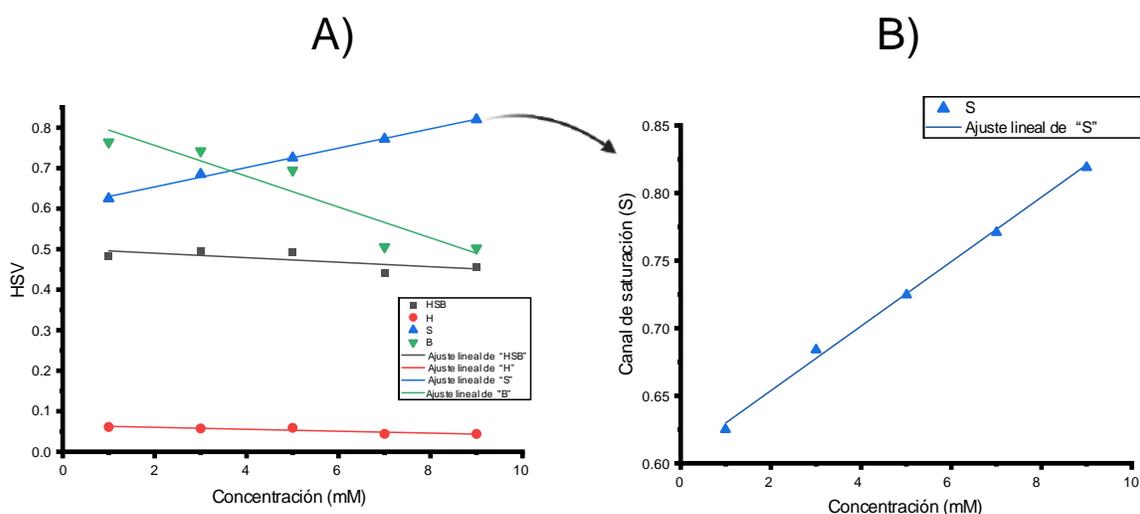


Figura 42. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de creatina con diversas concentraciones (0-9 mM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de creatinina y las respuestas colorimétricas en el espacio RGB. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.

Los valores de los píxeles de las ROI en espacio de color RGB, de su triplete individuales (R, G y B) y del ajuste del valor de gris medio proporcional a las concentraciones del analito se graficaron y se realizó un ajuste lineal para evaluar sus curvas de calibración de cada análisis que podemos apreciar en la Figura 42 B. De los datos de la tabla de parámetros procedente de las curvas de calibración (Figura 42 C), podemos observar una respuesta lineal relevante en el espacio de color RGB (R^2 0.93598), sin embargo, en el análisis extendido del componente individual del canal azul (B) fue estadísticamente significativo con una respuesta lineal superior (R^2 0.98387) y un mejor ajuste del modelo a los datos (RSS 27.9) muy alejado a los demás análisis.

Los resultados de los análisis empleados adicionalmente al estudio colorimétrico en diferentes espacios de color en conjunto de sus componentes individuales (YCbCr, HSB, L*a*b* y CMYK), para el análisis cualitativo del bioensayo de cretina se muestran en el anexo. De estos valores resultantes, los que mayor resaltaron fueron en un espacio de color HSB representados en la Figura 43.



Equation	$y = a + b \cdot x$			
Plot	HSB	H	S	B
Weight	No Weighing			
Intercept	0.5 ± 0.018	0.065 ± 0.0039	0.606 ± 0.005	0.832 ± 0.047
Slope	-0.0056 ± 0.0031	$-0.0024 \pm 6.78E-4$	$0.024 \pm 8.30552E-4$	-0.038 ± 0.0082
RSS	0.00113	5.52E-05	8.28E-05	0.00804
Pearson's r	-0.72247	-0.89694	0.99819	-0.93701
R-Square (COD)	0.52197	0.80449	0.99638	0.87798
Adj. R-Square	0.36263	0.73933	0.99517	0.83731

Figura 43. (A) Relación lineal entre la concentración de creatina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Relación lineal entre la concentración de creatina y las respuestas colorimétricas en el componente saturación (S). (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.

Los pares de valores concentración-señal de los análisis en un espacio de color HSB y de sus componentes dimensionales que mejor se ajustaron a su respectiva curva de calibración fueron los de saturación (componente S) como se aprecia en la Figura 43. La

curva de calibración correspondiente obtuvo un modelo con la recta $y = -0.038x + 0.832$ y fue estadísticamente significativo con una excelente respuesta lineal con $R^2 = 0.9698$ Y $RSS = 6.86E-06$. Con un análisis más profundo de estos datos estadísticos de la tabla de la Figura 43 podemos notar un mejor ajuste del modelo en el canal H con una respuesta estadística de un $RSS = 5.52E-05$, sin embargo, presenta una mayor incertidumbre por su respuesta de un coeficiente de correlación menor ($R^2 = 0.80449$).

9.3.3 Sarcosina

De acuerdo con los bioensayos y análisis anteriores y, continuando tomando como guía la Ecuación 1, para el bioensayo de sarcosina, producto de esta reacción, se aprovechó el mismo mecanismo y reacción de los reactivos de peroxidasa y de un agente cromogénico en presencia de peróxido. A través de este proceso, se determinó el color como señal resultante del análisis colorimétrico.

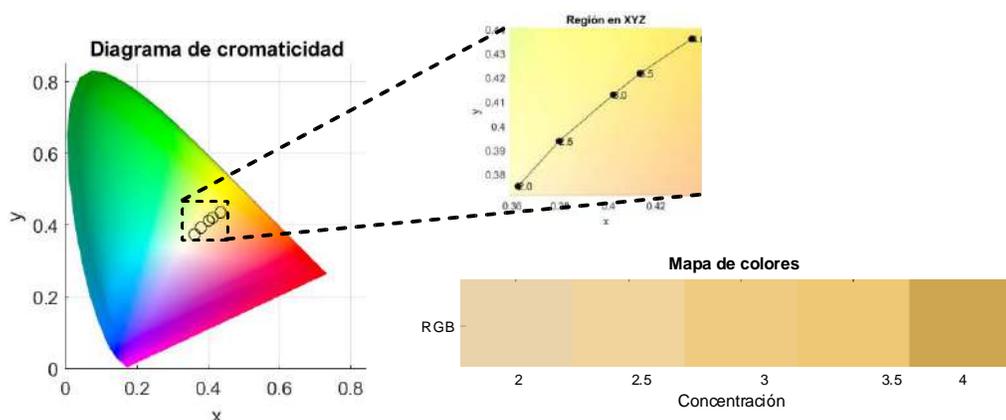
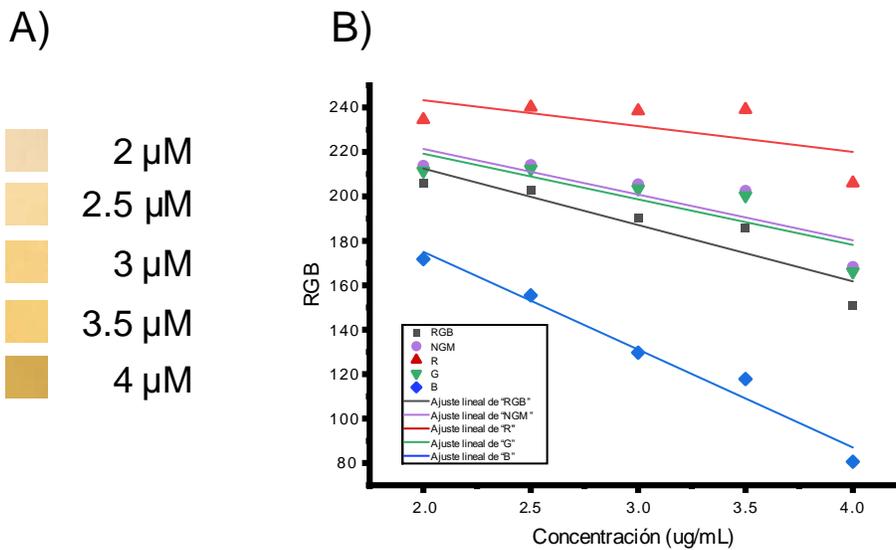


Figura 44. Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo de sarcosina.

En la Figura 44 representaron el diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas, los perfiles de color y los niveles de RGB del bioensayo intercalado con 6 concentraciones diferentes de sarcosina entre 0 a 4 $\mu\text{g/ml}$.

Para este análisis fue necesario utilizar un agente cromogénico distinto, esto aplicado por las pequeñas concentraciones de las soluciones utilizadas y, por ende, las concentraciones de peróxido producidas eran muy bajas. Este cambio es reflejado en las coordenadas del diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 en términos de un análisis colorimétrico, donde se puede apreciar en la Figura 44 los puntos de estas concentraciones junto con el mapa de colores de sus respectivas concentraciones. Comparando estos resultados con los resultados de los dos bioensayos anteriores (creatinina y creatina), podemos apreciar un ligero cambio en el área del diagrama de cromaticidad xy, pero suficientemente considerable para apreciar un desvío en el color de café a amarillento. Sin embargo, se utiliza el mismo procedimiento de descomposición del color para el análisis colorimétrico.

A través del mismo proceso, se determinó las ROI de cada una de las áreas de nuestra muestra (Figura 45 A). Se construyó un plano de calibración para la cuantificación del cambio de las intensidades de color resultante de las diferentes concentraciones de sarcosina mostrados en la Figura 45 B. Para las variaciones de RGB a diferentes concentraciones, los pares de los valores de concentración-señal del canal B presento una excelente respuesta lineal con $R^2 = 0.9724$, $RSS = 137.20477$ y con una curva de calibración correspondiente del modelo con la recta $y = -44.01x + 263.08$ que podemos apreciar en la Figura 45 C.

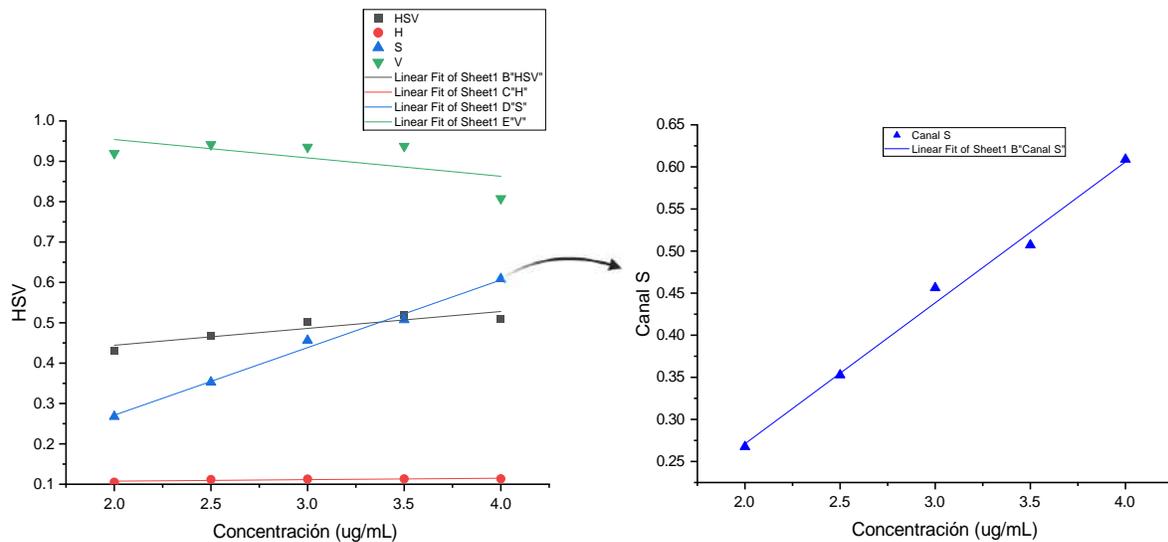


Equation	$y = a + b*x$				
Plot	RGB	NGM	R	G	B
Weight	No Weighting				
Intercept	263.26 ± 19.75	262.44 ± 21.81	266.49 ± 25.19	260.23 ± 21.95	263.08 ± 13.18
Slope	-25.38 ± 6.41	-20.55 ± 7.077	-11.62 ± 8.17	-20.52 ± 7.123	-44.01 ± 4.277
RSS	308.03236	375.5956	501.04138	380.53478	137.20477
Pearson's r	-0.9162	-0.8588	-0.63431	-0.85698	-0.98612
COD	0.83943	0.73754	0.40235	0.73442	0.97244
Adj. R-Square	0.78591	0.65005	0.20314	0.6459	0.96326

Figura 45. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de sarcosina con diversas concentraciones (0-4 uM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el espacio RGB. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de sarcosina.

De las respuestas de concentración-sígnal de un análisis dentro del espacio de color RGB podemos observar que este canal (canal B) obtuvo una excelente respuesta estadística en comparación de los otros análisis de color y un mejor ajuste del modelo con los valores respuestas de concentración-sígnal.

Ampliando el mismo análisis en otros espacios de color, se observó una mayor respuesta en el canal HSB Figura 46 A. Del cual, se resaltó una mayor respuesta estadística en el canal S (Saturation), representado con s curva de calibración en la Figura 46 B.



Equation	$y = a + b \cdot x$			
Plot	HSV	H	S	V
Weight	No Weighting			
Intercept	0.36055 ± 0.03369	0.10042 ± 0.00443	-0.06383 ± 0.02678	1.04507 ± 0.09879
Slope	0.04185 ± 0.01093	0.00365 ± 0.00144	0.16745 ± 0.00869	-0.04555 ± 0.03205
Residual Sum of Squares (RSS)	8.96E-04	1.55E-05	5.66E-04	0.0077
Pearson's r	0.91109	0.82599	0.99598	-0.63436
R-Square (COD)	0.83009	0.68226	0.99199	0.40241
Adj. R-Square	0.77345	0.57635	0.98931	0.20321

Figura 46. (A) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el componente saturación (S). (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.

9.3.4 Urea

Para el bioensayo de la detección de urea dependió del cambio de pH provocado por la degradación de urea favorecido por nuestra enzima de ureasa en el soporte de las moléculas de quitosano. Se utilizó este mecanismo para cuantificar los cambios de color en presencia de la tinta cromogénica de rojo fenol y respecto al pH, que produce un color resultante rosado como se muestra en la Figura 47.

El Diagrama de cromaticidad xy del sistema de color CIE 1931 de la Figura 47, proyecta todos de nuestras pruebas de cada una de las concentraciones como respuestas

colorimétricas del sistema pH-rojo fenol que se utilizó para analizar las propiedades espectrales.

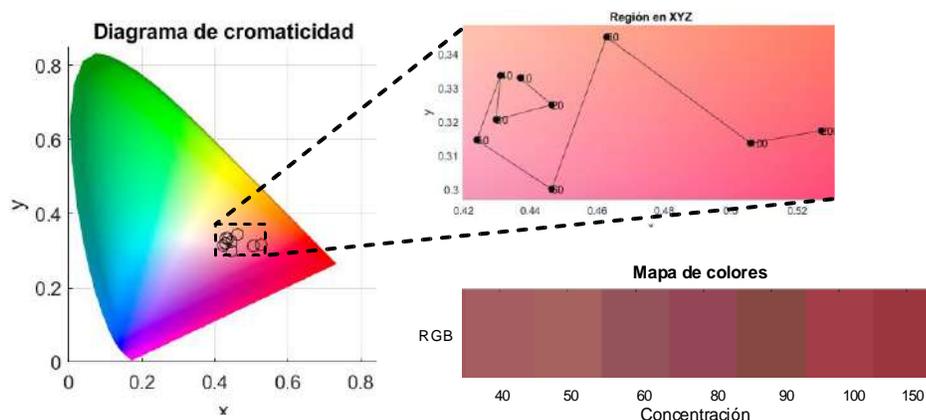
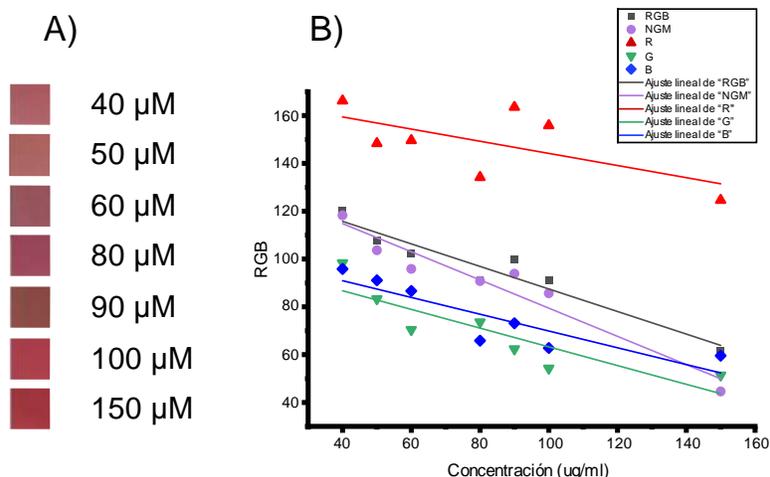


Figura 47. Diagrama de cromaticidad xy del espacio de color CIE 1931 con las coordenadas colorimétricas después de la transformación de color de RGB asociadas a las concentraciones del bioensayo.

Estos valores junto con las intensidades RGB medias se consideraron para obtener un plano de calibración dentro del espacio de color y su descomposición a cada uno de sus componentes dimensionales. Los valores de concentración-sígnal de los píxeles de las ROI en espacio de color RGB, de su triplete individuales (R, G y B) y del ajuste del valor de gris medio proporcional a las concentraciones del analito se representan en el plano de calibración de la Figura 48. Este bioensayo representó un desvío o desenfoque de color de los bioensayos anteriores (creatinina, creatina y sarcosina). Y esto se reflejó en el análisis colorimétrico de las respuestas de concentración-sígnal de urea en el espacio de color y en su triplete R,G y B que se visualiza con mayor claridad en los valores de la tabla estadística resultante de la Figura 48.

El análisis del nivel gris medio (NGM) utilizado como apoyo de otras metodologías resultó mayor con una respuesta lineal de $R^2 = 0.92571$, sin embargo, como se mencionó anteriormente, se tienen que tomar otros parámetros de las variables para optimizar y mejorar el sistema de nuestra curva de calibración. Observando con claridad este análisis del NGM, observamos un RSS = 231.57 y con una curva de calibración correspondiente del

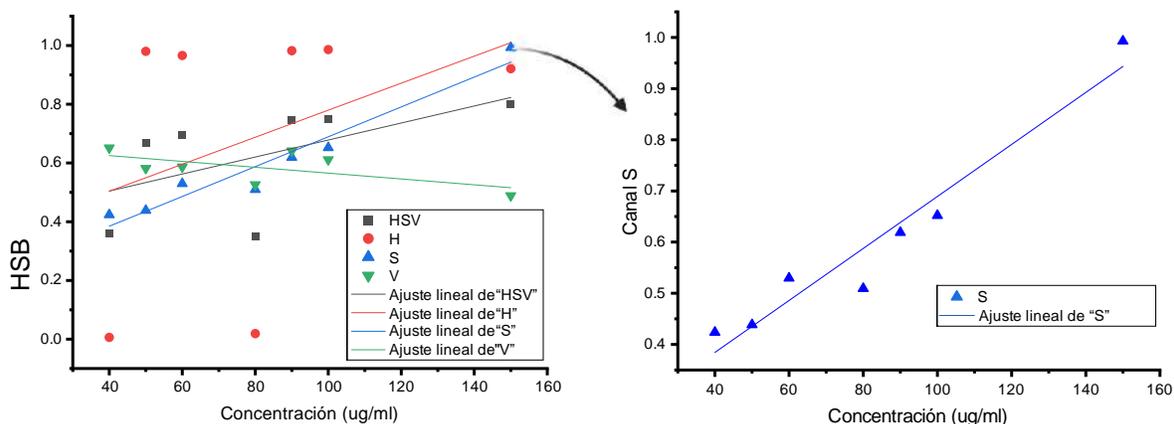
modelo con la recta $y = -0.59x + 138.45$; comparando estos resultados con las respuestas del análisis del triplete RGB observamos una respuesta lineal de $R^2 = 0.923$, ligeramente menor a la de NGM, pero se optó por el resultado de RGB por su respuesta de $RSS = 153.44$ y con una curva de calibración correspondiente del modelo con la recta $y = -0.47x + 135.59$ como observamos en la Figura 48.



Equation	$y = a + b*x$				
Plot	RGB	NGM	R	G	B
Weight	No Weighting				
Intercept	134.59045 ± 5.37991	138.45036 ± 6.60909	169.57746 ± 12.54611	102.40025 ± 8.44695	104.98552 ± 7.12891
Slope	-0.47127 ± 0.06086	-0.59014 ± 0.07476	-0.25377 ± 0.14193	-0.39132 ± 0.09556	-0.35099 ± 0.08065
Residual Sum of Squares	153.44802	231.57629	834.50496	378.27785	269.43663
Pearson's r	-0.96075	-0.96214	-0.62451	-0.87769	-0.88947
R-Square (COD)	0.92303	0.92571	0.39002	0.77033	0.79116
Adj. R-Square	0.90764	0.91085	0.26802	0.7244	0.74939

Figura 48. (A) Segmentación de las ROI del bioensayo de urea con diversas concentraciones (0-200 µM) para el procesamiento de imágenes. (B) Relación lineal entre la concentración de urea y las respuestas colorimétricas en el espacio RGB. (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de sarcosina.

Como en los biomarcadores anteriores, se aplicó un análisis en diferentes espacios de color. Tomando en cuenta los resultados de dichos biomarcadores, se muestra de igual manera los resultados colorimétricos del análisis en el espacio de color HSB (Figura 49)



Equation	$y = a + b \cdot x$			
	HSB	H	S	B
Plot				
Weight	No Weighting			
Intercept	0.38868 ± 0.16445	0.31981 ± 0.46154	0.18123 ± 0.05105	0.665 ± 0.0492
Slope	0.00289 ± 0.00186	0.0046 ± 0.00522	$0.00508 \pm 5.77495E-4$	$-9.95035E-4 \pm 5.56566E-4$
Residual Sum of Squares	0.14338	1.12936	0.01382	0.01283
Pearson's r	0.5712	0.36654	0.96918	-0.62447
R-Square (COD)	0.32627	0.13435	0.93931	0.38997
Adj. R-Square	0.19152	-0.03878	0.92717	0.26796

Figura 49. (A) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el modelo de color HSB. (B) Relación lineal entre la concentración de sarcosina y las respuestas colorimétricas en el componente saturación (S). (C) Tabla de parámetros resultantes del ajuste lineal del análisis colorimétrico de creatina.

El canal S (Saturation) muestra una gran respuesta colorimétrica, con resultados estadísticos favorables con una respuesta lineal de la curva de calibración de $R^2 = 0.9393$, RSS = 153.44 y con una curva de calibración correspondiente del modelo con la recta $y = 0.005x + 0.1812$ como observamos en la Figura 49.

También es importante resaltar la respuesta del canal H (Hue) en este análisis del espacio de color HSB. Notemos que nuestro modelo para nuestra curva de calibración en este canal fue pésimo. Es por ello por lo que se propuso analizar sus respectivos canales respectivamente para optimizar un mejor análisis colorimétrico.

9.3.5 Límites de detección

El límite de detección (LOD, a veces también llamado DL) es la concentración mínima del analito en una muestra de un procedimiento analítico individual que se puede detectar de manera confiable con un nivel específico de confianza (Bedson & Farrant, 2009; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005). Por debajo de este límite, el nivel de discrepancia e incertidumbre aumentan y la respuesta resulta ser poco confiable para ser distintiva del ruido de fondo. El LOD varía dependiendo del analito y de la sensibilidad del equipo y/o técnicas utilizadas y conocer el LOD es importante para conocer la sensibilidad.

Hay varios enfoques que se pueden utilizar para evaluar el LOD. Utilizando en las secciones 6.3 y 6.3.2 de la directriz de validación ICH (The International Council for Harmonisation) en su documento Q2(R1) para calcular de manera confiable el LOD evaluando la desviación estándar de los resultados obtenidos del análisis y la pendiente de la curva de calibración a través de la siguiente ecuación:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

Donde S es la pendiente de la curva de calibración y σ es la desviación estándar de la respuesta (Bedson & Farrant, 2009; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE, 2005). Con este método se encontraron los siguientes límites de detección para cada analito y el espacio de color utilizado para el análisis colorimétrico:

Tabla 10. Límites de detección (LOD) para cada biomarcador en sus respectivos espacios de color.

CANAL	CREATININA	CREATINA	SARCOSINA	UREA
RGB	0.44 Mm	1.54 mM	0.507 ug/ml	38.055 ug/ml
HSB	0.364	0.7264 mN	0.27 ug/ml	34.146 ug/ml

Podemos evidenciar una mayor sensibilidad en el espacio de color HSB en todos los analitos. Como se mencionó anteriormente, es importante realizar un análisis

complementario para cada uno de los canales de los espacios de color utilizados.

9.3.6 Dispositivo microfluídico

La integración de un sistema de enzimas y la adaptación tecnológica de técnicas microfluídicas mejoraron drásticamente el diseño de un dispositivo analítico y, acorde a la investigación, esto permite conseguir enormes propiedades que benefician el diagnóstico temprano y accesible. Durante el diseño y la fabricación se priorizó un dispositivo no invasivo, portátil, rápido, económico, reproducible y, sensible y específico a biomarcadores de creatinina, urea y pH que se pueden asociar a un tipo de daño renal.

El diseño se optimizó para adaptarlo al análisis colorimétrico y facilite la captación de la señal de la reacción colorimétrica por medio de una captación de imagen con el uso de un teléfono inteligente que permite conseguir enormes propiedades que benefician el diagnóstico. El diseño en estrella facilitó un flujo de microfluidos uniforme para múltiples áreas de reconocimiento y obtener respuestas separadas de cada bioensayo. En la Figura 50 muestra un prototipo del biosensor microfluídico basado en papel con integración de tintas cromogénicas, que ayudan a cuantificar cinco analitos simultáneamente.

Nuestro modelo del prototipo se diseñó estructuralmente en dos dimensiones (2D), incorporando una red de canales fluidicos en la plataforma de papel de celulosa (c) y formando barreras hidrofóbicas mediante diversas capas (Figura 50 a,b y d). La técnica de fabricación del dispositivo microfluídico facilitó el desarrollo de estas capas fluidicas e hidrofóbicas. Esta técnica incorpora una cuchilla controlada por computadora y un plotter de corte en lugar de la tradicional impresión de tinta. El plotter y el software utilizado para la manipulación por computadora permitió cortar con precisión nuestro diseño y sus diversas características, incluidas esquinas o agujeros de radio pequeño como se muestra en la Figura 50. **Error! No se encuentra el origen de la referencia..** El corte de cada capa tarda entre 30 y 60 s, dependiendo del material utilizado y de la complejidad de la forma.

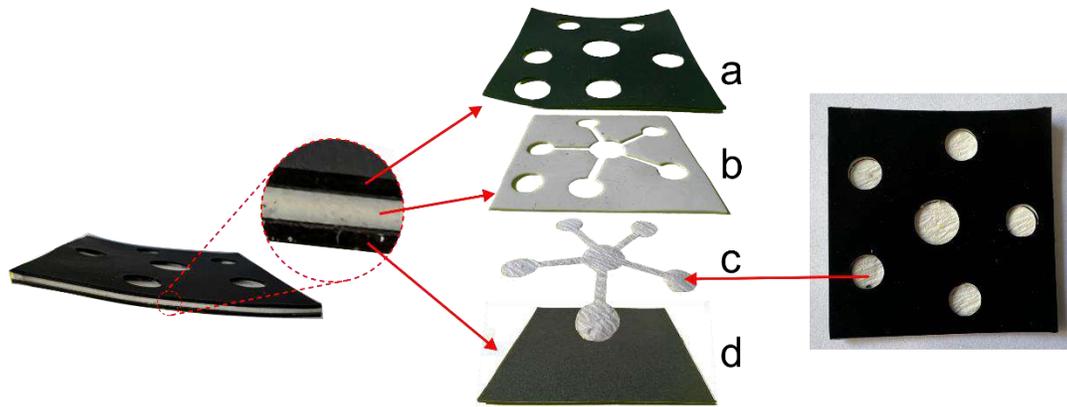


Figura 50. Prototipo del dispositivo microfluídico basado en papel que cuantifica cinco analitos simultáneamente. (a) Capa hidrofóbica superior. (b) Polímero que forman los microcanales. (c) Capa fluidica de papel de celulosa. (d) Capa hidrofóbica inferior.

Nuestro diseño para el sistema de microfluidos en papel consta de un canal central que introduce una muestra en el papel absorbente (se representa con mayor claridad en la Figura 51 en la zona D) y una red de cinco canales fluídicos en la plataforma de papel de celulosa y formando por barreras hidrofóbicas con un polímero (Figura 50 b y c) que dirigen la muestra a cinco áreas de reacción aisladas (Figura 51 zonas A1 - A5), cada una de las cuales contiene reactivos para ensayos. El canal central del dispositivo (Figura 51 en la zona D), transporta la muestra a las cinco zonas de prueba separadas, donde se realizan los bioensayos independientemente.

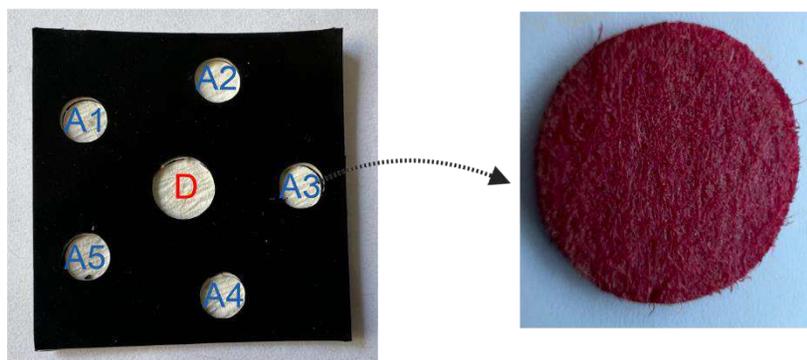


Figura 51. Características del dispositivo microfluídico basado en papel.

9.3.6.1 Manipulación del Dispositivo

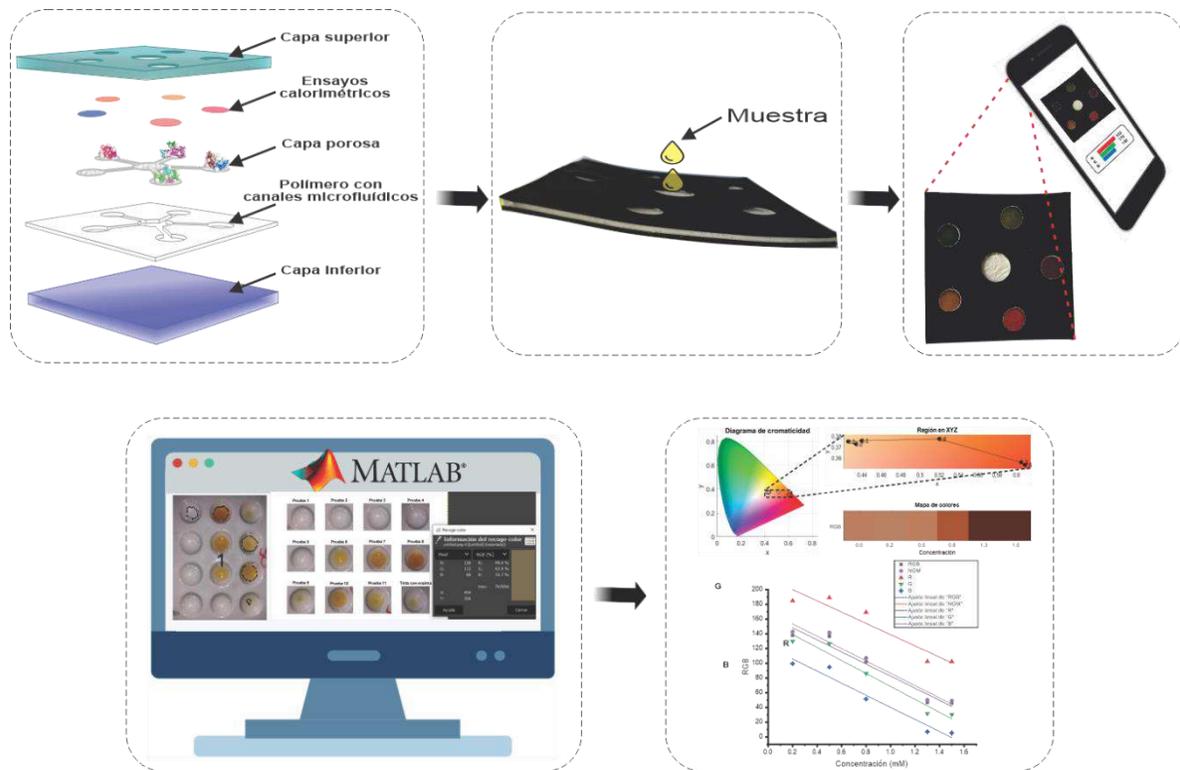


Figura 52. Dispositivo de diagnóstico simple para usuarios finales generales sin experiencia técnica.

El diseño del dispositivo microfluído multifuncionales para análisis colorimétrico para el diagnóstico de problemas renales se optimizó para su fácil uso sin la necesidad de equipo costoso de laboratorio o de personal calificado para su manipulación y, usarlos desde un consultorio, una farmacia e incluso desde el hogar. El dispositivo se conforma de varias capas y diferentes materiales que sirven como plataformas de recolección, manipulación, almacenamiento y bioanálisis.

La muestra se deposita en el área del centro del dispositivo, la capa superior, capa inferior y la capa del polímero con canales microfluídicos que forman barreras hidrofóbicas canales que dirigen la muestra hasta las líneas de reacción y hacia el final de la tira. La capa porosa está conformada por una almohadilla absorbente, y la propiedad de acción capilar pasiva de este material absorbente facilita el flujo unidireccional.

Como se mencionó anteriormente, el dispositivo se diseñó para un manejo simple a los usuarios finales generales sin experiencia técnica, por ende, el control de la velocidad del fluido no es crítico en el análisis y también existe una tolerancia a la variación de volumen en la muestra. Comparándolo con dispositivos que usan técnicas y tecnología similar (ej. la prueba de embarazo), estos ensayos no necesitan un volumen exacto de la muestra, siempre que sea lo suficiente para llegar a las áreas de reacción; de manera similar hemos desarrollado un dispositivo de diagnóstico portátil.

Los fenómenos del cambio de color producidos por las reacciones enzimáticas y por el agente cromogénico nos indican la condición del cambio de color proporcional a las concentraciones del cada analito y se capturaron imagen de estas condiciones de color con la cámara de un teléfono inteligente para un procesamiento de imágenes y un análisis colorimétrico que nos permitió obtener sus curvas de calibración.

10 Conclusión

Con el rápido crecimiento de la población en todo el mundo y, con ello la epidemia y los factores de riesgo de las enfermedades renales, la necesidad de desarrollar dispositivos analíticos de diagnóstico asequibles y fáciles de usar para detectar y monitorear la calidad de vida de los pacientes. En este contexto, el biosensor presentado en esta investigación tiene varias ventajas asociadas analizando brevemente la importancia de los Criterios ASSURED, como su fácil operación ya que no requieren profesionales capacitado, las pruebas requieren de pequeños volúmenes de muestra, se pueden detectar múltiples analitos simultáneamente y, por lo tanto, puede integrarse para el diagnóstico oportuno de la ERC, además de tener la capacidad de brindar los beneficios de una reducción de la mortalidad y de costos médicos.

A partir de los resultados de la síntesis de macromoléculas de quitosano, las pruebas bioquímicas y el estudio de acoplamiento enzimático de la ureasa en macromoléculas de quitosano se concluyó que la selección del polímero de quitosano como plataformas de inmovilización enzimáticas ha sido la indicada para este trabajo de investigación debido a su capacidad de adaptación a las proteínas y sus características que se reportan en la literatura y que mejoran las propiedades enzimáticas. En los resultados de las pruebas bioquímicas, la ureasa inmovilizada mostró una mayor estabilidad mejorada en el rango de pH de 6.5 a 8, y en un intervalo de temperatura 35 a 65 °C, en comparación con la enzima libre. Y para ambas enzimas exhiben su máxima actividad en un pH de 7 y a una temperatura optima de 55 °C. Y en los ensayos de acoplamiento enzimático se encontró que la cantidad de acoplamiento de ureasa fue del 71% de enzima a partir del minuto 30. En conclusión, la inmovilización de ureasa en quitosano mostró resultados análogos a otros estudios comparativos, incluso mejores, además de ofrecer ventajas en la mejora de la estabilidad bioquímicas de la enzima y la técnica de inmovilización utilizada es relativamente sencilla y económica.

Se construyo con éxito un sistema de bioensayos colorimétricos sobre plataforma de papel de celulosa absorbente para la detección de un conjunto de biomarcadores de daño renal. Los cambios de color de en diferentes espacios de color muestran diferentes capacidades de identificación colorimétrica de los analitos. Esta investigación proporciona nuevos conocimientos sobre el análisis colorimétrico en diferentes espacios de color, en donde podemos evidenciar en los resultados de la tabla de los límites de detección, un mejor rendimiento y una mayor sensibilidad en el espacio de color HSB en todos los bioensayos. Además, las herramientas y los sistemas de cómputo de procesamiento de imágenes se pueden utilizar para medir diferentes analitos simultáneamente con el fin de mejorar los procesos de diagnóstico.

11 Perspectivas y trabajo a futuro

Está claro que investigaciones futuras se concentrarán en el avance de dispositivos biomédicos, análogos a este mismo tipo de tecnología para desarrollar pruebas beneficiosas adicionales al diagnóstico, considerando su fácil manejo, su bajo costo y su portabilidad sin precedentes.

Sin bien, la pandemia por SARS-COVID-19 ha despertado interés en el desarrollo y uso de tecnologías emergente avanzadas de biodetección en el control y la vigilancia de enfermedades, por lo tanto, se puede predecir que el biosensor presentado en esta investigación tiene el potencial de convertirse gradualmente en una plataforma útil para el diagnóstico médico potable, inteligentes y en el punto de atención en el futuro para aplicaciones potenciales en campos biomédicos. Nuestras perspectivas futuras pueden apuntar al desarrollo de biosensores con un formato del sistema de sensores que puedan mejorar la portabilidad, la sensibilidad, selectividad, escalables y un programa autónomo de detección que integren una tira o tabla de calibración de color estandarizadas para ayudar en la lectura en diferentes condiciones ambientales teniendo en cuenta las aplicaciones relacionadas con teléfonos inteligentes.

12 Referencias

- Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi-Kangevari, M., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abegaz, K. H., Abolhassani, H., Aboyans, V., Abreu, L. G., Abrigo, M. R. M., Abualhasan, A., Abu-Raddad, L. J., Abushouk, A. I., Adabi, M., Adekanmbi, V., Adeoye, A. M., Adetokunboh, O. O., ... Amini, S. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, *396*(10258), 1204–1222.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- Aggarwal, V., & Pundir, C. S. (2016). Chapter Ten - Rational Design of Nanoparticle Platforms for “Cutting-the-Fat”: Covalent Immobilization of Lipase, Glycerol Kinase, and Glycerol-3-Phosphate Oxidase on Metal Nanoparticles. In C. V. B. T.-M. in E. Kumar (Ed.), *Rational Design of Enzyme-Nanomaterials* (Vol. 571, pp. 197–223). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.01.022>
- Agudelo-Botero, M., González-Robledo, M. C., Reyes-Morales, H., Giraldo-Rodríguez, L., Rojas-Russell, M., Mino-León, D., Ocampo-Morales, D. I., & Valdez-Ortiz, R. (2020). Health care trajectories and barriers to treatment for patients with end-stage renal disease without health insurance in Mexico: A mixed methods approach. *International Journal for Equity in Health*, *19*(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/S12939-020-01205-4/TABLES/4>
- Agudelo-Botero, M., Valdez-Ortiz, R., Giraldo-Rodríguez, L., González-Robledo, M. C., Mino-León, D., Rosales-Herrera, M. F., Cahuana-Hurtado, L., Rojas-Russell, M. E., & Dávila-Cervantes, C. A. (2020). Original research: Overview of the burden of chronic kidney disease in Mexico: secondary data analysis based on the Global Burden of Disease Study 2017. *BMJ Open*, *10*(3).
<https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2019-035285>
- Ah Mew, N., Simpson, K. L., Gropman, A. L., Lanpher, B. C., Chapman, K. A., & Summar, M. L. (2003). *Urea Cycle Disorders Overview*. (M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, G. Mirzaa, & A. Amemiya, Eds.).
- Akinnibosun, O. A., Maier, M. C., Eales, J., Tomaszewski, M., & Charchar, F. J. (2022). Telomere therapy for chronic kidney disease. *Epigenomics*, *14*(17), 1039–1054.
<https://doi.org/10.2217/EPI-2022-0073/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE3.JPEG>

- Alafeef, M., Moitra, P., Dighe, K., & Pan, D. (2021). RNA-extraction-free nano-amplified colorimetric test for point-of-care clinical diagnosis of COVID-19. *Nature Protocols* 2021 16:6, 16(6), 3141–3162. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00546-w>
- Alatawi, F. S., Monier, M., & Elsayed, N. H. (2018). Amino functionalization of carboxymethyl cellulose for efficient immobilization of urease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1018–1025. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.03.142>
- Al-Garawi, Z. S., Taha, A. A., Abd, A. 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. <https://doi.org/10.1155/2022/8288585>
- Amaya, J., Tristancho, A., & Sánchez Castellanos, F. J. (2005). Employing fly ash and FCC catalyzer waste in recovering chrome (III) from liquid effluent emitted by tanneries. *Ingeniería e Investigación*, 25(1), 39–48. <https://doi.org/10.15446/ING.INVESTIG.V25N1.14619>
- American Kidney Fun (AKF). (2023, January). *Serum creatinine test | American Kidney Fund*. <https://www.kidneyfund.org/all-about-kidneys/tests/serum-creatinine-test>
- American Kidney Fund. (2022). *Stages of kidney disease*. <https://www.kidneyfund.org/all-about-kidneys/stages-kidney-disease>
- Amini-Bayat, Z., & Bakhtiari, N. (2017). Cloning, Expression and Purification of Creatininase From Pseudomonas Pseudoalkaligene KF707 in E. coli. *Biomacromolecular Journal*, 3(1), 75–82. https://www.bmmj.org/article_30134.html
- Andrade, J. M., & Gómez-Carracedo, M. P. (2013). Notes on the use of Mandel’s test to check for nonlinearity in laboratory calibrations. *Analytical Methods*, 5(5), 1145–1149. <https://doi.org/10.1039/C2AY26400E>
- Arreola, G., Gutiérrez, P., Zúñiga, L., & Robles, O. (2019). *Enfermedad renal crónica en Aguascalientes*.
- Ávila, J. L. S., & d’Electrònica, U. de Barcelona. D. d’Enginyeries: S. (2017). *Desarrollo de aptasensores para la detección de bacterias enteropatógenas*. Universitat de Barcelona. <https://books.google.com.mx/books?id=DVn1vQEACAAJ>
- Barmore, W., Azad, F., & Stone, W. L. (2021). *Physiology, Urea Cycle*.
- Barr, D. B., Wilder, L. C., Caudill, S. P., Gonzalez, A. J., Needham, L. L., & Pirkle, J. L. (2005). Urinary Creatinine Concentrations in the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic

Monitoring Measurements. *Environmental Health Perspectives*, 113(2), 192.
<https://doi.org/10.1289/EHP.7337>

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>

Bedson, P., & Farrant, T. J. D. (2009). Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide. *Practical Statistics for the Analytical Scientist*.
<https://doi.org/10.1039/9781847559555>

Bendicho, C., Lavilla, I., Pena-Pereira, F., la Calle, I. de, & Romero, V. (2021). Paper-Based Analytical Devices for Colorimetric and Luminescent Detection of Mercury in Waters: An Overview. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(22), 7571. <https://doi.org/10.3390/s21227571>

Benini, S., Musiani, F., & Ciurli, S. (2013). *Urease BT - Encyclopedia of Metalloproteins* (R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, & E. A. Permyakov, Eds.; pp. 2287–2292). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_79

Bennett, M. R., & Devarajan, P. (2017). Characteristics of an Ideal Biomarker of Kidney Diseases. *Biomarkers of Kidney Disease*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803014-1.00001-7>

Berberich, J. A., Chan, A., Boden, M., & Russell, A. J. (2005). A stable three-enzyme creatinine biosensor. 3. Immobilization of creatinine amidohydrolase and sensor development. *Acta Biomaterialia*, 1(2), 193–199.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2004.11.008>

Bernal Juarez, B. (2013). *Tecnología enzimática para la sacarificación de biomásas vegetales en solventes neotéricos = Enzyme technology for plant biomass saccharification in neoteric solvents*.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=96794&info=resumen&idioma=SPA>

Beuth, B., Niefind, K., & Schomburg, D. (2003a). Crystal structure of creatininase from *Pseudomonas putida*: a novel fold and a case of convergent evolution. *Journal of Molecular Biology*, 332(1), 287–301. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00860-x](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00860-x)

Beuth, B., Niefind, K., & Schomburg, D. (2003b). Crystal structure of creatininase from *Pseudomonas putida*: A novel fold and a case of convergent evolution. *Journal of Molecular Biology*, 332(1), 287–301. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00860-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00860-X)

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., Adebayo, O. M., Afarideh, M., Agarwal, S. K., Agudelo-Botero, M., Ahmadian, E., Al-Aly, Z., Alipour, V., Almasi-Hashiani, A., Al-Raddadi, R. M., Alvis-Guzman, N., Amini, S., Andrei, T., Andrei, C. L., ... Murray, C. J. L. (2020). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet (London, England)*, *395*(10225), 709. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3)
- Biró, E., Németh, A. S., Feczko, T., Tóth, J., Sisak, C., & Gyenis, J. (2009). Three-step experimental design to determine the effect of process parameters on the size of chitosan microspheres. In *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* (Vol. 48, Issue 3, pp. 771–779). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2008.10.001>
- Biró, E., Németh, Á., Sisak, C., Feczko, T., & Gyenis, J. (2008). Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *70*, 1240–1246. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.11.005>
- Bomback, A. S., & Bakris, G. L. (2011). Chronic Kidney Disease (CKD) and Hypertension Essentials. In *Jones & Barlett Learning*. Jones & Barlett Learning.
- Bragheri, F., Martinez Vazquez, R., & Osellame, R. (2016). Chapter 12.3 - Microfluidics. In T. B. T.-T.-D. M. U. T. P. Baldacchini (Ed.), *Micro and Nano Technologies* (pp. 310–334). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35321-2.00016-9>
- Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1051*, 15–31. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2012). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 2259. <https://www.worldcat.org/title/862046366>
- Cabrera, S. S. (2004). Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. *Nefrología*, *24*, 27–34. <https://www.revistanefrologia.com/es-definicion-clasificacion-estadios-enfermedad-renal-articulo-X0211699504030666>
- Canzano, P. (2015). *INFLUENCE OF CHRONIC KIDNEY DISEASE ON THE HAEMOSTATIC PROPERTIES, THE PLATELET TRANSCRIPTOMIC AND PLASMA PROTEOMIC PROFILES OF CORONARY ARTERY DISEASE PATIENTS*.
- Carvajal Herrera, J. J., Aristizábal Torres, I. D., Oliveros Tascón, C. E., & Mejía Montoya, J. W. (2011). Colorimetría del Fruto de Café (*Coffea arabica* L.) Durante su Desarrollo y

Maduración . In *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* (Vol. 64, pp. 6229–6240). scieloco .

Cary, P. L. (2021). *The Use of Urine Creatinine Concentrations for Abstinence Monitoring in Treatment Courts*.

Chauhan, S., & Thakur, A. (2023). Chitosan-Based Biosensors-A Comprehensive Review. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2023.01.123>

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>

Chellapandian, M., & Krishnan, M. R. V. (1998). Chitosan-poly (glycidyl methacrylate) copolymer for immobilization of urease. *Process Biochemistry*, 33(6), 595–600. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)80001-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)80001-0)

Clarkson, M. R., Magee, Ciara., & Brenner, B. M. (2010). *Pocket companion to Brenner & Rector's the kidney, 8th edition*. https://books.google.com/books/about/Pocket_Companion_to_Brenner_and_Rector_s.html?hl=es&id=8ak2aBLhdvAC

Colli, V. A., González-Rocha, A., Canales, D., Hernández-Alcáraz, C., Pedroza, A., Pérez-Chan, M., Barquera, S., & Denova-Gutierrez, E. (2022). Chronic kidney disease risk prediction scores assessment and development in Mexican adult population. *Frontiers in Medicine*, 9, 3175. <https://doi.org/10.3389/FMED.2022.903090/BIBTEX>

Condezo Hoyos, L. A., Abderrahim Fichouche, M., & Arribas, S. M. (2015). Análisis colorimétrico de alta eficiencia y de bajo coste mediante visión por computador. *XXXVI Jornadas de Automática. Comité Español de Automática de La IFAC (CEA-IFAC)*, 141–146.

Cooper, J. M., & Cass, A. E. G. (2004). *Biosensors : a practical approach*. Oxford University Press.

Cordero, R., Pagavino, D., Hernández, C., Contrera, M., García, P., Sifontes, M., Flores, Z., Rodríguez, A., Peña, R., Brito, P., & Casañas, R. (2008). Biomarcadores séricos del estado de salud en jóvenes universitarios de acuerdo a su nivel de actividad física. *Revista de La Facultad de Medicina*, 31.

Cornell Universit. (2013). *New tech lets cholesterol-tracking smartphone users take lifesaving selfies*. ScienceDaily. <https://www.sciencedaily.com/releases/2013/12/131213161150.htm>

Cortés-Valencia, A., Ortiz-Rodríguez, S., Balderas-Arteaga, N., Catzin-Kuhlmann, A., Correa-Rotter, R., González-Villalpando, C., Jiménez-Corona, A., López-Ridaura, R., Mejía, M., Salmerón, J., Tamayo, J., Lajous, M., & Denova-Gutiérrez, E. (2022a). The Mexican Consortium of Epidemiological Studies for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Chronic Kidney Disease: a review of collaborating studies. *Salud Pública de México*, *64*(4, jul-ago), 434–442.
<https://doi.org/10.21149/13101>

Cortés-Valencia, A., Ortiz-Rodríguez, S., Balderas-Arteaga, N., Catzin-Kuhlmann, A., Correa-Rotter, R., González-Villalpando, C., Jiménez-Corona, A., López-Ridaura, R., Mejía, M., Salmerón, J., Tamayo, J., Lajous, M., & Denova-Gutiérrez, E. (2022b). The Mexican Consortium of Epidemiological Studies for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Chronic Kidney Disease: a review of collaborating studies. *Salud Pública de México*, *64*(4, jul-ago), 434–442. <https://doi.org/10.21149/13101>

Costa, S., Azevedo, H., & Reis, R. (2005). Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*, 891–930.
<https://doi.org/10.1201/B19038-50>

Crespo, Á. (2018). *Revisión del tratamiento de las alteraciones en el ciclo de la urea*.

Crews, D. C., Bello, A. K., & Saadi, G. (2019). Burden, access, and disparities in kidney disease. *Revista Colombiana de Nefrología*, *6*(1), 74–83.
<https://doi.org/10.22265/ACNEF.6.1.341>

da Silva, E. T. S. G., Souto, D. E. P., Barragan, J. T. C., de F. Giarola, J., de Moraes, A. C. M., & Kubota, L. T. (2017). Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem*, *4*(4), 778–794.
<https://doi.org/10.1002/CELC.201600758>

Dal Dosso, F., Decrop, D., Pérez-Ruiz, E., Daems, D., Agten, H., Al-Ghezi, O., Bollen, O., Breukers, J., De Rop, F., Katsafadou, M., Lepoudre, J., Lyu, L., Piron, P., Saesen, R., Sels, S., Soenen, R., Staljanssens, E., Taraporewalla, J., Kokalj, T., ... Lammertyn, J. (2018). Creasensor: SIMPLE technology for creatinine detection in plasma. *Analytica Chimica Acta*, *1000*, 191–198.
<https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.11.026>

Damião, C. (2019). *Biophysical characterization of sarcosine oxidase: effect of physical and chemical parameters on sarcosine oxidase activity*.

Das, N., Kayastha, A. M., & Malhotra, O. P. (1998). Immobilization of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *27*(1), 25–29.
<https://doi.org/10.1111/J.1470-8744.1998.TB01371.X>

- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013a). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S13205-012-0071-7>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013b). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, *3*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Dong, Y., Luo, X., Liu, Y., Yan, C., Li, H., Lv, J., Yang, L., & Cui, Y. (2022). A disposable printed amperometric biosensor for clinical evaluation of creatinine in renal function detection. *Talanta*, *248*, 123592. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2022.123592>
- Drain, P. K., Hyle, E. P., Noubary, F., Freedberg, K. A., Wilson, D., Bishai, W. R., Rodriguez, W., & Bassett, I. V. (2014). Evaluating Diagnostic Point-of-Care Tests in Resource-Limited Settings. *The Lancet Infectious Diseases*, *14*(3), 239. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70250-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70250-0)
- Dwevedi, A. (2016). *Enzyme Immobilization*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41418-8>
- Eaton, D. C., & Pooler, J. P. (2006). *Fisiología renal de Vander* (6th ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. (2000). Polycation-coated polyanion microspheres of urease for urea hydrolysis. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, *28*(1), 95–111. <https://doi.org/10.3109/10731190009119788>
- Ellison, S. L. R. (2006). In defence of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*, *11*(3), 146–152. <https://doi.org/10.1007/S00769-006-0087-Y/TABLES/3>
- Esquerre, Mendoza; Yrma, L. (2017). Colorimetría capilar. *Universidad Cesar Vallejo*.
- Fassett, R. G., Venuthurupalli, S. K., Gobe, G. C., Coombes, J. S., Cooper, M. A., & Hoy, W. E. (2011). Biomarkers in chronic kidney disease: a review. *Kidney International*, *80*(8), 806–821. <https://doi.org/10.1038/KI.2011.198>
- Fernández Rivas, D. (2008). Microfluidos: ¿cuanto hay de nuevo? *Revista Cubana de Física*, *25*, 142+. <https://link.gale.com/apps/doc/A202564092/IFME?u=anon~658281e6&sid=googleScholar&xid=766aa08a>
- Figuerola-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>

- Firdaus, M. L., Alwi, W., Trinoveldi, F., Rahayu, I., Rahmidar, L., & Warsito, K. (2014). Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry. *Procedia Environmental Sciences*, *20*, 298–304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.03.037>
- Foster, L. S., & Grunfest, I. J. (1937). Demonstration experiments using universal indicators. *Journal of Chemical Education*, 274–276. https://doi.org/10.1021/ED014P274/ASSET/ED014P274.FP.PNG_V03
- Fox, J., Macaluso, F., Moore, C., Mesenbring, E., Johnson, R. J., Hamman, R. F., & James, K. A. (2021). Urine Tungsten and Chronic Kidney Disease in Rural Colorado. *Environmental Research*, *195*, 110710. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.110710>
- Gbinigie, O., Thompson, M., P. Price, C., Heneghan, C., & Plüddemann, A. (2014). *Point-of-Care creatinine testing for the detection and monitoring of chronic kidney disease; Oxford: Primary Care Diagnostic Horizon Scanning Centre Oxford*. <https://www.community.healthcare.mic.nihr.ac.uk/reports-and-resources/horizon-scanning-reports/point-of-care-creatinine-testing-for-the-detection-and-monitoring-of-chronic-kidney-disease#:~:text=Creatinine%20POC%20devices%20allow%20the,or%20End%20stage%20renal%20failure>.
- Geng, Z., Zhang, X., Fan, Z., Lv, X., Su, Y., & Chen, H. (2017). Recent Progress in Optical Biosensors Based on Smartphone Platforms. In *Sensors* (Vol. 17, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/s17112449>
- Gil Ortega, D. (2018). Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos de metabolismo. In *AECOM (Asociación Española para el estudio de errores congénitos del metabolismo)*. <https://ae3com.eu/recursos/>
- GLOBAL HEALTH METRICS. (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. *Lancet (London, England)*, *392*(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)
- Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V., Math, A. A. K., & Vernekar, S. N. (2010a). Markers of renal function tests. *North American Journal of Medical Sciences*, *2*(4). </pmc/articles/PMC3354405/>
- Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V., Math, A. A. K., & Vernekar, S. N. (2010b). Markers of renal function tests. *North American Journal of Medical Sciences*, *2*(4), 170. </pmc/articles/PMC3354405/>

- Guo, K., Ma, X., Sun, G., Zhao, Y., Li, X., Zhao, W., & Kai, L. (2006). Expression and characterization of a thermostable sarcosine oxidase (SOX) from *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 559–566. <https://doi.org/10.1007/S00253-006-0502-7>
- Gutiérrez, I., Domínguez, A., & Acevedo, J. (2003). Fisiopatología del síndrome uremico. *Rev. Hosp. Gral. Dr. M Gea Gonzalez*, 6(1), 13–24.
- Hassan, M. E., Yang, Q., Xiao, Z., Liu, L., Wang, N., Cui, X., & Yang, L. (2019). Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 9(12), 440. <https://doi.org/10.1007/S13205-019-1969-0>
- He, Y., Xue, X., Terkeltaub, R., Dalbeth, N., Merriman, T. R., Mount, D. B., Feng, Z., Li, X., Cui, L., Liu, Z., Xu, Y., Chen, Y., Li, H., Ji, A., Ji, X., Wang, X., Lu, J., & Li, C. (2022). Association of acidic urine pH with impaired renal function in primary gout patients: a Chinese population-based cross-sectional study. *Arthritis Research and Therapy*, 24(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13075-022-02725-W/TABLES/4>
- Higgins, C. (2016a). *Urea and creatinine concentration, the urea:creatinine ratio*.
- Higgins, C. (2016b). *Urea and the clinical value of measuring blood urea concentration*.
- Higson, S. (2012). *Biosensors for Medical Applications*. Woodhead Publishing Ltd.
- Himmelfarb, J., & Ikizler, T. A. (2019). *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation* (4th ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-06007-5>
- Hosaka, T., Meguro, T., Yamato, I., & Shirakihara, Y. (2003). Crystal structure of *Enterococcus hirae* enolase at 2.8 Å resolution. *Journal of Biochemistry*, 133(6), 817–823. <https://doi.org/10.1093/JB/MVG104>
- IBM. (2021). *Regresión lineal: Guardar en conjunto de datos*. <https://www.ibm.com/docs/es/spss-statistics/beta?topic=regression-linear-save-dataset>
- ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. (2005). VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). In *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (4).
- Inamuddin, Khan, R., Mohammad, A., & Asiri, A. M. (2019). *Advanced biosensors for health care applications* (1st ed.).
- INSP. (2020). *La Enfermedad Renal Crónica en México*. <https://www.insp.mx/avisos/5296-enfermedad-renal-cronica-mexico.html#sup2>

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). (2015). *GBD Compare*. Seattle, WA: IHME, University of Washington. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). (2019). *Data catalog (GHDx): México*. <https://www.healthdata.org/mexico>

Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., Saran, R., Wang, A. Y.-M., & Yang, C.-W. (2013). Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*, 382(9888), 260–272. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60687-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60687-X)

Juan Carlos Flores, H. (2010). Enfermedad renal crónica: epidemiología y factores de riesgo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(4), 502–507. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70565-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70565-4)

Juárez Jiménez, P. (2018). *Dispositivo microfluídico modular. Lab-on-a-chip*. <http://oa.upm.es/51820/>

Kakimoto, S., Miyashita, H., Sumino, Y., & Akiyama, S. I. (1990). Properties of Acid Ureases from Lactobacillus and Streptococcus Strains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(2), 381–386. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10869974>

Kalantar-zadeh, K. (2013). Sensors Characteristics. *Sensors*, 11–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5052-8_2

Kamel, K. S., Cheema-Dhadli, S., & Halperin, M. L. (2002). Studies on the pathophysiology of the low urine pH in patients with uric acid stones. *Kidney International*, 61(3), 988–994. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00197.x>

Kayastha, A. M. (2019). Immobilization of Urease on DEAE-Cellulose Strips for One Step Urea Detection. *Annals of the National Academy of Medical Sciences (India)*, 55(01), 024–027. <https://doi.org/10.1055/S-0039-1694076>

Kayastha, A. M., & Srivastava, P. K. (2001). Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) urease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads and its analytical applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 96(1–3), 41–53. <https://doi.org/10.1385/ABAB:96:1-3:041>

Kazancioğlu, R. (2013). Risk factors for chronic kidney disease: an update. *Kidney International Supplements*, 3(4), 368–371. <https://doi.org/10.1038/KISUP.2013.79>

- Keyes, M. H., & Saraswathi, S. (1985). *Immobilized Enzymes BT - Bioactive Polymeric Systems: An Overview* (C. G. Gebelein & C. E. Carraher, Eds.; pp. 249–278). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0405-1_11
- Khan, A., Rangappa, S. M., Siengchin, S., & Asiri, A. M. (n.d.). *Biobased composites : processing, characterization, properties, and applications*.
- Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00649-0>
- Khandual, A., Baci, G., & Rout, N. (2013). Colorimetric Processing of Digital Colour Image. *IJARCSSE*, 3, 7.
- Kim, J. (2018). *Wearable Electrochemical Biosensors for Healthcare Monitoring Applications*. University of California San Diego.
- Kim, S. B., Zhang, Y., Won, S. M., Bandodkar, A. J., Sekine, Y., Xue, Y., Koo, J., Harshman, S. W., Martin, J. A., Park, J. M., Ray, T. R., Crawford, K. E., Lee, K.-T., Choi, J., Pitsch, R. L., Grigsby, C. C., Strang, A. J., Chen, Y.-Y., Xu, S., ... Rogers, J. A. (2018). Super-Absorbent Polymer Valves and Colorimetric Chemistries for Time-Sequenced Discrete Sampling and Chloride Analysis of Sweat via Skin-Mounted Soft Microfluidics. *Small*, 14(12), 1703334.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sml.201703334>
- Kintzios, S. E. (2017). *Portable biosensors and point-of-care systems* (1st ed.).
- 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/DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2593](https://doi.org/DOI:10.1126/scitranslmed.aaf2593)
- Konieczna, I., Zarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesinska, B., Fraczyk, J., Kaminski, Z., & Kaca, W. (2012). Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 789–806. <https://doi.org/10.2174/138920312804871094>
- Krajewska, B. (1991a). Chitin and its derivative as supports for immobilization of enzymes. *Acta Biotechnologica*, 11(3), 269–277. <https://doi.org/10.1002/ABIO.370110319>
- Krajewska, B. (1991b). Chitin and its derivative as supports for immobilization of enzymes. *Acta Biotechnologica*, 11(3), 269–277. <https://doi.org/10.1002/ABIO.370110319>

- Krajewska, B. (1991c). Urease immobilized on chitosan membrane. Inactivation by heavy metal ions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52(2), 157–162. <https://doi.org/10.1002/JCTB.280520203>
- Krajewska, B., Leszko, M., & Zaborska, W. (1990). Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)*, 48(3), 337–350. <https://doi.org/10.1002/JCTB.280480309>
- Kraut, J. A., & Madias, N. E. (2012). Differential Diagnosis of Nongap Metabolic Acidosis: Value of a Systematic Approach. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 7(4), 671. <https://doi.org/10.2215/CJN.09450911>
- Krige, T. (2017). *Screening for Chronic Kidney Disease (CKD) in a high risk population using a Point of Care Instrument for creatinine measurement: A community based study (The Bellville South Africa Study)*.
- Kumar, S., Dwevedi, A., & Kayastha, A. M. (2009). Immobilization of soybean (Glycine max) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1–4), 138–145. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2008.12.006>
- Kumar, S., Kansal, A., & Kayastha, A. (2005). Immobilization of jack bean (Canavalia ensiformis) urease on gelatin and its characterization. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 5(1), 43–47. <https://doi.org/10.3742/OPEM.2005.5.1.043>
- Kurzer, F., & Sanderson, P. M. (1956). Urea in the history of organic chemistry: Isolation from natural sources. *Journal of Chemical Education*, 33(9), 452–459. <https://doi.org/10.1021/ED033P452>
- Kwon, S.-Y., & Na, Y.-A. (2014). Concentration of Serum and Urine Creatinine in Children and Adolescents. *Korean J Clin Lab Sci*, 46(4), 117–123. <https://doi.org/10.15324/KJCLS.2014.46.4.117>
- 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. (2021a). The family of sarcosine oxidases: Same reaction, different products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 704, 108868. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2021.108868>
- Lahham, M., Jha, S., Goj, D., Macheroux, P., & Wallner, S. (2021b). The family of sarcosine oxidases: Same reaction, different products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 704, 108868. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2021.108868>

- Lam, T., Devadhasan, J. P., Howse, R., & Kim, J. (2017a). A Chemically Patterned Microfluidic Paper-based Analytical Device (C- μ PAD) for Point-of-Care Diagnostics. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01343-w>
- Lam, T., Devadhasan, J. P., Howse, R., & Kim, J. (2017b). A Chemically Patterned Microfluidic Paper-based Analytical Device (C- μ PAD) for Point-of-Care Diagnostics. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01343-w>
- Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X. S., Ramsay, A. R., & Peeling, R. W. (2018). REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nature Microbiology* 2018 4:1, 4(1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>
- Landry, D. W., & Bazari, H. (2012). Approach to the Patient with Renal Disease. *Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition*, 1, 708–716. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00116-0>
- Langenfeld, N. J., Payne, L. E., & Bugbee, B. (2021). Colorimetric determination of urea using diacetyl monoxime with strong acids. *PloS One*, 16(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0259760>
- Lee, C. W., Jang, S. H., & Chung, H. S. (2017). Improving the Stability of Cold-Adapted Enzymes by Immobilization. *Catalysts* 2017, Vol. 7, Page 112, 7(4), 112. <https://doi.org/10.3390/CATAL7040112>
- 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>
- Mahdiasanti, I. W., Sabarudin, A., & Sulistyarti, H. (2019). Simultaneous Determination Of BUN-Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Blood using a Microfluidic Paper-based Analytical Devices. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 546(3), 032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/546/3/032019>
- Mak, W. Cheung., & Ho, A. H. Pui. (2022). *Microfluidic biosensors* (1st ed.). Academic Press.
- Malar, C. G., Seenuvasan, M., Kumar, K. S., & Kumar, M. A. (2021). Synthesis and applications of Chitosan: A contemporary macromolecule. In *Microbial and Natural Macromolecules: Synthesis and Applications* (pp. 73–86). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820084-1.00003-X>
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., & Whitesides, G. M. (2007). Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 46(8), 1318–1320. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200603817>

- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M., & Whitesides, G. M. (2008). FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 8(12), 2146–2150. <https://doi.org/10.1039/B811135A>
- Martínez-Valverde, S., Zepeda-Tello, R., Castro-Ríos, A., Toledano-Toledano, F., Reyes-Morales, H., Rodríguez-Matías, A., & Durán-Arenas, J. L. G. (2022). Health Needs Assessment: Chronic Kidney Disease Secondary to Type 2 Diabetes Mellitus in a Population without Social Security, Mexico 2016–2032. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(15). <https://doi.org/10.3390/IJERPH19159010>
- Mazzei, L., Musiani, F., & Ciurli, S. (2020a). The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25(6), 829–845. <https://doi.org/10.1007/S00775-020-01808-W/FIGURES/5>
- Mazzei, L., Musiani, F., & Ciurli, S. (2020b). The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25(6), 829–845. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01808-w>
- McCauley, J., Hamrahian, S. M., & Maarouf, O. H. (2022). *Approaches to chronic kidney disease : a guide for primary care providers and non-nephrologists* (J. McCauley, S. M. Hamrahian, & O. H. Maarouf, Eds.; 1st ed). Cham, Switzerland: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-83082-3>
- Medina Ferrer, F., Hobart, K., & Bailey, J. V. (2020). Field detection of urease and carbonic anhydrase activity using rapid and economical tests to assess microbially induced carbonate precipitation. *Microbial Biotechnology*, 13(6), 1877–1888. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13630>
- Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, J. F., Tapia-Yáñez, T., Muñoz Montes, A., & Aguilar-Sánchez, L. (2010). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 31(1), 7–11. [https://doi.org/10.1016/S1886-2845\(10\)70004-7](https://doi.org/10.1016/S1886-2845(10)70004-7)
- Mesmer, R. E., & Holmes, H. F. (1992). pH, Definition and measurement at high temperatures. *Journal of Solution Chemistry*, 21(8), 725–744. <https://doi.org/10.1007/BF00651506/METRICS>
- Micah, A. E., Bhangdia, K., Cogswell, I. E., Lasher, D., Lidral-Porter, B., Maddison, E. R., Nguyen, T. N. N., Patel, N., Pedroza, P., Solorio, J., Stutzman, H., Tsakalos, G., Wang, Y., Warriner, W., Zhao, Y., Zlavog, B. S., Abbafati, C., Abbas, J., Abbasi-Kangevari, M., ... Dieleman, J. L. (2023). Global investments in pandemic preparedness and COVID-19: development assistance and domestic spending on health between 1990 and 2026. *The Lancet Global Health*, 11(3), e385–e413. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00007-4)

- Moabelo, K. L., Martin, D. R., Fadaka, A. O., Sibuyi, N. R. S., Meyer, M., & Madiehe, A. M. (2021). Nanotechnology-Based Strategies for Effective and Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Materials 2021, Vol. 14, Page 7851, 14(24)*, 7851. <https://doi.org/10.3390/MA14247851>
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment, 29(2)*, 205. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Molina, V. D., Martínez, E. D., Lozano, A. B. P., Peinado, P. J. B., Montero, F. J. C., & Molinuevo, J. S. (2010). *Control biológico del sobreentrenamiento en un mesociclo precompetitivo en triatletas de élite: un estudio piloto*.
- Monika Gööz. (2012). *Chronic Kidney Disease* (M. Gz, Ed.). InTech. <https://doi.org/10.5772/1155>
- Moore, S. (2020). *What are Kidney Biomarkers?* <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Kidney-Biomarkers.aspx>
- Morbioli, G. G., Mazzu-Nascimento, T., Stockton, A. M., & Carrilho, E. (2017). Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) - A review. *Analytica Chimica Acta, 970*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.037>
- Mulagalapalli, S., Kumar, S., Kalathur, R. C. R., & Kayastha, A. M. (2007). Immobilization of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan*) on agar tablets and its application in urea assay. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 142(3)*, 291–297. <https://doi.org/10.1007/S12010-007-0022-7>
- Nagel, B., Dellweg, H., & Gierasch, L. M. (1992). *Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992)*. *64(1)*, 143–168. <https://doi.org/doi:10.1351/pac199264010143>
- Narang, J., Pundir, C. S., & Pan Stanford Publishing. (2017). *Biosensors : an introductory textbook* (1st ed.). Pan Stanford.
- Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel, Switzerland), 21(4)*, 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
- National Center for Biotechnology Information. (2023a). *creatinine | C4H7N3O |*. PubChem Compound Summary for CID 588. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/creatinine>

- National Center for Biotechnology Information. (2023b). *PubChem Compound Summary for CID 1176, Urea*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Urea>.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2018). *Los riñones y su funcionamiento | NIDDK*. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-rinones/rinones-funcionamiento>
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2016). *Chronic Kidney Disease (CKD)*. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/chronic-kidney-disease-ckd/causes>
- National Kidney Foundation. (2014). *Urinalysis and Kidney Disease: What You Need to Know*.
- Nelson, & Lee, D. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. Fourth edition. New York : W.H. Freeman, 2005. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999964334502121>
- Nemiwal, M., Zhang, T. C., & Kumar, D. (2022). Enzyme immobilized nanomaterials as electrochemical biosensors for detection of biomolecules. *Enzyme and Microbial Technology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.ENZMICTEC.2022.110006>
- Nur Ashakirin, S., Aniq Shazni, M., Hazani, M., Farhanulhakim M. Razipwee, M., & Mahmoudi, E. (2022). Urease immobilized electrodeposited silver reduce graphene oxide modified screen-printed carbon electrode for highly urea detection. *Measurement*, 196, 111058. <https://doi.org/10.1016/j.MEASUREMENT.2022.111058>
- Ogawa, S., Nako, K., Okamura, M., & Ito, S. (2015). Lower urinary pH is useful for predicting renovascular disorder onset in patients with diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 3(1), e000097. <https://doi.org/10.1136/BMJDR-2015-000097>
- Oujji, N. Ben, Bakas, I., Istamboulié, G., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Rouillon, R., & Noguier, T. (2014). An easy-to-use colorimetric enzymatic test-system for organophosphorus insecticides detection in olive oil. *Science and Innovation*, 2(6), 5. <https://doi.org/10.11648/J.SI.S.2014020601.12>
- Ozdalga, E., Ozdalga, A., & Ahuja, N. (2012). The smartphone in medicine: a review of current and potential use among physicians and students. *Journal of Medical Internet Research*, 14(5), e128. <https://doi.org/10.2196/jmir.1994>
- Ozkan, S. A., Uslu, B., & Sezgintürk, M. K. (2023). *Biosensors : fundamentals, emerging technologies, and applications* (1st ed.). <https://doi.org/10.1201/9781003189435>
- Pandey, C. M., & Malhotra, B. D. (2019). *Biosensors : fundamentals and applications* (2nd ed.). Walter de Gruyter GmbH.

- 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). scielo.es .
- Pereira, B. J. G., Sayegh, M. H., & Blake, P. G. (2005). *Chronic Kidney Disease, Dialysis, & Transplantation* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-0158-4.X5001-0>
- Preedy, V. R., & Patel, V. B. (2015). General methods in biomarker research and their applications. In *General Methods in Biomarker Research and their Applications* (Vols. 1–2). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7696-8>
- Pundir, C. S., Jakhar, S., & Narwal, V. (2019). Determination of urea with special emphasis on biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, *123*, 36–50. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2018.09.067>
- Pundir, C. S., Kumar, P., & Jaiwal, R. (2019). Biosensing methods for determination of creatinine: A review. *Biosensors & Bioelectronics*, *126*, 707–724. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2018.11.031>
- Rapp, B. E. (2017). Chapter 1 - Introduction. In B. E. B. T.-M. M. Rapp *Mechanics and Mathematics* (Ed.), *Micro and Nano Technologies* (pp. 3–7). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3141-1.50001-0>
- Rasooly, A., & Herold, K. E. (2009). *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols Vol.1 : Optical-Based Detectors*. Humana Press. <http://books.google.com/books?id=sZBvngEACAAJ&pgis=1>
- Rasouli, Z., Abdollahi, H., & Maeder, M. (2020). Generalized indicator-based determination of solution pH. *Analytica Chimica Acta*, *1109*, 90–97. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.03.004>
- Reddy K., R. C., Srivastava, P. K., Dey, P. M., & Kayastha, A. M. (2004). Immobilization of pigeonpea (*Cajanus cajan*) urease on DEAE-cellulose paper strips for urea estimation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *39*(Pt 3), 323–327. <https://doi.org/10.1042/BA20030122>
- Reuber, B. E., Karl, C., Reimann, S. A., Mihalik, S. J., & Dodt, G. (1997). Cloning and functional expression of a mammalian gene for a peroxisomal sarcosine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(10), 6766–6776. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.10.6766>
- Rifai, N., Horvath, A. R. (Andrea R., & Wittwer, C. (Carl). (2018). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 1867. <https://www.worldcat.org/title/953707981>

- Rikitake, K., Oka, I., Ando, M., Yoshimoto, T., & Tsuru, D. (1979). Creatinine amidohydrolase (creatininase) from *Pseudomonas putida*. Purification and some properties. *Journal of Biochemistry*, *86*(4), 1109–1117.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132605>
- Rodríguez de Cossío, A., & Rodríguez Sánchez, R. (2011). Pruebas de laboratorio en atención primaria (II). *Medicina de Familia. SEMERGEN*, *37*.
<https://doi.org/10.1016/j.semerg.2010.12.003>
- Romeo, A., Leung, T. S., & Sánchez, S. (2016). Smart biosensors for multiplexed and fully integrated point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip*, *16*(11), 1957–1961.
<https://doi.org/10.1039/C6LC90046A>
- Rosado, Edith; Villalobos, M. (2019). *Relacion De Valores De La Urea Y Creatinina En Los Adultos Mayores De La Casa Hogar San Martin De Porres* [Universidad Norbert Wiener]. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/3332>
- Sakhuja, A., MBBS, FACP, FASN, & FCCP. (2021). *Novel Biomarkers of Kidney Function: Introduction and Overview*. <https://emedicine.medscape.com/article/1925619-overview>
- Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, E. P., Contreras-Esquivel, J. C., Medina-Morales, M. A., Aguilar, C. N., & Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, *37*(3), 504–512.
<https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140085>
- Sastre, D. E., Reis, E. A., & Marques Netto, C. G. C. (2020). Chapter Four - Strategies to rationalize enzyme immobilization procedures. In C. V. B. T.-M. in E. Kumar (Ed.), *Nanoarmoring of Enzymes with Carbon Nanotubes and Magnetic Nanoparticles* (Vol. 630, pp. 81–110). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.09.003>
- Scialla, J. J., Appel, L. J., Astor, B. C., Miller, E. R., Beddhu, S., Woodward, M., Parekh, R. S., & Anderson, C. A. M. (2012). Net endogenous acid production is associated with a faster decline in GFR in African Americans. *Kidney International*, *82*(1), 106–112.
<https://doi.org/10.1038/KI.2012.82>
- Shariati, S., & Khayatian, G. (2022). A new method for selective determination of creatinine using smartphone-based digital image. *Microfluidics and Nanofluidics*, *26*(4), 1–9.
<https://doi.org/10.1007/S10404-022-02538-Y/METRICS>
- 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>

- Shephard, M. D. S. (2011). Point-of-Care Testing and Creatinine Measurement. *The Clinical Biochemist Reviews*, 32(2), 109. /pmc/articles/PMC3100277/
- Shephard, M., Peake, M., Corso, O., Shephard, A., Mazzachi, B., Spaeth, B., Barbara, J., & Mathew, T. (2010). Assessment of the Nova StatSensor whole blood point-of-care creatinine analyzer for the measurement of kidney function in screening for chronic kidney disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(8), 1113–1119. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.238>
- Siedel, J., Deeg, R., Seidel, H., Mollering, H., Staepels, J., Gauhl, H., & Ziegenhorn, J. (1988). Fully Enzymatic Colorimetric Assay of Serum and Urine Creatinine Which Obviates the Need for Sample Blank Measurements. *Analytical Letters*, 21(6), 1009–1017. <https://doi.org/10.1080/00032718808071927>
- Soleymani, L., & Li, F. (2017). Mechanistic Challenges and Advantages of Biosensor Miniaturization into the Nanoscale. *ACS Sensors*, 2(4), 458–467. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00069>
- Srinivasa Rao, M., Chellapandian, M., & Krishnan, M. R. V. (1995). Immobilization of urease on gelatin - poly (HEMA) copolymer preparation and characterization. *Bioprocess Engineering*, 13(4), 211–214. <https://doi.org/10.1007/BF00367256/METRICS>
- Srivastava, P. K., Kayastha, A. M., & Srinivasan. (2001). Characterization of gelatin-immobilized pigeonpea urease and preparation of a new urea biosensor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 34(1), 55–62. <https://doi.org/10.1042/BA20010016>
- Svane, S., Sigurdarson, J. J., Finkenwirth, F., Eitinger, T., & Karring, H. (2020). Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65107-9>
- Tauber, Henry. (1934). The Chemical Nature of Enzymes. *Chemical Reviews*, 15(1), 99–121. <https://doi.org/10.1021/cr60050a003>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. In *Biosensors & bioelectronics* (Vol. 16, Issues 1–2). [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00115-4)
- Tietz, N. W., Burtis, C. A., & Ashwood, E. R. (1994). *Tietz textbook of clinical chemistry*. Saunders.
- Travieso-González, C. M. (2018). *Colorimetry and Image Processing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68246>

- Tricoli, A., & Neri, G. (2018). Miniaturized Bio-and Chemical-Sensors for Point-of-Care Monitoring of Chronic Kidney Diseases. In *Sensors* (Vol. 18, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/s18040942>
- Tutak, A. Ş., & Findikli, H. A. (2021). Could Urine pH be a New Parameter for Mortality? *Progress in Nutrition*, 23(2), 2021211. <https://doi.org/10.23751/PN.V23I2.11626>
- Umair, M., Aamir Cheema, M., Cheema, O., Li, H., Lu, H., Watters, P., Ceesay, E., Qi, M., & Islam, M. S. (2021). Impact of COVID-19 on IoT Adoption in Healthcare, Smart Homes, Smart Buildings, Smart Cities, Transportation and Industrial IoT. *Sensors 2021*, Vol. 21, Page 3838, 21(11), 3838. <https://doi.org/10.3390/S21113838>
- Vaidya, S. R., & Aeddula, N. R. (2022a). Chronic Renal Failure. *The Scientific Basis of Urology, Second Edition*, 257–264. <https://doi.org/10.29309/tpmj/2009.16.04.2736>
- Vaidya, S. R., & Aeddula, N. R. (2022b). Chronic Renal Failure. *The Scientific Basis of Urology, Second Edition*, 257–264. <https://doi.org/10.29309/tpmj/2009.16.04.2736>
- Valdez-Ortiz, R., Navarro-Reynoso, F., Olvera-Soto, M. G., Martin-Alemañy, G., Rodríguez-Matías, A., Hernández-Arciniega, C. R., Cortes-Pérez, M., Chávez-López, E., García-Villalobos, G., Hinojosa-Heredia, H., Camacho-Aguirre, A. Y., Valdez-Ortiz, Á., Cantú-Quintanilla, G., Gómez-Guerrero, I., Reding, A., Pérez-Navarro, M., Obrador, G., & Correa-Rotter, R. (2018). Mortality in Patients With Chronic Renal Disease Without Health Insurance in Mexico: Opportunities for a National Renal Health Policy. *Kidney International Reports*, 3(5), 1171. <https://doi.org/10.1016/J.EKIR.2018.06.004>
- Vasquez-Jimenez, E., & Madero, M. (2020). Global Dialysis Perspective: Mexico. *Kidney360*, 1(6), 534–537. <https://doi.org/10.34067/KID.0000912020>
- Villafañe, H. H. M. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2.a edición*. Editorial Universidad de Antioquia. <https://books.google.com.mx/books?id=5RjS6B0X5RgC>
- Vinisa, H., Villegas, A., & Cuevas Valencia, R. (2019). *HERRAMIENTAS PARA EL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES EN DISPOSITIVOS MÓVILES. TOOLS FOR DIGITAL IMAGE PROCESSING ON MOBILE DEVICES. 2–3*, 17–23.
- Wagner, M. A., & Jorns, M. S. (2000). Monomeric sarcosine oxidase: 2. Kinetic studies with sarcosine, alternate substrates, and a substrate analogue. *Biochemistry*, 39(30), 8825–8829. <https://doi.org/10.1021/B1000350Y>

- Wahba, M. I., & Hassan, M. E. (2017). Agar-carrageenan hydrogel blend as a carrier for the covalent immobilization of β -D-galactosidase. *Macromolecular Research*, 25(9), 913–923. <https://doi.org/10.1007/S13233-017-5123-8/METRICS>
- Wang, J. (2020). *Application of Microfluidics in Biosensors* (Y. Ren, Ed.; p. Ch. 4). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91929>
- Weiner, I. D., Mitch, W. E., & Sands, J. M. (2015). Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 10(8), 1444. <https://doi.org/10.2215/CJN.10311013>
- Willie, A., Edmondson, D. E., & Jorns, M. S. (1996). Sarcosine Oxidase Contains a Novel Covalently Bound FMN⁺. *Biochemistry*, 35(16), 5292–5299. <https://doi.org/10.1021/BI952995H>
- Wilson, L., Illanes, A., Romero, O., & Ottone, C. (2023). Future perspectives in enzyme immobilization. *Biocatalyst Immobilization*, 403–426. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91317-1.00009-8>
- Woolf, M. S., Dignan, L. M., Scott, A. T., & Landers, J. P. (2021). Digital postprocessing and image segmentation for objective analysis of colorimetric reactions. *Nature Protocols*, 16(1), 218–238. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00413-0>
- Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews*, 80(3), 1107–1213. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2000.80.3.1107/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0300087020.JPEG>
- Xu, X., Wu, X., Zhuang, S., Zhang, Y., Ding, Y., & Zhou, X. (2022). Colorimetric Biosensor Based on Magnetic Enzyme and Gold Nanorods for Visual Detection of Fish Freshness. *Biosensors*, 12(2), 135. <https://doi.org/10.3390/BIOS12020135/S1>
- Yang, J., & He, W. (2020). *Chronic Kidney Disease: Diagnosis and Treatment*. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9131-7>
- 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>
- Yokoyama, M. (2021). *The Urea Cycle Step by Step*. News-Medical. <https://www.news-medical.net/health/The-Urea-Cycle-Step-by-Step.aspx>
- Younes-Ibrahim, M. S., & Younes-Ibrahim, M. (2022). Biomarkers and kidney diseases: a brief narrative review. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 7(0). <https://doi.org/10.21037/JLPM-22-1/COIF>

- Yu, Q., Chen, J., Fu, W., Muhammad, K. G., Li, Y., Liu, W., Xu, L., Dong, H., Wang, D., Liu, J., Lu, Y., & Chen, X. (2022). Smartphone-Based Platforms for Clinical Detections in Lung-Cancer-Related Exhaled Breath Biomarkers: A Review. *Biosensors*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/bios12040223>
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* *2018*, Vol. 8, Page 92, *8*(2), 92. <https://doi.org/10.3390/CATAL8020092>
- Zhang, J., & Chen, J. (2021). 肌酐水解酶研究进展 Creatinine Hydrolases: A Review. *Pharmacy Information*, *10*(03), 142–146. <https://doi.org/10.12677/PI.2021.103019>
- Zhang, W. R., & Parikh, C. R. (2019). Biomarkers of Acute and Chronic Kidney Disease. *Annual Review of Physiology*, *81*, 309. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-020518-114605>
- Zhang, Y., Guo, H., Kim, S. B., Wu, Y., Ostojich, D., Park, S. H., Wang, X., Weng, Z., Li, R., Bandodkar, A. J., Sekine, Y., Choi, J., Xu, S., Quaggin, S., Ghaffari, R., & Rogers, J. A. (2019). Passive sweat collection and colorimetric analysis of biomarkers relevant to kidney disorders using a soft microfluidic system. *Lab on a Chip*, *19*(9), 1545–1555. <https://doi.org/10.1039/C9LC00103D>
- Zhao, L. M., Shi, L. E., Zhang, Z. L., Chen, J. M., Shi, D. D., Yang, J., & Tang, Z. X. (2011). Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *28*(3), 353–362. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000300001>
- Zhu, X., Liu, W., Shuang, S., Nair, M., & Li, C.-Z. (2017). Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications. In R. Narayan (Ed.), *Medical Biosensors for Point of Care (POC) Applications* (1st ed.). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100072-4.00006-X>

13 Anexo

13.1 Análisis colorimétrico de creatinina

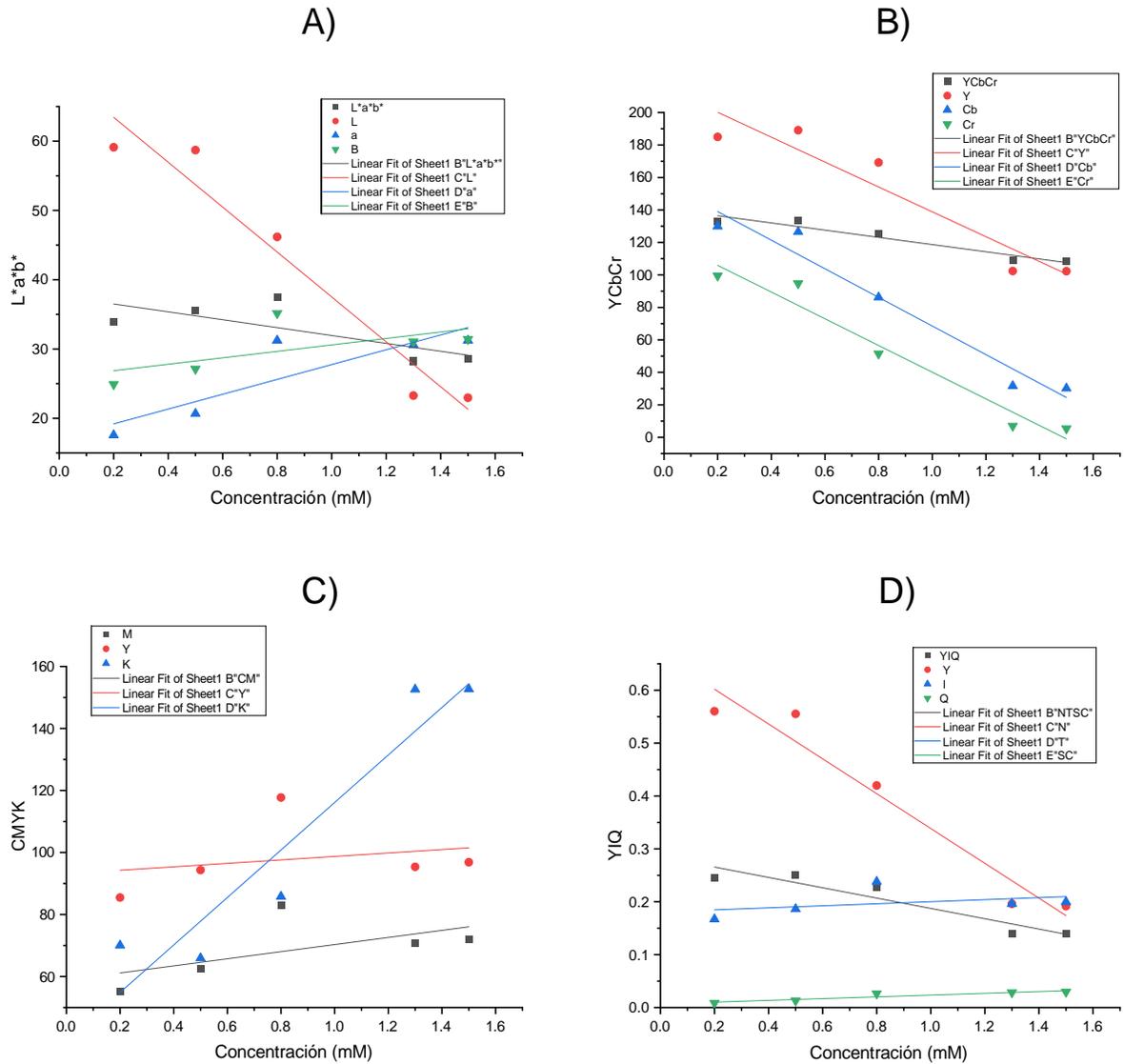


Figura 53. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr; (C) CMYK y (D) NTSC o YIQ del biomarcador de creatinina.

13.2 Análisis colorimétrico de creatina

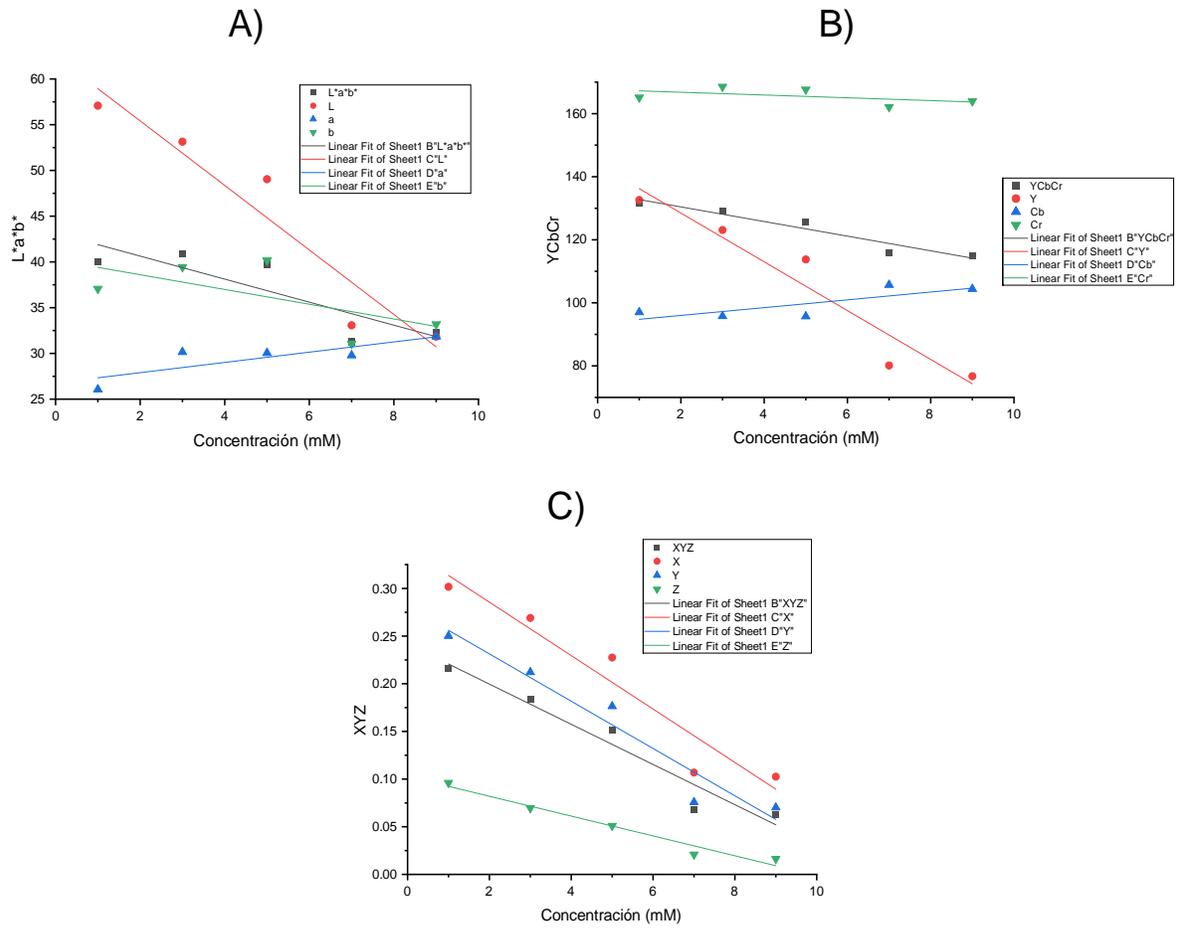


Figura 54. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr y (C) XYZ del biomarcador de creatinina.

13.3 Análisis colorimétrico de sarcosina

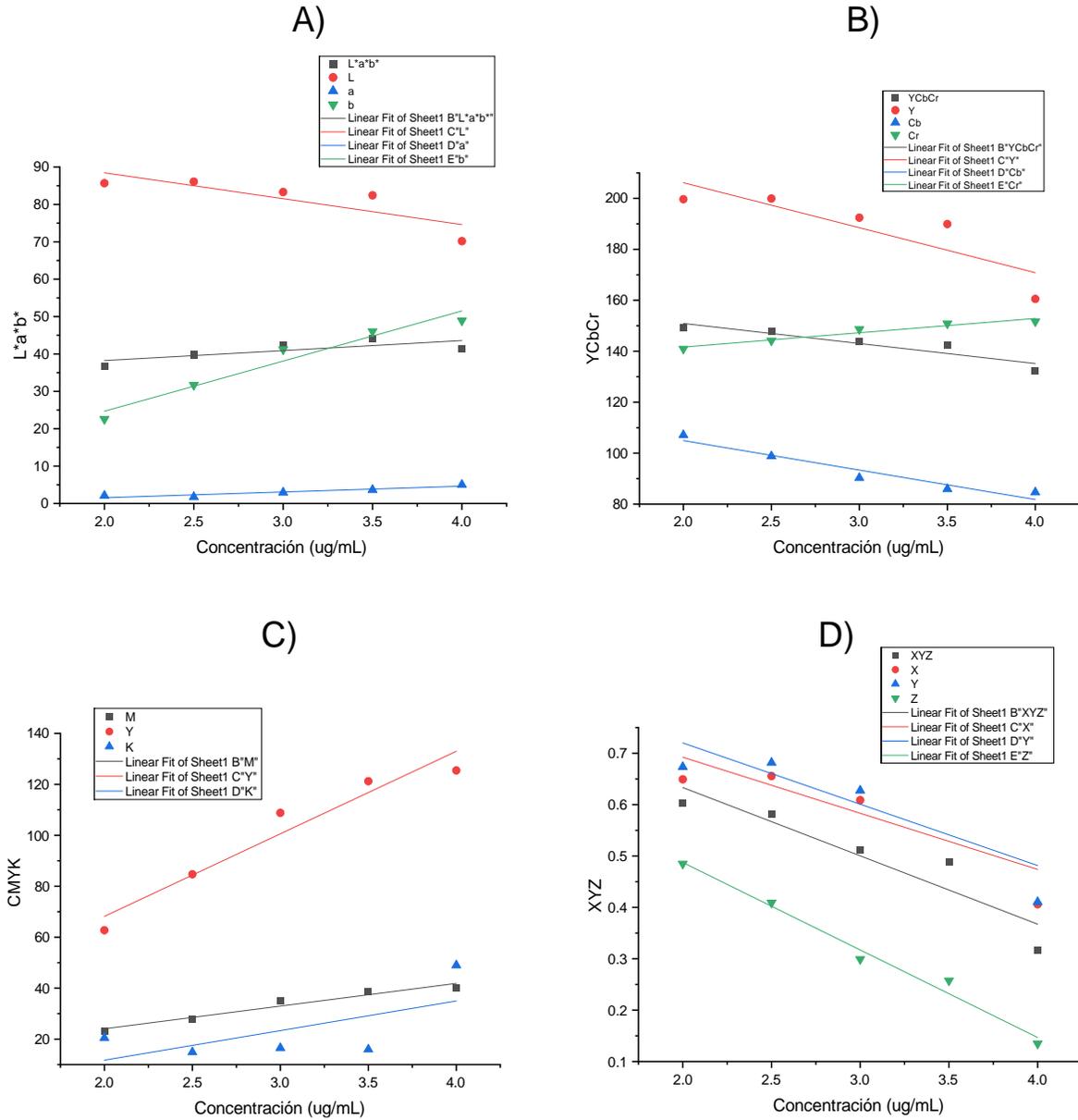


Figura 55. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr; (C) CMYK y (D) XYZ del biomarcador de sarcosina.

13.4 Análisis colorimétrico de urea

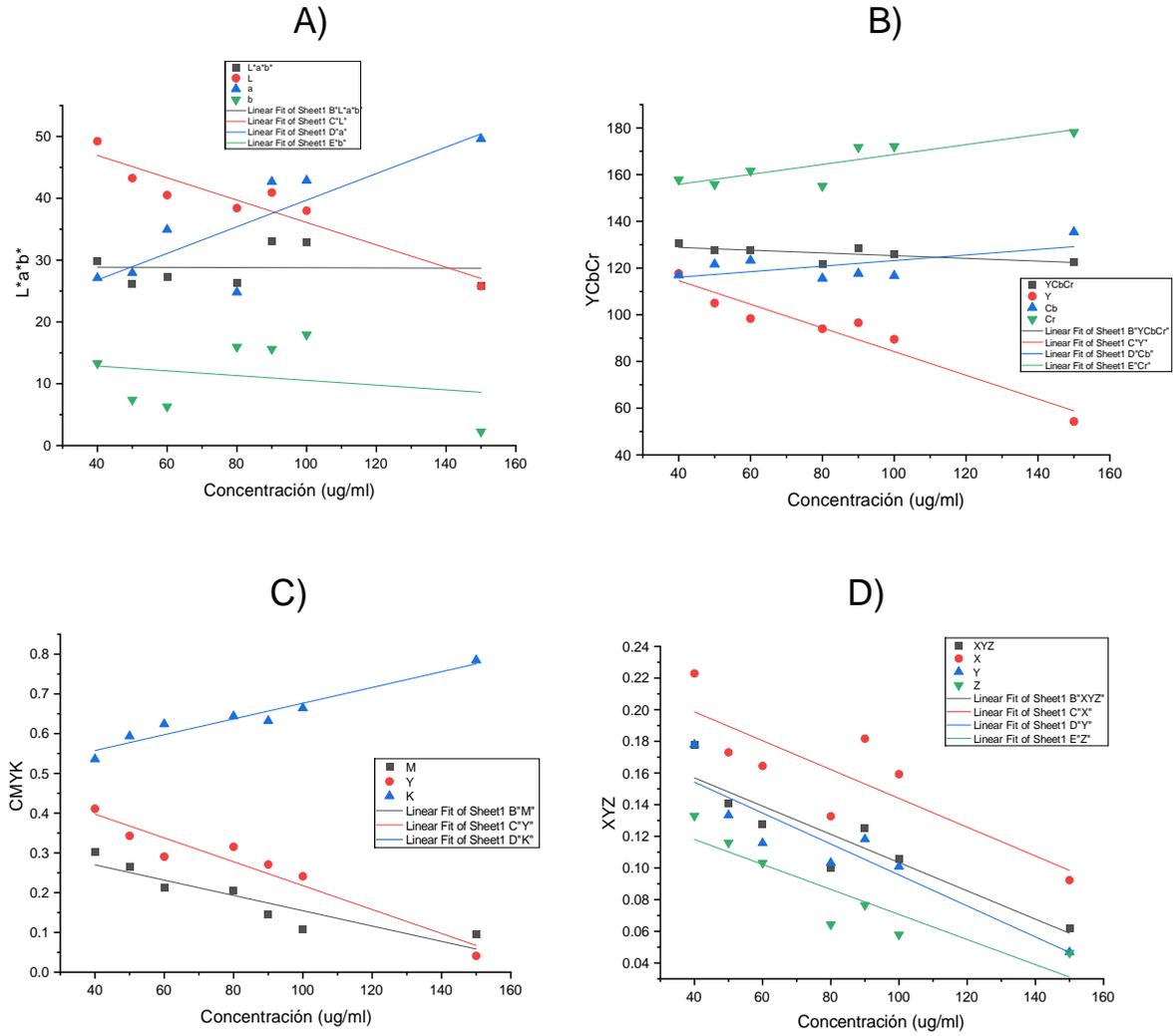


Figura 56. Gráfico señal-concentración y curva de calibración de los espacios de color: (A) $L^*a^*b^*$; (B) YCbCr; (C) CMYK y (D) XYZ del biomarcador de urea.

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

CRISTIAN EDUARDO FLORES ARREOLA

Por haber participado en el
**FONDO DE FOMENTO A LA CULTURA
EMPREDEDORA.**

Campus Querétaro

13 de septiembre de 2021

Santiago de Querétaro, Qro. México.



Dr. Manuel Toledano Ayala
DIRECTOR
FACULTAD DE INGENIERÍA

La Secretaría de Educación del Poder Ejecutivo del Estado de Querétaro,
a través de su Consejo de Ciencia y Tecnología

Otorga el presente

Reconocimiento

Para las siguientes personas:

Cristian Eduardo Flores Arreola, Andrea Soledad Parrales Argueta y Florencia Aylen

Tennant

Universidad Autónoma de Querétaro

Por su contribución como miembros del equipo que desarrolló el Proyecto "Multi-sensor colorimétrico no invasivo para detección de biomarcadores de daño renal en orina" el cual obtuvo el 1er lugar en la modalidad de Educación Superior, dentro del proceso de evaluación durante el "Encuentro de Jóvenes Talentos Querétaro 2021", en el marco de la 12va edición del programa de Nuevos Talentos Científicos y Tecnológicos promovido e impulsado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Querétaro.

Santiago de Querétaro, Qro., 09 de febrero de 2022


Dr. Enrique Rabell García
Director General del CONCYTEQ



La Secretaría de Educación del Poder Ejecutivo del Estado de Querétaro, a través de su Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONCYTEQ)

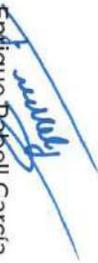
Otorga la presente:

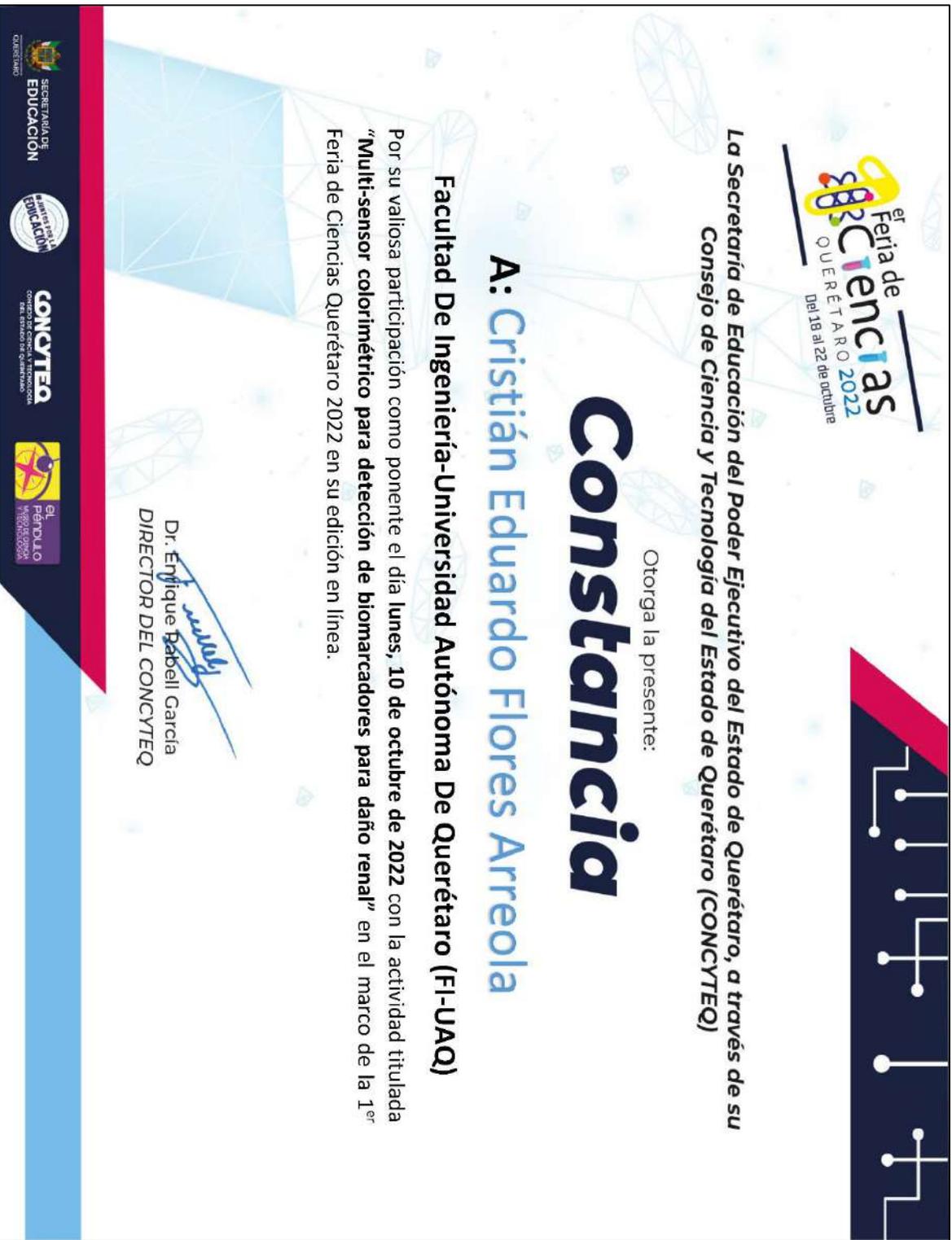
Constancia

A: **Cristián Eduardo Flores Arreola**

Facultad De Ingeniería-Universidad Autónoma De Querétaro (FI-UAQ)

Por su valiosa participación como ponente el día **lunes, 10 de octubre de 2022** con la actividad titulada **“Multi-sensor colorimétrico para detección de biomarcadores para daño renal”** en el marco de la 1^{er} Feria de Ciencias Querétaro 2022 en su edición en línea.


Dr. Enrique Rabell Garcia
DIRECTOR DEL CONCYTEQ





UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO



FACULTAD
DE INGENIERÍA

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
A TRAVÉS DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

otorga el presente

RECONOCIMIENTO a:

CRISTIÁN EDUARDO FLORES ARREOLA

por haber obtenido el primer lugar en el Concurso Nuevos Talentos Científicos y Tecnológicos 2022 del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro con su proyecto "Biosensor y app para detectar daño renal".

26 de Mayo de 2022.
Santiago de Querétaro, Qro. México.

"EL ingenio para crear, no para destruir"

Dr. Manuel Toledano Ayala
DIRECTOR
FACULTAD DE INGENIERÍA

M.D.M. Carmen Sosa Garza
SECRETARIA ACADÉMICA
FACULTAD DE INGENIERÍA

MOVIMIENTO EMPRENDEDOR

Se otorga la presente:

CONSTANCIA

a: **Biomarcador para enfermedad renal**

Por su participación

En el marco del "DETONA Fest – Movimiento Emprendedor"

organizado por la Dirección de Innovación de la Universidad Autónoma de Querétaro.

16 y 17 de marzo del 2023.



Dra. Ma. Cuydalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado UAQ



Dr. Alberto de Jesús Pastrana Palma
Director de Innovación UAQ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE INNOVACIÓN



LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

Cristian Eduardo Flores Arreola, Abraham Ulises Chávez Ramírez, Alejandra Álvarez López, Vanessa Vallejo Becerra y Juan de Dios Galindo de la Rosa

Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

MULTI-SENSOR ENZIMÁTICO PARA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL

Ixtapa Zihuatanejo, Gro., a 11 - 15 de septiembre del 2023



DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
PRESIDENTA MDN 2022-2024



DR. LUIS FLORES COTERA
PRESIDENTE DEL CONGRESO



DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
SECRETARIA MDN 2022-2024