



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

---

---

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE  
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA  
APLICACIÓN DE BIOSENSORES  
COLORIMÉTRICOS DE DIAGNÓSTICO DE  
PREECLAMPSIA**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A:  
MONSERRATH PERALES ESPINOZA.**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa.**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.**

---

---



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



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

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

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

### Bajo los siguientes términos:



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



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



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

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

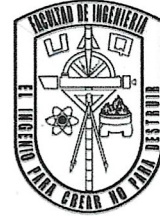
### Avisos:

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

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



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ingeniería**



**Especialidad en Ingeniería en Nanotecnología**

**“INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE  
NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA APLICACIÓN  
DE BIOSENSORES COLORIMÉTRICOS DE DIAGNÓSTICO  
DE PREECLAMPSIA”.**

**TESIS**

Que como para obtener el grado de  
**INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA**

**Presenta:**

**Monserrath Perales Espinoza.**

**Dirigido por:**

**Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa.**

Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa.

Presidente

Dra. Alejandra Álvarez López.

Secretario

Dra. Vanessa Vallejo Becerra.

Vocal

Dr. Andrés Dector Espinoza.

Suplente

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Marzo, 2025

México.

## ***Resumen.***

La preeclampsia a nivel global es la principal causa de muerte materna en el mundo, sin embargo, según las investigaciones recientes, se cree que hay una posibilidad de que hasta el 60% de dichas defunciones puedan ser evitables al realizar y garantizar un diagnóstico oportuno, ya que hasta hoy aún no existe un tratamiento ni causalidad definida, sumándole, que los métodos convencionales para la detección de esta enfermedad se basa principalmente en el análisis químico de laboratorio (enfocado en la función hepática y renal); y a pesar de que dichos métodos pueden y suelen producir datos precisos, éstos tienen la limitante de que no pueden usarse fuera de laboratorios, en clínicas o de manera privada y personal, además de que pueden considerarse como costosos y que tienden a necesitar de tiempo para dar resultados, por lo que no se pueden considerar como de respuesta inmediata, es por ello que en este trabajo de tesis se propuso y se desarrolló un biosensor microfluídico colorimétrico con inmovilización de enzimas sobre nanopartículas de quitosano junto con agentes cromogénicos para proporcionar una nueva estrategia de diagnóstico fácil de usar, portátil, barata, no invasiva y rápida para que con la identificación de biomarcadores tempranos en el embarazo, como lo son la creatinina y el ácido úrico, se evalué la función renal y hepática, ya que en niveles altos de los mismos se determina si existe daño renal y hepático y se confirma la presencia de esta enfermedad, para lograr así evitar nacimientos prematuros y maximizar la supervivencia infantil y materna.

De manera general, los resultados de este dispositivo fueron satisfactorios, obtenidos a partir de las curvas de calibración de las pruebas colorimétricas, cuantitativas y cualitativas de los analitos de interés, con coeficientes de determinación por arriba de 0.9 en todas las pruebas, y con límites de detección bastante aceptables y competentes.

***Palabras clave:*** Biosensor, colorimétrico, nanotecnología, enzima, preeclampsia, nanopartículas, nanoesferas, quitosano.

***Abstract.***

Preeclampsia is the leading cause of maternal death worldwide, however, according to recent research, it is believed that there is a possibility that up to 60% of these deaths could be preventable by making and ensuring a timely diagnosis, since to date there is still no treatment or defined causality, adding that conventional methods for the detection of this disease is based mainly on chemical laboratory analysis (focused on liver and kidney function); and although such methods can and usually do produce accurate data, they are limited by the fact that they cannot be used outside laboratories, in clinics or privately and personally, and can be considered expensive and tend to take time to give results, so they cannot be considered to be immediately responsive, for those reasons, in this thesis work a colorimetric microfluidic biosensor with enzyme immobilization on chitosan nanoparticles with chromogenic agents was proposed and developed to provide a new, easy to use, portable, cheap, non-invasive and fast diagnostic strategy for the identification of early biomarkers in pregnancy, such as creatinine and uric acid, to evaluate renal and hepatic damage, because identification of early biomarkers in pregnancy, such as creatinine and uric acid, can be used to evaluate renal and hepatic function, since high levels of these biomarkers determine whether renal and hepatic damage is present and confirm the presence of this disease, in order to avoid premature births and maximize infant and maternal survival.

***Keywords:*** *Biosensor, colorimetric, nanotechnology, enzyme, preeclampsia, nanoparticles, nanospheres, chitosan.*



### ***Dedicatoria.***

*A mi perro Loki que fue, es y siempre será mi gran maestro, ya que me ayudó a recordar lo más importante de la vida: amor incondicional, autenticidad, fuerza y ser uno mismo a toda costa, este trabajo va por ti porque me salvaste, te amo infinitamente.*

*A mi abuela que aunque teníamos una promesa que no logramos cumplir presencialmente, sé que en todas partes y todo el tiempo prevalecemos, entonces tarde pero seguro, se la dedico con mucho cariño.*

*Y por último, pero no menos importante, con mucho amor y agradecimiento eterno a mi familia, a mis padres y hermana, que siempre han creído en mí sin dudar y me han apoyado, comprendido y alentándome estado presente en cada paso importante en mi vida.*



### ***Agradecimientos.***

A mi familia (padres y hermana) por todo el apoyo, esfuerzo y presencia en mi vida, incluyendo esta etapa significativa de formación profesional, gracias por nunca dudar de mí y darme libertad completa.

Al Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa por darme la oportunidad y permitirme trabajar y aprender con él, además de su apoyo y comprensión en todo momento, siempre estaré profundamente agradecida por ello. A la Dra. Alejandra Álvarez López, a la Dra. Vanessa Vallejo Becerra y al Dr. Andrés Dector Espinoza, por toda la confianza, esfuerzo, dedicación y aprendizaje que me han brindado hasta el momento. Y por todas las oportunidades que me han brindado para mi crecimiento tanto profesional, académico y personal y por permitirme formar parte del laboratorio y enriquecer mis conocimientos en el área de biosensores.

A todos los miembros del Laboratorio de Biosensores BIOSENS de la Facultad de Ingeniería, con y de quienes he aprendido y me han ayudado con experiencia y conocimientos.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al proyecto FIN202211 del Fondo para el Desarrollo del Conocimiento FONDEC-UAQ2022 y al Fondo de Cultura Emprendedora 2022 por los recursos, espacios y tiempos ofrecidos para poder llevar a cabo esta investigación, agradecido de todas las oportunidades y apoyos brindados.

Y a mí misma, por todo mi esfuerzo, tiempo, energía y recursos invertidos, y que solamente yo sé cuan significativo ha sido, y gracias al universo, a la energía divina y a la vida porque sigo aquí existiendo y avanzando.

**Índice.**

<b>Resumen.</b>	<b>I</b>
<b>Abstract.</b>	<b>II</b>
<b>Dedicatoria.</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos.</b>	<b>IV</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>11</b>
<b>2. Planteamiento del problema.</b>	<b>14</b>
<b>3. Justificación.</b>	<b>15</b>
<b>4. Hipótesis.</b>	<b>16</b>
<b>5. Objetivos.</b>	<b>17</b>
<b>5.1 Objetivo general.</b>	<b>17</b>
<b>5.2 Objetivos específicos.</b>	<b>17</b>
<b>6. Antecedentes.</b>	<b>18</b>
<b>6.1 Preeclampsia.</b>	<b>18</b>
<b>6.2 Diagnóstico para preeclampsia.</b>	<b>23</b>
<b>6.3 Marcadores bioquímicos para la preeclampsia.</b>	<b>26</b>
<b>6.4 Ácido úrico en preeclampsia.</b>	<b>31</b>
<b>6.5 Creatinina en preeclampsia.</b>	<b>33</b>
<b>6.6 Hiperuricemia: ácido úrico y creatinina como marcadores de gravedad en preeclampsia.</b>	<b>34</b>
<b>6.7 Biosensores.</b>	<b>37</b>
<b>6.8 Enzimas como biorreceptores en biosensores catalíticos.</b>	<b>39</b>
<b>6.8.1 Uricasa o urato oxidasa</b>	<b>42</b>
<b>6.8.2 Creatininasa o creatinina amidohidrolasa</b>	<b>44</b>

<b>6.9 Inmovilización de enzimas en nanomateriales y uso el quitosano como soporte.</b>	<b>47</b>
<b>6.10 Quitosano como soporte para inmovilización enzimática.</b>	<b>49</b>
<b>6.11 Nanopartículas de quitosano.</b>	<b>52</b>
<b>7. Metodología.</b>	<b>55</b>
<b>7.1 Síntesis de las macroesferas de quitosano.</b>	<b>55</b>
<b>7.2 Funcionalización de las macroesferas de quitosano.</b>	<b>57</b>
<b>7.3 Síntesis de las nanoesferas de quitosano.</b>	<b>58</b>
<b>7.4 Funcionalización de las nanoesferas de quitosano.</b>	<b>60</b>
<b>7.5 Caracterizaciones.</b>	<b>62</b>
<b>7.5.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para macroesferas y nanoesferas de quitosano.</b>	<b>62</b>
<b>7.5.2 Espectroscopia Raman (RS) para macro y nanoesferas de quitosano.</b>	<b>63</b>
<b>7.6 Inmovilización de las enzimas en macroesferas de quitosano.</b>	<b>63</b>
<b>7.7 Inmovilización de las enzimas en nanoesferas de quitosano.</b>	<b>64</b>
<b>7.8 Método para la cuantificación de proteínas.</b>	<b>65</b>
<b>7.8.1 Prueba de acoplamiento en las macroesferas de quitosano.</b>	<b>66</b>
<b>7.8.2 Prueba de acoplamiento en las nanoesferas de quitosano.</b>	<b>69</b>
<b>7.9 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano.</b>	<b>69</b>
<b>7.9.1 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano con respecto al efecto del Sustrato.</b>	<b>76</b>
<b>7.9.2 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano con respecto al efecto del pH.</b>	<b>81</b>
<b>7.9.3 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano con respecto al efecto de la Temperatura</b>	<b>87</b>

<b>7.10 Pruebas colorimétricas.</b>	<b>94</b>
<b>7.10.1 Análisis colorimétrico cuantitativo por espectroscopia ultravioleta (UV-Vis).</b>	<b>96</b>
<b>7.10.2 Análisis colorimétrico por medio de un colorímetro.</b>	<b>105</b>
<b>7.11 Evaluación de los metabolitos de interés por medio de colorimetría.</b>	<b>106</b>
<b>7.11.1 Determinación de parámetros de desempeño.</b>	<b>107</b>
<b>7.12 Diseño del prototipo de un biosensor microfluídico colorimétrico.</b>	<b>109</b>
<b>8. Resultados y discusión.</b>	<b>111</b>
<b>8.1 Caracterizaciones de las nanoesferas de quitosano.</b>	<b>111</b>
<b>8.1.1 Caracterización por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de las nanoesferas de quitosano.</b>	<b>111</b>
<b>8.1.2 Caracterización por Espectroscopia Raman de las nanoesferas de quitosano.</b>	<b>114</b>
<b>8.2 Evaluación Enzimática del ácido úrico (uricasa).</b>	<b>116</b>
<b>8.2.1 Evaluación del acoplamiento enzimático de la uricasa.</b>	<b>116</b>
<b>8.2.2 Evaluación de la actividad enzimática del ácido úrico (uricasa) con respecto al efecto del Sustrato.</b>	<b>120</b>
<b>8.2.3 Evaluación de la actividad enzimática del ácido úrico (uricasa) con respecto al efecto del pH.</b>	<b>122</b>
<b>8.2.4 Evaluación de la actividad enzimática del ácido úrico (uricasa) con respecto al efecto de la Temperatura.</b>	<b>125</b>
<b>8.3 Determinación colorimétrica del ácido úrico (uricasa).</b>	<b>128</b>
<b>8.3.1 Determinación colorimétrica del ácido úrico (uricasa) por muestras.</b>	<b>128</b>
<b>8.3.2 Determinación colorimétrica de ácido úrico (uricasa) por RGB y distancias euclidianas.</b>	<b>129</b>
<b>8.4 Evaluación Enzimática de la creatinina (creatininasa).</b>	<b>136</b>

<b>8.5</b>	<b><i>Determinación colorimétrica de la creatinina (creatininasa).</i></b>	<b>136</b>
8.5.1	<i>Determinación colorimétrica de creatinina (creatininasa) por muestras.</i>	137
8.5.2	<i>Determinación colorimétrica de creatinina por RGB y distancias euclidianas.</i>	138
<b>8.6</b>	<b>Evaluación Enzimática de la creatina (creatinasa).</b>	<b>145</b>
<b>8.7</b>	<b><i>Determinación colorimétrica de la creatina (creatinasa).</i></b>	<b>145</b>
8.7.1	<i>Determinación colorimétrica de creatina (creatinasa) por muestras.</i>	145
8.7.2	<i>Determinación colorimétrica de creatina por RGB y distancias euclidianas.</i>	146
<b>8.8</b>	<b>Evaluación Enzimática de la sarcosina (sarcosina oxidasa).</b>	<b>153</b>
<b>8.9</b>	<b><i>Determinación colorimétrica de la sarcosina (sarcosina oxidasa).</i></b>	<b>153</b>
8.9.1	<i>Determinación colorimétrica de sarcosina por muestras.</i>	153
8.9.2	<i>Determinación colorimétrica de sarcosina por RGB y distancias euclidianas.</i>	154
8.10	<i>Diseño del prototipo del biosensor colorimétrico.</i>	161
<b>9.</b>	<b>Trabajo futuro.</b>	<b>163</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones.</b>	<b>163</b>
<b>11.</b>	<b>Referencias.</b>	<b>166</b>
<b>ANEXOS.</b>		<b>189</b>



## **1. Introducción.**

En el embarazo los trastornos hipertensivos como la preeclampsia, la eclampsia, la hipertensión son una causa importante de morbilidad aguda grave, discapacidad y muerte entre madres y recién nacidos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), durante la gestación estos trastornos aquejan alrededor del 10% de todas las mujeres embarazadas del mundo, y en lugares como Asia y África, aproximadamente una décima parte de todas las defunciones maternas están coligadas con trastornos tensionales del embarazo, mientras que por otro lado, en América Latina una cuarta parte de todos los fallecimientos maternos tienen relación con esas problemáticas en la gestación (WHO World Health Organization, 2011).

A nivel global, cada 3 minutos muere una mujer a causa de la preeclampsia, y cerca de 50,000 mujeres mueren anualmente. Este síndrome afecta a entre 3 y 10% de los embarazos, y es la principal causa de muerte materna en el mundo. En México, por cada 1,000 nacimientos la incidencia es de 47.3 (Velumani *et al.*, 2021).

Puntualmente, acorde a la literatura, alrededor de treinta mil muertes anuales son causadas por la preeclampsia, la eclampsia, el síndrome HELLP (que por su denominación en inglés significa Hemólisis, Enzimas hepáticas elevadas y Plaquetas bajas, y es una presentación particular de la preeclampsia severa) o cualquier otro tipo de trastorno hipertensivo. En Estados Unidos, los trastornos que tienen que ver con la hipertensión representan cerca del 7.4% de las aproximadamente ochocientas muertes asociadas al embarazo que ocurren cada año en dicho país (Pacheco, 2018).

Se cree que hay una posibilidad de que incluso el 60% de las muertes maternas relacionadas con la hipertensión, como la preeclampsia y la eclampsia, puedan ser potencialmente eludibles debido a que la mayoría de estos trastornos pueden evitarse proporcionando una atención y un tratamiento oportuno y eficaz a las madres que presentan tales complicaciones, así como promoviendo y optimizando la prevención de este tipo de enfermedades. Es por lo anterior que es importante realizar y garantizar un diagnóstico oportuno y a tiempo, para que así enfermedades



como la preeclampsia puedan ser atendidas para evitar complicaciones más severas como la muerte durante el embarazo.

La preeclampsia es uno de los trastornos que se asocian con la hipertensión, su origen es placentario con causa desconocida, aunque se cree que algunos factores como los hereditarios y adquiridos, los inmunológicos, los ambientales, los individuales o de parentesco tienden a interactuar de diferentes formas para así ocasionar la aparición de esta enfermedad, pero se tiene que lo que siempre está presente cuando surge la preeclampsia es la isquemia útero-placentaria que se puede identificar a través de un reemplazo incompleto de la capa muscular de la pared de ramas terminales de las arterias uterinas, mejor conocidas como las arteriolas espirales, realizado en los periodos de la doceava a la catorceava semana y de la dieciseisava a la dieciochoava semana del embarazo por las células trofoblásticas, lo que provoca la aparición de vasos sanguíneos de elevada firmeza que ocasiona un flujo placentario limitado y turbulento (Vázquez & Rico, 2016).

Según la OMS, las mujeres con preeclampsia o eclampsia tienen de 3 a 25 veces el riesgo de complicaciones graves del embarazo incluyendo desprendimiento prematuro de placenta, coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal, edema pulmonar y neumonía por aspiración. El desenvolvimiento de este padecimiento, de leve a peligroso puede ser demasiado rápido e inesperado y en ocasiones hasta determinante. Y aunque la prevención de la preeclampsia sigue siendo debatida y sujeta a estudio, existe un gran interés sobre el uso de micronutrientes y agentes antiinflamatorios como las vitaminas y antioxidantes D, C y E, además de que actualmente se sabe que el único procedimiento médico definitivo para tratar a la preeclampsia es la perturbación del embarazo o la interrupción del parto del feto y placenta (WHO World Health Organization, 2011).

El padecimiento de la preeclampsia se hace evidente a partir de la semana 20 de un embarazo o antes si hay factores de peligro en la generalidad de los casos clínicos. Lo anterior ocasiona que su identificación y diagnóstico sea correspondientemente tardío a comparación con el avance de la enfermedad. Debido a estas complicaciones desencadenadas por la preeclampsia es que ha



surgido la necesidad de que en pacientes con dicho padecimiento se estén estudiado diversos marcadores bioquímicos con el propósito de elaborar un diagnóstico temprano y dar inicio o seguimiento a un tratamiento dirigido oportuno, así como también de poder formar un diagnóstico diferencial con diversos estados hipertensivos y de poder crear un pronóstico de las complicaciones materno-fetales para poder así establecer su papel etiológico y patogénico, todo con el objetivo de que estos biomarcadores permitan evaluar la gravedad de la enfermedad e identificar sus efectos para poder aminorar e inclusive evadir futuras complicaciones durante la gestación, y así lograr evitar nacimientos prematuros y maximizar la supervivencia pueril y materna. Entre los biomarcadores más estudiados están la concentración sanguínea elevada de ácido úrico y de creatinina sérica (Vázquez & Isla, 2018).

Actualmente, los marcadores químicos clínicos del ácido úrico y la creatinina se usan para evaluar la función renal y hepática debido a que son fáciles de titular a nivel laboratorio, además de que éstos son fáciles de encontrar puesto a que se haya en el torrente sanguíneo. Y aunque ambos compuestos son los productos terminales de diferentes vías metabólicas del organismo humano, tienen la similitud de que ambos se relacionan con el funcionamiento renal en especial con la reabsorción y evacuación en el túbulo contorneado proximal y con la filtración glomerular.

A razón de ello, dichos biomarcadores pueden significar una forma de a completar y mejorar la valoración y medición de la función renal en la preeclampsia debido a que las lesiones hepáticas y los factores prerrenales, intrínsecos y posrenales presentes en la preeclampsia pueden ser afectados de igual forma, es a causa de esto que surge la necesidad de emplearlos como una manera viable para el diagnóstico y tratamiento de esta patología, inclusive a pesar de que a nivel mundial en el campo clínico no se ha dado el estudio de ambos marcadores, se sabe que existe suficiente prestigio e información investigada de la creatinina y el ácido úrico, aunque se tiene más conocimiento del primero, por lo que en relación a lo que respecta la detección de la preeclampsia, según lo reportado en la literatura, se cree que con la detección y medición de sus concentraciones potenciará y fortalecerá la detección de esta enfermedad, ya que si existe el daño



renal y hepático provocado por la preeclampsia, la presencia del ácido úrico y de la creatinina confirmaran dicha enfermedad (Edachana *et al.*, 2019).

En este trabajo de investigación se desarrolló un biosensor colorimétrico para detección de biomarcadores de preeclampsia basado en la inmovilización de enzimas en nanoesferas de quitosano junto con agentes cromogénicos para proporcionar una nueva estrategia para diagnóstico rápida, barata y fácil de usar.

## ***2. Planteamiento del problema.***

Según las investigaciones recientes, se cree que hay una posibilidad de que hasta el 60% de las defunciones maternas relacionadas con la preeclampsia, puedan ser evitables al realizar y garantizar un diagnóstico oportuno de la preeclampsia para evitar complicaciones del embarazo a tiempo.

Debido a lo anterior, en este proyecto de tesis se propone desarrollar un biosensor microfluídico colorimétrico para evaluar la función renal y hepática de los marcadores bioquímicos del ácido úrico y la creatinina, ya que con la detección y medición de sus concentraciones se potenciará y fortalecerá la detección de la preeclampsia, debido a que si estos metabolitos aparecen con niveles altos, eso quiere decir que si existe daño renal y hepático, y por lo tanto se confirma el diagnóstico de esta enfermedad a causa de la presencia de dichas lesiones, puesto que son uno de los síntomas que provoca esta enfermedad, y a partir de eso se puede obtener el estado clínico de la misma para conocer su grado de gravedad y se puede generar el tratamiento más adecuado y conveniente de manera particular para poder evadir complicaciones durante la gestación, y así lograr evitar nacimientos prematuros y maximizar la supervivencia infantil y materna (Edachana *et al.*, 2019).

Es importante mencionar que, en esta tesis se plantea el uso de un biosensor microfluídico colorimétrico, ya que con éste se podrá: sensar y registrar valores a partir de cambios de colores; obtener un análisis de imagen de los biomarcadores del ácido úrico y la creatinina; y de la captura y de un análisis bioquímico de fluidos corporales, se puede llegar a saber, además de los cambios



de concentración de los mismos, el análisis cuantitativo del ácido úrico y la creatinina junto a su tasa de excreción, lo que se correlaciona con el estado específico del estado de salud del paciente o de la enfermedad de la preeclampsia, por lo que con esto se facilitaría al diagnóstico de la misma. Además, también permitiría realizar más evaluaciones precisas de los valores cuantitativos del pH y la temperatura en rangos fisiológicamente relevantes en específico (Koh *et al.*, 2016).

### **3. Justificación.**

Actualmente, los métodos convencionales para la detección de la preeclampsia se basan principalmente en el análisis químico de laboratorio (enfocado en la función hepática y renal), y a pesar de que dichos métodos pueden y suelen producir datos precisos, éstos tienen la limitante de que no pueden usarse fuera de laboratorios, en clínicas o de manera privada y personal, además de que pueden considerarse como costosos y que tienden a necesitar de tiempo para dar resultados, por lo que no se pueden considerar como de respuesta inmediata, es por ello que en este trabajo de tesis, se propone que, a partir de la implementación de un biosensor microfluídico colorimétrico con inmovilización de enzimas sobre nanopartículas de quitosano que mide los datos químicos de las concentraciones de ácido úrico y creatinina, se podría eludir esas problemáticas, ya que éstos pueden ser un poco más accesibles, portátiles y con metodologías de análisis eficaces, debido a que se basan en el procesamiento de señales y la transmisión de los datos capturados, con medios directos para medir y almacenar pequeños volúmenes de biofluidos (Koh *et al.*, 2016).

Es imperioso recalcar que, el análisis químico de la función hepática y renal es importante debido a que sí se determina el estado de la lesión o daño renal y hepático se confirmará el diagnóstico de la preeclampsia, ya que estos son uno de los síntomas que se desarrollan en esta patología, por eso mismo, los biosensores colorimétricos microfluídicos representan una buena alternativa para realizar una detección certera que brinda seguridad y eficiencia, ya que, según lo evidenciado en



la literatura, los análisis hechos con métodos enzimáticos que se incluyen en este tipo de dispositivos son los de mayor precisión, especificidad y exactitud, y dentro de la práctica diaria, son los métodos de laboratorio que tienen resultados más comparables a un método de referencia (Perazzi & Angerosa, 2011), junto con los métodos colorimétricos, que son sencillos tanto de implementar como de utilizar.

Por ello, el uso de biosensores representa la monitorización, captura y almacenamiento directo por un elemento biológico de reconocimiento (analito), coligado a un mecanismo que asegura la detección e interpretación de la variación de propiedades fisicoquímicas, ópticas, eléctricas, entre otras, derivada de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico (Turner & Newman, 1998). Las principales ventajas del uso de los biosensores son que tienen alta especificidad, sensibilidad y versatilidad; una capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, y como se mencionó anteriormente, un bajo coste y una capacidad de trabajar en tiempo real, por lo que dicha capacidad de respuesta permite el análisis inmediato (Ortega, 2006).

Por lo tanto, una excelente opción son los biosensores con análisis colorimétricos, ya que pueden incluir reacciones enzimáticas o de cromógenos dirigidos a una amplia gama de posibles aplicaciones para el diagnóstico médico puntual o para la detección del uso de fármacos por medio de análisis comunes de laboratorio por medio de la recolección de bajos volúmenes de muestra de diversos biofluidos. Además de que estos sistemas se pueden combinar con medios electrónicos, microfluídicos o farmacológicos para formar activamente la liberación o la extracción de otros (Koh *et al.*, 2016).

#### **4. Hipótesis.**

El uso de nanoesferas de quitosano ayudará a inmovilizar enzimas con una mayor eficiencia en la retención de la actividad y aumento de la estabilidad y de esta forma poder ser utilizadas en la detección de marcadores complementarios útiles de ácido úrico, y creatinina para identificar el estado de la función renal y hepática para poder diagnosticar el estado de la preeclampsia.



## **5. Objetivos.**

### **5.1 Objetivo general.**

Desarrollar un biosensor colorimétrico para detección de ácido úrico y creatinina biomarcadores para la lesión renal y hepática como herramienta de diagnóstico clínico de preeclampsia.

### **5.2 Objetivos específicos.**

- Sintetizar, caracterizar y funcionalizar nanoesferas de quitosano por método de gelación iónica.
- Inmovilizar las enzimas uricasa, creatininas, creatinasa y sarcosina oxidasa sobre las nanopartículas de quitosano sintetizadas.
- Realizar un análisis colorimétrico cuantitativo para determinar las concentraciones de los marcadores bioquímicos de ácido úrico y creatinina, y el pH de estos.
- Realizar un análisis colorimétrico cuantitativo por caracterización de espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis) y de imágenes ópticas en función de la concentración de analito.
- Diseñar un prototipo de biosensor microfluídico colorimétrico



## **6. Antecedentes.**

### **6.1 Preeclampsia.**

Alrededor de hace 2000 años las culturas china y egipcia dieron a conocer el síndrome de esta enfermedad junto a la de la eclampsia, no obstante, el que tiene el título del cuadro clínico es Hipócrates, el padre de la medicina, quien, durante el siglo IV después de cristo, fue la primera persona en dar a conocer que las convulsiones durante el embarazo son un signo para detectar estas patologías referenciando así su gravedad (Gutiérrez & Balderas, 2017).

Después, durante los siglos V y XV no se tiene ningún informe o reporte en la historia sobre estos padecimientos, ya que quienes atendían los partos eran las parteras quienes no sabían distinguir las convulsiones que se presentan en el embarazo con preeclampsia-eclampsia de las presentadas durante una epilepsia. Y no fue hasta 1903 que Cook y Brigs, confirmaron que la proteinuria y la hipertensión arterial en el embarazo podrían ocasionar las convulsiones y comenzó a usar el sulfato de magnesio como tratamiento para manejar la preeclampsia-eclampsia (Cunningham *et al.*, 1999). Y a partir del siglo XX, León Chesley, quien en términos de esta enfermedad fue un personaje muy significativo, ya que se consagró al estudio de la preeclampsia y eclampsia en las mujeres embarazadas así como al estudio de la función renal en las mismas.

En 1992 en Estados Unidos se formuló por parte del Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG, American College of Obstetricians and Gynecologists por sus siglas en inglés), una clasificación de los estados hipertensivos de la gestación, y para el 2002 la OMS evaluó y aceptó esta propuesta, en la cual estableció que la preeclampsia-eclampsia es el trastorno hipertensivo que mayor número de pacientes tiene. Además, la preeclampsia a su vez se hace presente cuando durante la gestación se desarrolla hipertensión junto a un criterio de severidad a pesar de que en primera instancia no se manifieste proteinuria (Secretaría de Salud, 2017).

La preeclampsia es el estado que se caracteriza por la presencia de hipertensión y proteinuria significativa y es el trastorno hipertensivo que con mayor frecuencia agrava el embarazo, también es la primera causa de muerte materna en México y la primera causa obstétrica de ingreso a



unidades de cuidados intensivos (American College of Obstetricians and Gynecologists ACOG, 2013). A nivel global, cada 3 minutos muere una mujer a causa de la preeclampsia, y cerca de 50,000 mujeres mueren anualmente. Este síndrome afecta a entre 3 y 10% de los embarazos, y es la principal causa de muerte materna en el mundo. En México, por cada 1,000 nacimientos la incidencia es de 47.3 (Velumani *et al.*, 2021).

Este padecimiento, también es conocido como toxemia o gestosis, se distingue por que mayoritariamente posterior a la semana 20 del embarazo, o con anticipación de manera atípica, presenta hipertensión arterial sistémica, la cual tiene una tensión sanguínea  $\geq 140/90$  mmHg obtenida después de al menos dos mediciones intercaladas entre 4 a 6 horas; o bien porque en el puerperio puede venir o no en conjunto con un edema generalizado o proteinuria anormal ( $> 300$  mg/24 h) (WHO World Health Organization, 2011).

Clásicamente también se le conoce y ha sido denominada como la tríada de hipertensión, proteinuria y edema, después de 20-24 semanas de gestación. Pero esa definición, con el pasar del tiempo, ha ido evolucionado y cambiando; en la actualidad, se nombra como hipertensión arterial de novo (que es la presión arterial sistémica señalada arriba) que es la asociada a la proteinuria (Pauli & Repke, 2015).

A este padecimiento se le considera una forma precursora de la eclampsia, una patología latentemente mortal, empero, es mortal en sí misma. Pero lamentablemente, por cientos de años sigue teniendo el mismo tratamiento, que es el parto o cesárea (Macdonald *et al.*, 2015).

De igual forma, ésta también ha sido llamada como «la enfermedad de las teorías», ya que, no se conoce con exactitud su causa, lo que hace que se obstaculice su prevención. Entre las teorías que existen de su causalidad, se ha señalado que es por una condición inflamatoria sistémica de bajo grado, que se genera por un desequilibrio entre sustancias anti y proangiogénicas, mientras que otras hipótesis planteadas son que la preeclampsia se puede deber a la deficiencia de enzimas (lipoxinas, resolvinas, protectinas, etc.), a la disfunción endotelial inducida por isquemia placentaria, a mecanismos autoinmunes, etc (Pluta *et al.*, 2015).



Es una enfermedad de origen placentario, de complicada fisiopatología y de naturaleza gradual, y se clasifica en: preeclampsia leve o sin datos de severidad, preeclampsia severa o con datos de severidad y eclampsia (Vázquez & Isla, 2018). La preeclampsia severa es la enfermedad más atendida en los hospitales y es la primera causa obstétrica de ingresos a cuidados intensivos, y como se mencionó anteriormente, esto ocurre cuando la paciente presenta presión arterial elevada (160-110 mmHg) con proteinuria patológica, asimismo, la preeclampsia también puede ocasionar afecciones al mecanismo de la coagulación y afectaciones a los pulmones y riñones, al hígado, cerebro, o corazón. Y algo que va intrínsecamente relacionado con esta patología es el síndrome HELLP, el cual se considera una de las manifestaciones más particulares y más graves de la preeclampsia severa (American College of Obstetricians and Gynecologists ACOG, 2013).

Como ya se mencionó previamente, la preeclampsia puede presentarse de dos maneras: leve o grave, asimismo en la misma se presentan dos tipos de hipertensión durante el embarazo, la hipertensión arterial crónica y la hipertensión transitoria gestacional, su diferencia radica en que la primera se da antes de la semana 20 de gestación inclusive previo al embarazo y permanece 6 semanas más después del parto, y la segunda se da en la última etapa del embarazo y durante el parto y puerperio pero desaparece rápidamente después del mismo. La etiología es desconocida pero los factores de riesgo son puntos importantes para que la enfermedad aparezca (Gutiérrez & Balderas, 2017).

En términos de su fisiopatología se desconoce la causa de esta enfermedad, pero existen varios factores de riesgo que predisponen a las pacientes los cuales se mencionan a continuación (Velumani *et al.*, 2021):

1. Tiempo de gestación: Comienza a aparecer después de las 20 semanas de gestación.
2. Paridad: Más del 70 % aparece en el primer embarazo.
3. Edad materna: Ocurre con mayor frecuencia antes de los 18 años y después de los 35 años. La enfermedad es más peligrosa cuando la paciente tiene mayor edad.
4. Genética: la preeclampsia está ligada a un gen autosómico recesivo.
5. Peso: Bajo peso u obesidad.



6. Nutrición: Desnutrición grave, deficiencias proteicas y algunas vitaminas hidrosolubles.
7. Algunas condiciones obstétricas como: Embarazo múltiple, embarazo molar, eritroblastosis fetal y polihidramnios.
8. Enfermedades crónicas como: hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, nefropatías.
9. Inhibidor lúpico: Presencia de anticuerpos antifosfolípidos.
10. Patrones culturales y socioeconómicos: pobreza, algunas creencias y hábitos nocivos para la salud.
11. Cuidados perinatales deficientes.

Los principales síntomas maternos de la preeclampsia severa son el dolor en hipocondrio derecho o epigastralgia, edema agudo pulmonar, cefalea persistente, signos de disfunción orgánica, disnea o dolor torácico, sospecha de desprendimiento placentario, alteraciones cerebrales o visuales, y la característica presencia de hipertensión severa (con valores de sistólica  $\geq 160$  y/o diastólica  $\geq 110$  mmHg) (Secretaría de Salud, 2017).

Recientemente se instituyeron nuevos criterios de severidad característicos que también provocan esta enfermedad, entre éstos se encuentran la función hepática alterada, que involucra una doble producción de enzimas hepáticas en comparación con la concentración normal o dolor epigástrico o del cuadrante superior derecho del abdomen persistente y severo que no es consecuencia de la medicación y que no se consigue explicar por otros diagnósticos; la trombocitopenia, que conlleva la existencia de menos de 100,000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ ; así como la lesión renal progresiva, en donde se caracteriza por presentar valores de creatinina sérica  $\geq 1.1$  mg/dL o inclusive hasta generar la doble producción de la creatinina sérica sin la presencia de otra patología renal que la pueda causar (WHO World Health Organization, 2011).

También, a nivel de células sanguíneas se observa una reducción de las plaquetas y un incremento de la masa de eritrocitos y leucocitos en un 30%. El acrecimiento del volumen plasmático en proporción de la masa eritrocitaria hace que se forme un estado de “anemia fisiológica”. Los



valores mínimos de hematocrito normal en el embarazo son: primer trimestre 33%, segundo trimestre 30%, y tercer trimestre 33% (Carvajal & Ralph, 2017).

Como se mencionó anteriormente, hoy en día no existe un tratamiento definido para el tratamiento de esta enfermedad, solamente, según los protocolos médicos clínicos establecen que si una paciente es diagnosticada con preeclampsia con alto grado de severidad, independientemente de la edad que ésta posea, se debe considerar inducir el nacimiento del bebe lo más pronto posible (Secretaría de Salud, 2017) (WHO World Health Organization, 2011).

También, la prevención de la preeclampsia actualmente es muy difícil, aun así la atención médica debe basarse en dos puntos importantes (Gutiérrez & Balderas, 2017):

1. Descubrir los factores de riesgo en que la enfermedad puede desarrollarse.
2. Encontrar y tratar los factores de riesgo iniciales para así evitar que la enfermedad se desarrolle.

De ahí proviene la importancia en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con preeclampsia severa, este involucra o debe conllevar una evaluación integral del bebe y la madre, para así poder planear cuando será el mejor momento del nacimiento del feto a través de la mejor vía obstétrica para ambos (American College of Obstetricians and Gynecologists ACOG, 2013). Es por eso que para poder evaluar la gravedad de la preeclampsia y el pronóstico de la lesión renal aguda que esta ocasiona, existen diversos marcadores bioquímicos que facilitan el inicio de un tratamiento dirigido lo que hoy en día es de interés de estudio para determinar la patogenia de la misma. Entre los más utilizados están las concentraciones sanguíneas de ácido úrico y creatinina (Vázquez & Isla, 2018).

Y como la preeclampsia no se puede pronosticar fundamentándose únicamente en la historia ginecobstetricia durante la gestación, el estudio en esta enfermedad se ha enfocado mayoritariamente en la identificación de pacientes que tengan un alto riesgo de desarrollarla. Esto principalmente para poder obtener un monitoreo más estricto, un diagnóstico oportuno y la



implementación de intervenciones profilácticas específicas, y una de las alternativas para poder lograr lo anterior es mediante la identificación de biomarcadores tempranos en el embarazo, como los que se mencionaron con anterioridad, que se relacionan con el desarrollo de la enfermedad. De esta manera se podrían abrir las puertas a la disminución del número de muertes por preeclampsia, a una mejor estratificación del riesgo en este tipo de pacientes, y al aumento de la tasa de supervivencia en embarazos de alto riesgo (Wu *et al.*, 2015).

### ***6.2 Diagnóstico para preeclampsia.***

La preeclampsia es conocida como la patología emuladora, pues tiende a manifestarse de forma semejante a otras enfermedades, y esto se hace evidente por una de las maneras en la que es conocida como la tríada de hipertensión, edema y proteinuria, no obstante, es un síndrome que se identifica por afectar varios sistemas, y entre los cuadros clínicos más habituales incluyen manifestaciones neurológicas (con episodios convulsivos (eclampsia)), hemorragia cerebral, ceguera cortical transitoria, escotomas y fotopsias (Zhu *et al.*, 2016); y en el sistema cardiovascular se muestra como edema pulmonar e hipertensión arterial previo al parto, mientras que a nivel hepático se puede presentar con hemorragias subcapsulares, lesiones necróticas periportales y el síndrome HELLP (que se caracteriza por elevación de las enzimas hepáticas, hemólisis y trombocitopenia); y a nivel renal se manifiesta en la proteinuria en conjunto con alteraciones microscópicas propias de esta enfermedad conocidas como glomérulo endoteliosis (Botero *et al.*, 2008).

Los métodos de detección para diagnosticar la enfermedad se clasifican de laboratorio y en clínicos (Gutiérrez & Balderas, 2017). Las primeras son de gran beneficio y se deben realizar principalmente en función del órgano que se sabe está siendo directamente afectado en el desenvolvimiento de la patología; y las que son conocidas como las más funcionales son: las pruebas de enzimas hepáticas, bilirrubina y de coagulación, el citoquímico de orina, el hemoleucograma, el recuento de plaquetas y el extendido de sangre periférico. Empero, el



diagnóstico definitivo de la preeclampsia se establece con la confirmación de la elevación de la presión arterial, definida como una presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg o diastólica  $\geq 90$  mmHg en mínimo 2 mediciones, con un intervalo de 4 h y la presencia de proteinuria ( $\geq 300$  mg en orina de 24 h) o signos indicativos de daño de órgano blanco (Olson & Chen, 2016).

Como se vio en el apartado anterior y arriba, los niveles de la creatinina, las plaquetas de sangre e inclusive de los niveles de ácido úrico son muy importantes para conocer el grado de severidad de la preeclampsia ya que indican presencia de otros padecimientos que causa la misma como lo son la trombocitopenia, la lesión renal progresiva, la anemia fisiológica y el daño hepático, por ello, las únicas maneras de poder detectar y diagnosticar esta patología es a través de la medición de creatinina o de las plaquetas de la sangre y por pruebas de AST (Aspartato Aminotransferasa), de ALT (Alanina Aminotransferasa), que son enzimas que se encuentra principalmente en el hígado, o de DHL (Deshidrogenasa Láctica), que es una proteína presente en la sangre que ayuda a producir energía al cuerpo.

Los análisis de AST y ALT son pruebas de función hepática que se basan en la medición en sangre de la concentración dichas enzimas que se encuentran presentes en el hígado. La enzima AST se puede localizar dentro de las células de varios tejidos y órganos, como en el músculo-esquelético y cardíaco, en el páncreas, cerebro, riñón y/o hígado, mientras que la ALT se halla mayoritariamente, aunque no solamente, en el hígado.

Además, como la enzima ALT se encuentra casi siempre en el hígado, un aumento importante de esta enzima y de la AST, ya que normalmente siempre van acompañadas una con la otra, constituirá la creación de un patrón de citolisis, procedente generalmente del hígado, indicando así la destrucción de las células hepáticas, por lo que los aumentos moderados de transaminasas (que son las enzimas cuya elevación en sangre indica la destrucción de las células en las que se encuentran y el notorio incremento de las mismas significa, como ya se evidenció, una gran eliminación de células hepáticas), en contraste, pueden inclinarse tanto a enfermedades hepáticas, como extrahepáticas.

Ambas son además enzimas cuyo cargo es transportar moléculas de los grupos amino, y la destrucción de las células que contienen transaminasas induce la liberación a la sangre de estas enzimas, lo que quiere decir que el aumento de su concentración sanguínea significa que existe una lesión en los tejidos en los que se encuentran presentes, de ahí proviene la utilidad de realizar estos análisis. (Busto & Herrero, 2015).

Para determinar el grado de severidad de la misma o su presencia, es necesario que estos análisis de laboratorio presenten alteraciones en las concentraciones de las mismas, según la Secretaría de Salud Mexicana, éstas deben presentar valores elevados de creatinina sérica mayores a 1.1 mg/dL, así como también deben visualizarse un incremento en los valores de las pruebas de AST, ALT o de DHL, de aproximadamente mayores a 70 IU/L o presentar una disminución de plaquetas < 100,000/ mm<sup>3</sup> (Secretaria de Salud, 2017). En resumen, los elementos que se usan generalmente para hacer el diagnóstico son los que se muestran en la tabla 1 (Velumani *et al.*, 2021).

**Tabla 1.** Preeclampsia con y sin datos de severidad (Herrera, 2018) (Flores *et al.*, 2017).

<b>Sin datos de severidad</b>	<b>Con datos de severidad</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embarazo mayor a las 20 semanas de gestación, excepto en los casos de embarazo molar.</li> <li>• Presión arterial mayor a 140/90 mmHg en al menos 2 tomas distintas con 6 horas de diferencia.</li> <li>• Proteinuria mayor o igual a 300 mg/dL en 24 horas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presión arterial mayor a 160/110 mmHg en al menos 2 tomas con un mínimo de 4 horas de diferencia, más 2 de los siguientes: actuación.</li> <li>• Proteinuria mayor a 5 g en orina de 24 horas o creatinina sérica mayor a 1.2 mg/dL.</li> <li>• Dolor epigástrico o de hipocondrio derecho intenso y persistente.</li> <li>• Oliguria menor a 500 mL en 24 horas.</li> <li>• Trombocitopenia por debajo de 100,000 o alteración en las pruebas de función hepática con valores que doblan su nivel normal.</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"><li>• Trastornos visuales: caracterizados principalmente por fosfenos o la presencia de tinnitus o acúfenos.</li><li>• Cefalea.</li><li>• Edema pulmonar.</li></ul>
--	---

Por todo lo mencionado se puede establecer que, la preeclampsia es entonces una enfermedad multisistémica coligada a altas tasas de morbimortalidad fetal y materna, que solo es posible diagnosticar en el cuadro agudo del síndrome, y que conforma comúnmente una urgencia ginecológica, y es por este esencial motivo que se debe realizar una apropiada estratificación del riesgo de desarrollar la misma. Es aquí donde los biomarcadores moleculares constituyen marcadores de riesgo prometedores para su uso en la práctica clínica (Hernández et al, 2017).

Además de que uno de los principales inconvenientes en el diagnóstico de esta enfermedad es que esta puede ser asintomática por lo que se requiere que la paciente tenga y realice frecuentemente su control prenatal para poder tener un adecuado control del desenvolvimiento de la gestación, ya que este síndrome solo puede ser descubierto al hacer mediciones frecuentes de la tensión arterial, por sus niveles de plaquetas y/o biomarcadores (Lapidus *et al.*, 2017). Es aquí donde surge la necesidad de dar solución a esta problemática y por ello se propone crear un biosensor microfluídico calorimétrico para detectar los biomarcadores del ácido úrico y la creatinina de la preeclampsia, para así poder tener y llevar un control del estado de salud del paciente o de la enfermedad de la misma.

### ***6.3 Marcadores bioquímicos para la preeclampsia.***

Los marcadores bioquímicos se definen como un carácter o un gen que, debido a varias y/o diferentes características de ligamiento que pueden indicar la presencia de otro, también en un marcador se tiene la propiedad de que A implica necesariamente B, es decir, un marcador siempre se encuentra correlacionado con otro carácter de interés. De esta manera, casi cualquier carácter morfológico o proceso subyacente que lo codifique puede denominarse



un marcador, desde enzimas, proteínas o ADN a algo tan específico como el tamaño. Y por lo general indican un proceso subyacente de interés clínico en un paciente, debido a que su detección contribuye al control y diagnóstico de enfermedades (Sánchez, 2020).

En preeclampsia, los marcadores bioquímicos ofrecen su detección temprana, y para eso es preciso que el marcador ideal tenga una especificidad y sensibilidad adecuadas, se correlacione con la severidad de la preeclampsia antes de su aparición, permita puntualizar el mecanismo fisiopatológico y tenga una baja tasa de falsos positivos, menor al 5% de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (Kar, 2014) (Calvachi & Danilo, 2014). También estos marcadores bioquímicos de preeclampsia llegan a poseer un amplio rango de valor predictivo entre el 10 o 80%, ya que las combinaciones entre los mismos puede mejorar considerablemente la detección, en específico de preeclampsia temprana, sin embargo, la OMS aún no ha definido el mejor marcador ni las estrategias que permitan identificar mujeres con alto riesgo de desarrollo de este síndrome (Kanagasabai, 2014).

Y como se acaba de mencionar, a pesar del tiempo de estudio no se ha podido esclarecer qué marcador o marcadores determinan el riesgo “a priori” de desarrollar preeclampsia, y de conseguirse, se abriría la puerta a poder tener un mejor control. Por ello, son necesarias más investigaciones en los que se estudie el papel de marcadores diferentes, ya que estos podrían ser viables y útiles agentes terapéuticos de detección para este síndrome que aún se basa exclusivamente sobre parámetros clínicos (Martínez, 2013). Y según lo reportado por Martínez, los marcadores bioquímicos que se han planteado como potenciales predeterminantes de preeclampsia descritos en la literatura, pueden catalogarse en referencia de su mecanismo fisiopatológico, a continuación en la Tabla 2, se mencionan solo algunos de ellos ya que existen otros, además de que con el empleo de las técnicas moleculares de metabolómica y proteómica, existen muchos más en desarrollo.

**Tabla 2. Marcadores bioquímicos descritos como predictores de Preeclampsia (Martínez, 2013).**



### **Relacionados con la disfunción de la perfusión placentaria y resistencia vascular**

- Renina
- Proteína ligadora de la angiotensina II placentaria
- Respuesta de calcio plaquetario a la Arginina-vasopresina

### **Relacionados con la función endocrinológica**

- Gonadotropina coriónica humana (HCG)
- Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A)
- Alfa-fetoproteína
- Estriol
- Activina A
- Inhibina A
- ADAM 12
- Proteína placentaria 13 (PP13)
- Adiponectina
- Resistencia a la insulina
- Globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG)

### **Relacionados con la disfunción renal**

- Microalbuminuria
- Ácido úrico
- Excreción urinaria de calcio
- Creatinina sérica



### **Relacionados con la disfunción endotelial y estrés oxidativo**

- Anticuerpos antifosfolípidos
- Antitrombina III
- Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)
- Apolipoproteína E
- Lípidos séricos
- Endotelina
- Prostaciclina
- Tromboxano
- Citoquinas
- Factor de crecimiento placentario (PIGF)
- Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
- Forma soluble de la tirosina quinasa 1 (sFlt-1)
- Endoglina soluble
- Isoprostanos

Como el diagnóstico de preeclampsia basado en la proteinuria y presión arterial solo conserva un valor predictivo positivo del 30% para el diagnóstico de esta patología, es necesario optar por nuevos métodos predictivos (López, *et al.*, 2014). Uno de estos es el uso de marcadores bioquímicos por eso, a continuación, se menciona algunos ejemplos de los mismos en la detección de la preeclampsia, en especial con los de interés en este trabajo de titulación los cuales son el ácido úrico y la creatinina:

En una investigación, Strevens demostró la precisión del diagnóstico de la preeclampsia a través de la determinación de los niveles séricos con relación a la detección de la creatinina y ácido úrico en plasma, demostrándose que estos pueden ser marcadores tempranos para el diagnóstico



de la disfunción renal en esta enfermedad, así como del nivel de lesión glomerular, y llegó a la conclusión de que la creatinina es un marcador que predice la hipertensión inducida en el embarazo (Strevens et al., 2013).

También en relación con el ácido úrico y la creatinina en otro trabajo de investigación, Bravo (2014) logró relacionar a pacientes sin proteinuria pero diagnosticados con hipertensión inicial, a los siguientes casos: con creatinina sérica mayor a 1.1 mg/dL; con hipertensión arterial entre 120 a 140 mmHg; con proteinuria en orina de 24 horas en g/L, mayor a 300 mg/L o 3 g/L; con edema pulmonar. Y los resultados anteriores se consiguieron reforzar con los obtenidos del artículo de Voto (2015), donde se demostró que la preeclampsia suele incrementar los niveles de proteinuria en orina de 24 horas, a causa de los cambios en la membrana glomerular, situación que puede tener relación con el aumento de ácido úrico y de los niveles de creatinina sérica (p. 99), por lo que en consecuencia, se puede decir que estos factores pueden predecir con alta eficacia la preeclampsia, aunque no se especifica si por sí solos o en conjunto.

Igualmente, autores como Ciero, Rodríguez, & Fernández (2014) y Burgos (2015), en sus respectivas investigaciones han establecido que entre los marcadores más relevantes para la predicción de preeclampsia se encuentran la proteinuria en orina de 24 horas, los niveles de creatinina sérica y el ácido úrico, los cuales a su vez son capaces de complementar las medidas de la presión arterial, porque según lo obtenido teóricamente expresado en estos artículos se puede tener de un 30% al 50% de especificidad, sobre todo en los casos de gestantes asintomáticas. Y lo anterior se complementa con lo mostrado según Vásquez & Rico (2015), que expresaron y concordaron que los marcadores que pueden predecir la preeclampsia están relacionados con la proteinuria en orina de 24 horas, los niveles de creatinina sérica y el ácido úrico, según los resultados que obtuvieron de una prueba que realizaron donde hubo como mínimo dos variables en comparación con un intervalo de 4 a 6 horas, generalmente con proteinuria mayor a 300 mg/24 h, ácido úrico con niveles mayores de 4.5 o hasta 5.5 mg/dL, los que determinaron pueden ser predictores de preeclampsia.



En otro estudio se realizó la medición del ácido úrico y la creatinina en suero materno, y se estableció también que ambos son un marcador aceptable de la preeclampsia, porque según los resultados que obtuvieron, los valores fueron siempre mayores en las mujeres con esta enfermedad en comparación con las que no, concordando así con otros trabajos ya consumados, como en el caso de la investigación de Roberts, que evidenció que ciertamente existe una relación entre las complicaciones gestacionales y la hiperuricemia, y también concluyó que el ácido úrico como la creatinina son marcadores que pueden pronosticar las patologías gestacionales (Potter & Nestel, 2014).

#### ***6.4 Ácido úrico en preeclampsia.***

El ácido úrico es un metabolito terminal perteneciente a la cadena de degradación de los compuestos nucleótidos o purinas (adenina y guanina) gracias a la acción de catálisis que desempeña la enzima Xantina Deshidrogenasa/Xantina Oxidasa (XDH / XO), y se ha comprobado que su sobreactividad está presente en la placenta de las pacientes gestantes con preeclampsia o eclampsia. “La XDH se convierte en su forma oxidasa XO por varios estímulos, incluida la isquemia. El metabolismo de las purinas por XO acopla la producción de ácido úrico con la producción de radicales libres superóxido ( $O_2^-$ ), y está implicado como un contribuyente al estrés oxidativo. XDH/XO se encuentra en la mayoría de los tejidos pero se concentra en el hígado y el intestino. Se especula que la XO circulante puede unirse al endotelio y dar lugar a una lesión oxidativa local” (Bainbridge & Roberts, 2008). La enzima uricasa en general está presente en la mayoría los mamíferos, donde el ácido úrico se descompone en alantoína, que es un producto excretado por el riñón no tóxico, mientras que los humanos, no cuentan con la uricasa, por lo que la salida del ácido úrico depende de la excreción renal.

Este metabolito es un compuesto antioxidante que, cuando no está rodeado de otros compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico, puede comportarse como agente proinflamatorio y oxidante (Vázquez & Isla, 2018), también es poco soluble y su concentración es comúnmente baja en individuos saludables, menor a 6.0 mg/dL., y la misma influye los defectos enzimáticos



en el metabolismo de las purinas, la alteración de la función renal, el incremento del recambio celular y el consumo alto de proteínas, fructosa o alcohol. La función biológica del ácido úrico, inclusive con concentraciones pequeñas, radica en ser un antioxidante plasmático capaz de eliminar radicales libres, reducir la nitrosilación de residuos de tirosina, puede producir actividad superóxido dismutasa, puede convertirse en un pro-oxidante (radical urato) en un entorno limitado de disponibilidad de antioxidantes (especialmente con una baja disponibilidad de ascorbato) y también es un intermediario de la estimulación de la inflamación (Bainbridge & Roberts, 2008).

Durante la gestación, las concentraciones de ácido úrico disminuyen entre 25-35% debido a los efectos del estrógeno, ya que éste es uricosúrico (eso es lo que provoca que las concentraciones de ácido úrico sean más elevadas en mujeres posmenopáusicas y en los hombres), además de que a su vez se amplía el volumen sanguíneo y la tasa de filtración glomerular. En comparación a los valores de las concentraciones de mujeres no gestantes, estos valores aumentan paulatinamente, en contraste, se tiene registrado que a finales del siglo XIX por primera vez se observaron concentraciones elevadas de ácido úrico en mujeres preeclámpticas, aunque también está documentado que si éstas llegan a presentar valores altos en las concentraciones de ácido úrico, esto no quiere decir que el ácido úrico no es simplemente un marcador de la gravedad de la enfermedad, sino que también contribuye directamente a la patogenia del trastorno, por lo anterior, y junto a más informes de investigación, se ha podido establecer y justificar la relación entre concentraciones de ácido úrico y la gravedad de la enfermedad de la preeclampsia (Bainbridge & Roberts, 2008).

La razón por la que en un embarazo normal, la concentración sanguínea de ácido úrico es pequeña en comparación con la que se produce en mujeres saludables no gestantes, son las variaciones anatómicas y fisiológicas que ocurren durante un embarazo, entre estos cambios se encuentra la disminución de las resistencias sistémicas, anudado al aumento de la tasa de filtración glomerular, lo que ocasiona el decrecimiento de la concentración sanguínea y el aumento de su excreción urinaria; y la hiperperfusión renal desde el incremento del volumen plasmático (Vázquez & Rico,



2016). Según la literatura la media general de la concentración sanguínea de ácido úrico en pacientes embarazadas sanas es alrededor de  $\leq 4$  mg/dL, en las mujeres no embarazadas es de aproximadamente entre 2.4 a 5.7 mg/dL y en las que presentan complicaciones con preeclampsia o eclampsia es de en promedio 6.7 mg/dL (Mustafa *et al.*, 2012).

En pacientes embarazadas con preeclampsia, la concentración de ácido úrico aumenta como a las 10 semanas de gestación, un tiempo mucho antes de la presentación clínica del trastorno. Históricamente se tiene que la baja eliminación de ácido úrico ocasiona hiperuricemia, ya que este metabolito es filtrado, reabsorbido y secretado por el riñón, por lo que, el incremento de los niveles de ácido úrico antecede el descenso del volumen plasmático. El ácido úrico es uno de los marcadores más estudiados porque está documentada su sobreactividad en la placenta de mujeres con preeclampsia (Vázquez & Isla, 2018), debido a que las concentraciones elevadas de este marcador podría funcionar al implementarse como un indicador del riesgo en el que se encuentran y al que se enfrentan las mujeres embarazadas con preeclampsia para evaluar la escala de peligro en que se encuentran, por lo que esto podría significar una gran oportunidad para reducir la morbilidad materna y fetal.

### ***6.5 Creatinina en preeclampsia.***

La creatinina es un marcador bioquímico y un metabolito terminal perteneciente a la cadena de degradación de las proteínas que se obtienen de la ingesta de carne de origen animal y están presentes en los músculos corporales. También se incluye en su metabolismo la eliminación renal a través de la filtración glomerular, y del mismo modo, su absorción y excreción se lleva a cabo en el segundo segmento del túbulo contorneado proximal, al igual que con el ácido úrico. La relevancia de este marcador radica en que los valores de su concentración sanguínea puede acrecentarse hasta el 40% en muy poco tiempo, (Vázquez & Isla, 2018) y en que también es un marcador vital del estado de hidratación y la función renal, y según la literatura, ésta se detectó en el sudor usando una mezcla de enzimas (creatininasa, creatinasa y peroxidasa) y un colorante de respuesta correspondiente (4-aminofenazona) (Choi *et al.*, 2019).



En adultos saludables la concentración sérica es de entre 1 a 1.5 mg/dL, mientras que en contraste, durante un embarazo el promedio es de entre 0.5 a 0.8 mg/dL, y si estos valores llegan a ser más altos ( $<0.9$  mg/dL) serán denominados como anormales e indicarán la presencia y la gravedad de una lesión renal aguda (Mustafa *et al.*, 2012), generalmente dicha lesión exhibe valores de creatinina sérica  $\geq 1.1$  mg/dL e incluso puede conllevar a producir el doble de sus concentraciones cuando no existe la presencia de otra enfermedad renal que la pueda originar (WHO World Health Organization, 2011).

Como se mencionó anteriormente en el apartado de introducción, una de las pocas formas para diagnosticar y divisar a la enfermedad de la preeclampsia es a través de la medición de creatinina (aunque también se puede involucrar la detección del ácido úrico o ambas en conjunto), ya que este marcadores bioquímicos se usa para evaluar el estado de la función renal y hepática debido a que es fácil de titular a nivel laboratorio y de encontrar puesto a que está presente en el torrente sanguíneo. Es por eso que, la cuantificación de los niveles de creatinina en el cuerpo de una paciente gestante puede significar una forma de a completar y mejorar la valoración y medición de la función renal en la preeclampsia para identificar la existencia, desarrollo y gravedad de las lesiones hepáticas y renales que este padecimiento ocasiona, lo anterior significaría una manera viable para el diagnóstico y tratamiento de esta patología para evitar sus fatales resultados, como la morbilidad y mortalidad tanto de los fetos como de las madres.

#### ***6.6 Hiperuricemia: ácido úrico y creatinina como marcadores de gravedad en preeclampsia.***

En las mujeres embarazadas y con preeclampsia, la hiperuricemia se asocia con complicaciones maternas fetales y placentarias severas que, incluso, pueden perdurar durante el puerperio, en otras palabras, la hiperuricemia es una de las consecuencias secundarias que produce la preeclampsia, y ésta es causada por el aumento de la síntesis de ácido úrico por lesión y muerte de las células trofoblásticas, pero también por la reducción de su secreción urinaria limitada por el decrecimiento de la tasa de filtración glomerular, así como por el aumento de su absorción en el túbulo contorneado proximal (Vázquez& Isla, 2018). Por lo tanto, se puede decir que la



hiperuricemia es el primer parámetro anormal de la química clínica en la preeclampsia y presenta concentraciones mayores a 4 mg/dL, no así en la hipertensión arterial crónica o en la hipertensión gestacional (Mustafa *et al.*, 2012).

Comúnmente, en las pruebas clínicas de laboratorio, las concentraciones séricas altas de ácido úrico se usan para establecer el diagnóstico temprano de la preeclampsia, así como que también se utilizan para diferenciar a esta enfermedad de la hipertensión arterial sistémica (HAS) crónica y de la hipertensión gestacional, para generar un diagnóstico a tiempo para poder seleccionar: el momento más adecuado de la interrupción de la gestación, el tiempo justo y oportuno para realizar la intervención médica del parto y como un criterio para decidir si la cesárea es la mejor vía para inducir el nacimiento, y para evitar las complicaciones características de esta patología, entre ellas, la muerte materna e infantil. La atención de las complicaciones en una unidad de cuidados intensivos puede modificar, favorablemente, su evolución (Vázquez & Rico, 2016).

Debido a lo anterior se puede deducir que, el incremento de los niveles de ácido úrico en embarazadas preeclámpticas frecuentemente antecede a la hipertensión y la proteinuria, y es una de las manifestaciones clínicas utilizadas para diagnosticar el trastorno, pues ésta junto a las elevadas concentraciones de ácido úrico en la preeclampsia indican una función renal y hepática anormal, aumento de la degradación de los tejidos, acidosis y aumento de la actividad de la enzima Xantina Oxidasa/Deshidrogenasa.

Históricamente, la hiperuricemia, junto a otros hallazgos clínicos de preeclampsia, es relacionada a la función renal alterada, incluso, hace un poco más de veinte años, la literatura documentó que las lesiones renales observadas en mujeres preeclámpticas se observan solo en preeclámpticas hiperuricémicas, mientras que fuera del embarazo, este padecimiento se considera un factor de riesgo de hipertensión, enfermedad cardiovascular y renal. Esta evidencia, así como la observación de que la gravedad de la preeclampsia crece con el aumento del ácido úrico, el cual plantea la posibilidad de que este marcador bioquímico pueda tener un papel en la fisiopatología de la preeclampsia (Bainbridge & Roberts, 2008).



Se ha documentado que el aumento de las concentraciones séricas de ácido úrico en mujeres embarazadas y con preeclampsia son más prematuras que el incremento de los valores de la creatinina (Mustafa *et al.*, 2012). Y según la literatura se tiene registrado que las concentraciones de ácido úrico aproximadamente mayores de 7 mg/dL tienen una correlación positiva y más significativa con la lesión renal aguda que la que se documenta con los altos valores de creatinina (Vázquez & Rico, 2016), debido a lo anterior, se ha destacado el posible papel del ácido úrico como factor patogénico en la preeclampsia, los hallazgos de esta investigación cobran relevancia ante este planteamiento (Bainbridge & Roberts, 2008). Y aunque en el presente, la OMS y países como Canadá, Estados Unidos y México no hayan agregado a la concentración sanguínea de ácido úrico en la lista de las causas que agrava la severidad de la preeclampsia según sus actualizaciones en el 2011, 2014, 2013 y 2017 respectivamente (WHO World Health Organization, 2011), la importancia de conseguir una mayor evidencia científica de que las concentraciones de ácido úrico mayores o iguales a 7 mg/dL son las causantes del deterioro agudo de la función renal en las pacientes con preeclampsia severa ya identificada está vigente en la actualidad, y es uno de los principales casos de estudio para poder realizar dicha inclusión y confirmar su importancia y utilidad.

En la actualidad, la medición del ácido úrico y creatinina se usa como marcador de gravedad de la preeclampsia. Y según la bibliografía internacional, éstos se consideran como predictores confiables de la gravedad de esta enfermedad, así como de las complicaciones perinatales que conlleva (Powers *et al.*, 2006). Ese otro biomarcador mencionado (creatinina), tiene un mecanismo similar en la función renal al del ácido úrico, de la cual también se ha demostrado su provecho en el estudio del estado del funcionamiento renal en pacientes con preeclampsia, pues el aumento en los niveles de creatinina en pacientes en estado crítico es el criterio básico de la clasificación según la Red de Lesión Renal Aguda o AKIN (Acute Kidney Injury Network, por sus siglas en inglés) que sirve para evaluar la declinación aguda de la filtración renal (Mehta *et al.*, 2007); y en el año del 2013, el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos o ACOG (the American College of Obstetricians and Gynecologists, por sus siglas en inglés) presentó un documento con los hallazgos de severidad de la preeclampsia, entre ellos se estableció que el



valor necesario de la concentración de la creatinina para que se desarrolle una afectación renal debe ser mayor de 1.1 mg/dL (Vázquez & Isla, 2018).

Por lo que la investigación simultánea de marcadores de la química clínica del daño renal agudo o hepático no es tema antiguo ni reciente, por lo que el mal funcionamiento del hígado en la excreción de la bilis o la obstrucción de los conductos biliares provocan un aumento de la cantidad de bilirrubina en los fluidos corporales, es decir, si existe el daño renal provocado por la preeclampsia, la presencia del ácido úrico y de la creatinina confirmaran dicha enfermedad, porque a mayor hiperuricemia mayor deterioro de la función renal.

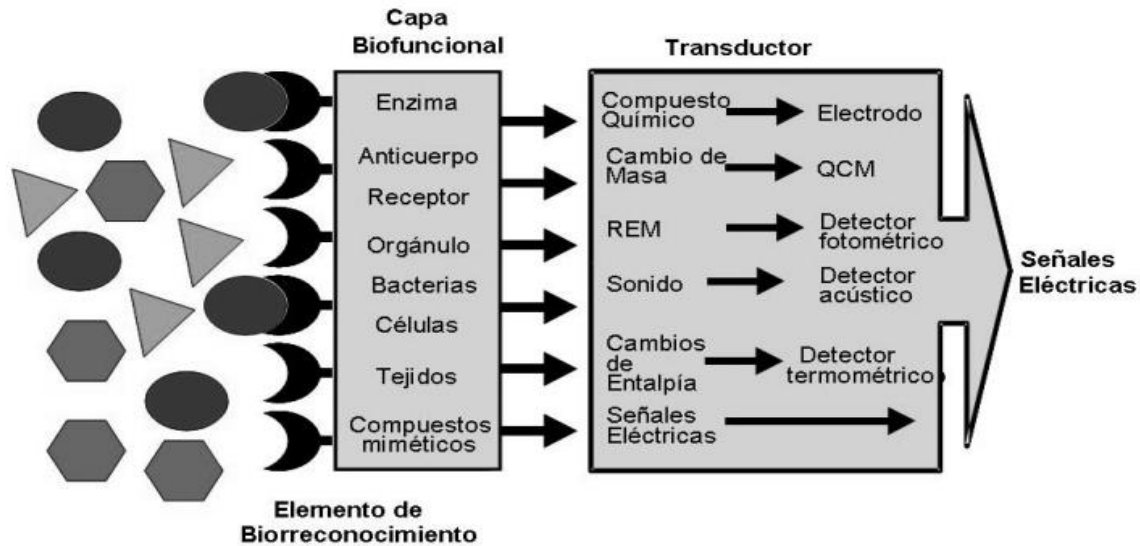
### **6.7 Biosensores.**

Según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), la definición de biosensor es un dispositivo analítico que junta un elemento biológico o biomimético que está profundamente asociado con un transductor fisicoquímico, y que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cuantía presente del mismo (Turner *et al.*, 1987). Es de importancia el no confundir con un sensor químico implantado en una matriz biológica para obtener datos de la misma con un biosensor, debido a que si carece del elemento biológico no se podrá denominar así.

Un biosensor es un dispositivo de análisis constituido por un elemento biológico de reconocimiento (célula, tejido, receptor, ácido nucleico, enzima, ribozima o anticuerpo, entre otros), nanomateriales (nanopartículas, nanocompuestos), materiales inteligentes o compuestos biomiméticos (aptámeros, polímeros de microporosidad intrínseca, sondas de ácidos nucleicos), coligado a un mecanismo que asegura la detección e interpretación de la variación de propiedades fisicoquímicas, ópticas, eléctricas, entre otras, derivada de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico (Turner & Newman, 1998). Es de relevancia destacar que las características fisicoquímicas del analito de interés son las concluyentes para la elección del material biológico/biomimético, mientras que el tipo de elemento de reconocimiento es el que decreta el

sistema transductor.

### Mecanismo de un Biosensor



**Fig. 1.- Mecanismo de funcionamiento de un Biosensor, incorporando los diferentes componentes que pueden integrarlo (Ortega, 2006).**

Los biosensores son herramientas que se conforman de mecanismos para el análisis de la composición, en tiempo real, de la presencia de patógenos, de organismos genéticamente modificados, de los alimentos, residuos de agroquímicos, toxinas, alérgenos, materiales antinutrientes, del control de procesos, contaminantes ambientales, entre otros (Jiménez & León, 2009).

Hoy en día, el desarrollo de biosensores involucra a diferentes campos de estudio que convergen en tres líneas primordiales: elementos de reconocimiento molecular, herramientas y técnicas para su construcción y diseño de dispositivos básicos. Respecto a su elaboración, estos se pueden realizar con técnicas de microfabricación, incluidas las de fabricación a nanoescala, las cuales han abierto un gran panorama a futuro para el desarrollo y aplicación de los mismos, debido a la reducción de costes que la miniaturización sobrelleva y la ventaja de poder producirlos a gran



escala (Ortega, 2006). También en la producción de biosensores se está incorporando cada vez más el uso de enzimas, teniendo en cuenta parámetros y características de rendimiento específicas para su mejora, como el costo, el límite de detección, el tiempo de respuesta, y la vida útil (Lad *et al.*, 2008).

Las principales características de estos son su alta sensibilidad, especificidad, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su versatilidad, bajo coste, etc (Ortega, 2006).

#### ***6.8 Enzimas como biorreceptores en biosensores catalíticos.***

Los biosensores catalíticos son aquellos en los que se utiliza un biocatalizador que al interactuar con el sustrato desencadena una reacción química, sin gasto del material biológico que se regenera y puede ser utilizado nuevamente, los receptores empleados pueden ser enzimas, tejidos, orgánulos o células; sin embargo, es importante resaltar que una de sus desventajas es que en este tipo de dispositivos dicho material biológico requiere ser extraído y purificado (Boix, 2016).

Las principales ventajas de los biosensores enzimáticos respecto a los microbianos son las siguientes (Cortón, 2000):

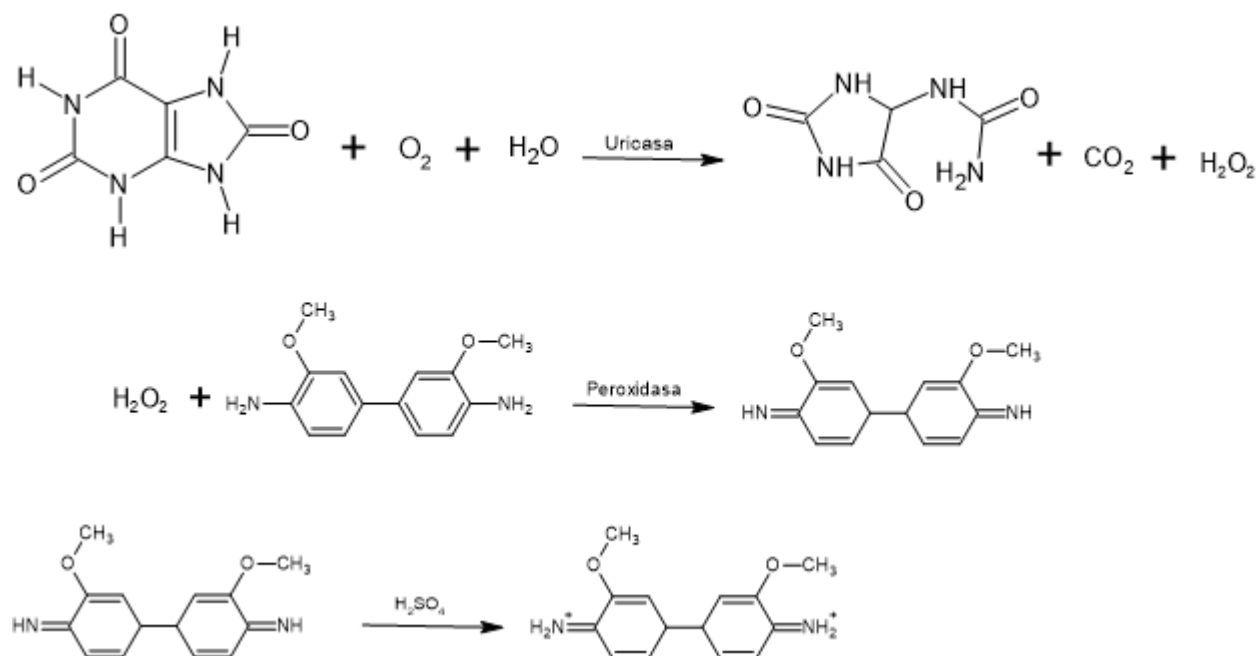
- Elevada especificidad.
- Tiempos de respuesta breves, en general menores al minuto.
- Retornan rápidamente a la línea de base.
- Se pueden usar inhibidores de crecimiento microbiano en las soluciones.
- Material biológico más homogéneo y predecible.

Y según lo reportado por Cortón (2000) en la literatura, las enzimas de tipo redox u oxidorreductasas han sido las más utilizadas en el diseño de biosensores; y es posible clasificar



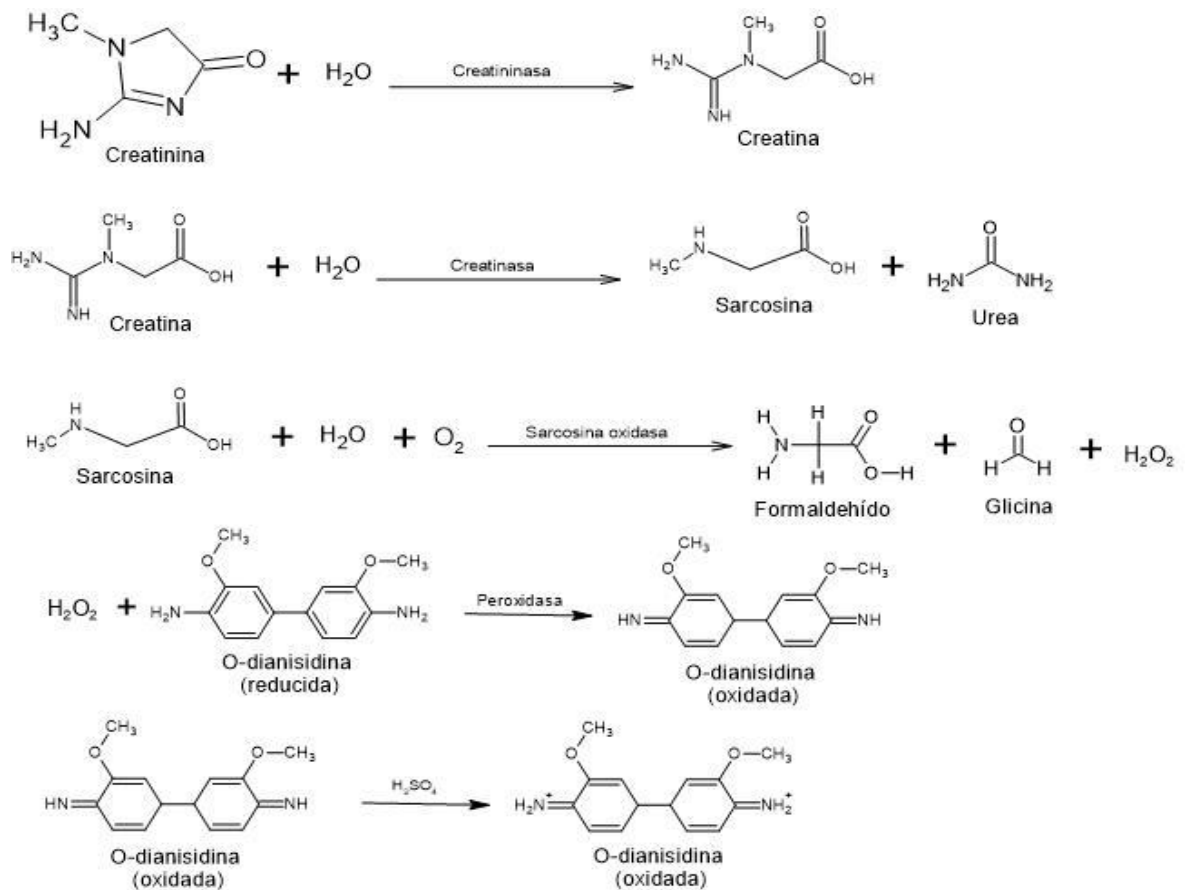
estas enzimas redox considerando la naturaleza del grupo prostético asociado; flavina, quinona, hemo o cobre. Por ejemplo, ya que la detección de la obtención de peróxido o el uso de oxígeno es sencillo utilizando métodos electroquímicos de tipo amperométricos, lo que explica en parte el empleo de este tipo de enzimas. Otra razón relevante es que al usarse mediadores redox (mediadores solubles, polímeros redox u otros) es posible transferir los electrones producidos o consumidos por la acción enzimática directamente hasta o desde la superficie de un electrodo amperométrico, obteniéndose una señal en corriente directamente proporcional a las moléculas de sustrato que intervienen en la reacción catalizada por la oxidasa.

En este proyecto se utilizaron los biomarcadores del ácido úrico y la creatinina para la detección de preeclampsia en el biosensor colorimétrico usando enzimas como biorreceptores. Y para poder cuantificar y medir dichos metabolitos se hace uso de diversas pruebas enzimáticas. En el caso del ácido úrico se empleó el ensayo enzimático reportado por Sigma Aldrich (1994) con algunas modificaciones, en el cual se manejó su mecanismo de reacción en base a un cambio de color gracias al uso de las enzimas uricasa y peroxidasa y un colorante (O-Dianisidina) para poder cuantificarlo a nivel espectrofotométrico, donde en dicho mecanismo de reacción se produce peróxido, el cual oxida al colorante O-Dianisidina, lo que ocasiona un cambio cromogénico que permite medir a nivel enzimático al ácido úrico (ver la Figura 2).



**Fig. 2.- Mecanismo de reacción colorimétrica del ácido úrico.**

Y para la creatinina se utilizó un método enzimático colorimétrico reportado por Suzuki (1981) con algunas modificaciones, en el cual fue necesario incorporar una cadena de reacciones para obtener un cambio colorimétrico en el metabolito, y esto se logró a partir de la creatinina y los subproductos (creatina y sarcosina), que se requieren para poder realizar la reacción, junto a la presencia de las enzimas de la creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa y al colorante O-Dianisidina, ver la Figura 3. Este método enzimático se denomina como adaptable a autoanalizadores, y es uno de los más utilizados, ya que se basa en la determinación de sarcosina a través de la hidrólisis de la creatinina que depende de la acción de la creatininasa y creatinasa; y que consecutivamente, por acción de la sarcosina oxidasa y en presencia de oxígeno, la sarcosina se oxida, generando glicina, formaldehído y peróxido de hidrógeno; donde por último, en la reacción el colorante O-Dianisidina es catalizado por peroxidasa produciendo un cambio de color debido a su oxidación. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de creatinina.



**Fig. 3.- Mecanismo de reacción colorimétrica de la creatinina.**

### 6.8.1 Uricasa o urato oxidasa

La uricasa o urato oxidasa (EC 1.7.3.3; UOX) es una enzima homotetramérica sin cofactor que cataliza la conversión de ácido úrico en 5-hidroxiisourato, un intermediario inestable que puede sufrir hidrólisis espontánea o enzimática en alantoína. Este compuesto es mucho más soluble en agua que el ácido úrico, lo que resulta en una excreción más eficiente del cuerpo. La mayoría de los organismos en los tres dominios de la vida producen una UOX funcional. Sin embargo, debido a la acumulación de mutaciones sin sentido y sin sentido (pseudogenización) en el



gen *uox* durante la evolución, una UOX funcional no está presente en los homínidos, incluidos los humanos, poniendo a estos organismos en riesgo de hiperuricemia. En humanos, la hiperuricemia generalmente se define como el nivel de ácido úrico sérico (SUA) superior a 6.8 mg/dL. Como consecuencia, la hiperuricemia crónica puede provocar gota, cálculos renales, insuficiencia renal, hipertensión y enfermedades cardiovasculares. El tratamiento de la hiperuricemia y la gota se puede realizar con inhibidores de la xantina oxidasa y agentes uricosúricos, que bloquean la síntesis de ácido úrico y bloquean la reabsorción de ácido úrico en los riñones, respectivamente (Yainoy *et al.*, 2019).

En presencia de oxígeno, la uricasa oxida el ácido úrico a alantoína, dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  producido luego es consumido por la peroxidasa para la oxidación de un sustrato cromogénico a un producto de color, que puede medirse espectrofotométricamente. Diferentes tipos de sustrato cromogénico (p. ej., 3-metil-2-benzotiazolinona hidracina (MBTH) más N,N-dimetilanilina (DMA), 2,4- diclorofenol (2, 4-DCP) más 4-aminofenazona, p-hidroxibenzoato (PHBA) más 4-aminoantipirina (4-APP), ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno sulfónico más 4-aminofenazona, o-dianisidina, 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)) y diferentes fuentes se ha utilizado a la uricasa (Phuadraksa *et al.*, 2020).

El ácido úrico es catabolizado a alantoína por la urato oxidasa, o uricasa (E.C. 1.7.3.3.), en la mayoría de los vertebrados excepto los humanos, algunos primates, aves y algunas especies de reptiles. En mamíferos, esta enzima se localiza predominantemente en el hígado y está asociado con el peroxisoma como un tetrámero con una subunidad masa molecular de 32-33 kDa (Pitts & Fish, 1974).

El urato oxidasa ha despertado un interés considerable durante varios razones (Wu *et al.*, 1989):

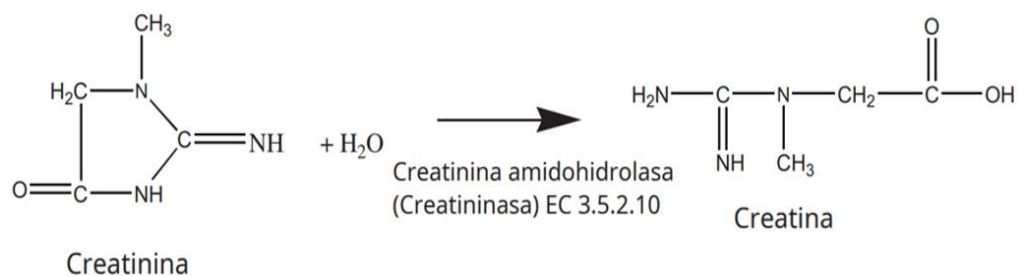
- (i) Tiene una característica evolutiva única en que la enzima se ha perdido durante la evolución de los primates sin una explicación obvia (Friedman *et al.*, 1985).
- (ii) El desarrollo de ratones con hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa completa

deficiencia que no muestran ninguno de los síntomas del síndrome de LeschNyhan ha planteado la posibilidad de que la presencia de urato oxidasa en estos ratones puede protegerlos de alguna manera del daño neurológico.

- (iii) La enzima ha sido utilizada como marcador peroxisomal y es potencialmente un buen sistema para estudiar la clasificación de proteínas en peroxisomas.

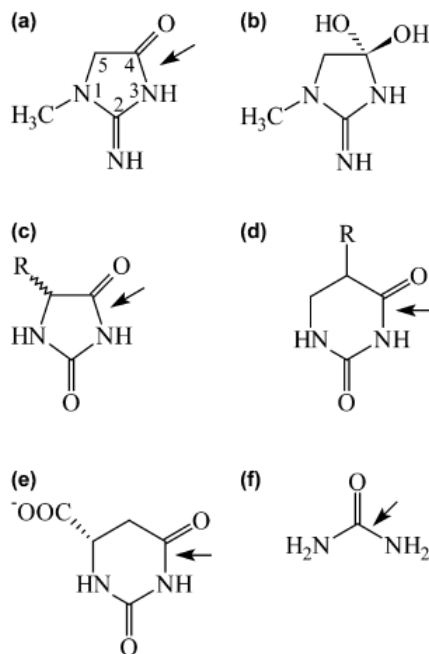
### 6.8.2 Creatininasasa o creatinina amidohidrolasa.

La creatinina amidohidrolasa es una enzima binuclear  $Zn^{2+}$  que se intercambia abundantemente y que es causante de la hidrólisis de creatinina para formar creatina. De acuerdo a Berberich *et al.*, la reacción de la creatininasasa está representada según el esquema presentado en la Figura 3, donde se muestra la modificación química de la misma. Ésta enzima está conformada por una gran familia de proteínas que está constituida por > 11.000 secuencias de proteínas (IPR003785), 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. La deformilasa FAPy es una dependiente de  $Fe^{2+}$ -amidohidrolasa responsable de la desformilación de 2-amino-5-formilamino-6- ribosilamino-4 (3H) pirimidinona 5'-monofosfato, un precursor del cofactor redox F0 y F42 (Ayikpoe *et al.*, 2018).



**Fig. 3.- Hidrólisis de creatinina catalizada por creatinina amidohidrolasa (Berberich *et al.*, 2005).**

Como se mencionó anteriormente, la creatinina amidohidrolasa (creatininasa; EC 3.5.2.10) 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 en varios heterociclos de cinco o seis miembros (Figura 4), y curiosamente, según la literatura, se tiene reportado que de estas enzimas, en la actualidad, solo la D y L-hidantoinasa y dihidroorotasa, (las cuales pertenecen a una de las superfamilias más grandes de amidohidrolasas relacionadas con la ureasa), se han caracterizado por sus estructuras 3D (Beuth *et al.*, 2003).



**Fig. 4.- Sustratos de creatininas y otras amidohidrolasas. Las flechas marcan los sitios de escisión de las enzimas. (a) Numeración de los átomos del anillo de creatinina; (b) aducto de creatinina-agua (análogo del estado de transición); (c) 50-hidantoína mono-sustituida; (d) dihidropirimidina; (e) dihidroorotato; y (f) urea (Beuth *et al.*, 2003).**



De acuerdo con la estructura de la creatininasa y respecto a su secuencia, según la literatura, esta enzima no posee ninguna relación con las amidohidrolasas de tipo ureasa mencionadas anteriormente. Además, entre sus características está que esta enzima no posee homólogos de secuencia entre las proteínas cuyas estructuras se han descrito y almacenado en el Banco de Datos de Proteínas (o Protein Data Bank en inglés) (Berman *et al.*, 2000).

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; por lo que se sabe que todas estas enzimas poseen estructuras primarias similares con identidades de secuencia dentro del rango del 20% al 96%. Mientras que por otro lado, la especie de los mamíferos no poseen actividad creatininasa, sino que ésta surge de una reacción de ciclación no enzimática de la creatina o el fosfato de creatina que es producida exclusivamente por los riñones, lo que da como resultado, que la concentración de creatinina en sangre y orina es la que provee información valiosa sobre la función renal de los mismos. Su medición y monitoreo se realiza a partir de reacciones enzimáticas acopladas que involucran creatinasa, 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.

Los datos y componentes de la estructura de la creatininasa son científicamente relevantes debido a que lo que se conoce acerca de las propiedades bioquímicas y biofísicas de esta enzima y sus bases estructurales es todavía muy limitado. Si bien se sabe que según la literatura, la creatinina amidohidrolasa tiene carácter como metaloenzima dependiente de zinc, y esto se descubrió debido a experimentaciones con espectroscopia de absorción de átomos, en las cuales se dedujo y postuló que cada subunidad de creatininasa se une a un ion de zinc, y es por ello que hoy en día se busca y es un importante tema de estudio e investigación el poder detectar un ion de zinc catalítico en la estructura de la creatininasa. Y en base a esas mismas investigaciones se sabe que una de las maneras para medir la masa molecular de la creatinasa nativa es mediante



ultracentrifugación en 175 kDa, además de que a base de sugerencia se estableció que esta enzima es un homooctamero, no obstante, según sus datos cristalográficos preliminares contradice lo anterior puesto que por lo general se obtiene una estructura cuaternaria octamérica, esto último beneficia una arquitectura hexamérica con una simetría puntual  $D_3$  de la enzima, y es aquí donde surge otra de las inquietantes de estudio de la actualidad donde se busca dar solución a dicha contradicción, averiguando cuál es la estructura que define a la creatinina amidohidrolasa (Beuth *et al.*, 2003).

### ***6.9 Inmovilización de enzimas en nanomateriales y uso el quitosano como soporte.***

Historialmente se sabe que la técnica de la inmovilización de enzimas surge entre 1910 y 1930 (inicios del siglo XX) a partir de la adsorción física de algunas proteínas en materiales como celulosa, caolinita, esferas de cristal y carbón, y a partir de ahí, a este método se le conoce y define como el confinamiento de una molécula de enzima en una fase que reconoce la transmisión de sustancias, es decir, a la enzima se le retiene en una zona del espacio específica, incluyendo casi siempre un contacto entre la enzima con un soporte para generar formas insolubles que limitan su actividad catalítica para también poder ser usadas reiteradamente. Inmovilizar enzimas en soportes sólidos es un método técnico que incita variaciones a nivel estructural en sistemas catalíticos confinados, ocasionando que las propiedades de reacción de estos sean mejores, así como que también posibilita emplear a las a las enzimas retenidas repetidamente en un mismo proceso. Existen un sinnúmero de técnicas para inmovilizar enzimas (entre ellas está la encapsulación, la unión covalente, la adsorción, el entrecruzamiento y el atrapamiento), y de opciones de soportes, ambos, habitualmente se escogen en base a la experiencia empírica, pero guiados bajo la premisa de que se tiene que retener lo más que se pueda la actividad enzimática y su estabilidad, además de que el soporte que se elija debe de ser de síntesis sencilla y con varias opciones de formas, no ser tóxicos, tener una alta afinidad por las proteínas y compatibilidad fisiológica, y poseer grupos funcionales reactivos para reaccionar con las enzimas o en su caso, ser susceptibles a modificaciones químicas (Salazar, *et al.*, 2014).



La inmovilización de enzimas consta de la restricción deliberada de la movilidad de la enzima. Posteriormente de inmovilizadas, las enzimas quedan localizadas en una región definida del espacio, limitada por barreras materiales o electrostáticas, que apartan físicamente la enzima del seno del medio de reacción, pero son permeables a las moléculas de reactivos y de productos. La inmovilización puede servir para dos propósitos: reducir el consumo de la enzima y mejorar su estabilidad, ya que puede ser retirada y reutilizada en varios ciclos de reacciones. Pero el grado de mejora de esta estabilidad operacional depende de la estructura de la enzima, de su método de inmovilización y del tipo de soporte que utilice (Dosanjh & Kaur, 2002).

Demás técnicas principales para la inmovilización enzimática son la afinidad y la microencapsulación; donde la inmovilización por unión covalente y por atrapamiento son las estrategias más empleadas para la construcción de sensores (Datta *et al.*, 2013). De la misma manera, la técnica de inmovilización de enzimas de unión covalente ha sido el método más empleado debido a que permite la estabilización de la estructura terciaria de la enzima y una unión permanente al soporte. (Othman *et al.*, 2016).

Los métodos de inmovilización de enzimas también se pueden dividir en dos categorías generales: por retención física y mediante enlace químico (Arroyo, 1998). La adsorción, que se encuentra dentro de la primera categoría, es el método más sencillo e involucra interacciones superficiales reversibles entre la enzima y el material de soporte. Y según la literatura, se sabe que la inmovilización por adsorción no covalente es muy útil en sistemas no acuosos, en los cuales la desorción puede ser despreciada debido a la baja solubilidad de enzimas en estos disolventes (Khare & Nakajima, 2000 y Pereira *et al.*, 2003). Otro tipo de inmovilización física es el atrapamiento en matrices, el cual consiste en que la solución de enzima se mezcla con un fluido polimérico que luego se solidifica, un ejemplo típico de este método es el atrapamiento en geles de polisacáridos como alginatos, k-carragenanos, agar, quitosano y ácido poligalacturónico u otras matrices poliméricas como gelatina, colágeno y polivinilalcohol (Furukawa *et al.*, 2001 y Hsu *et al.*, 2000).



Otra opción para inmovilizar enzimas es a partir del uso de nanomateriales aunque en sí no simboliza un método específico, pero esta técnica brinda los beneficios de que disminuyen las limitantes respectivas a la transmisión de productos y sustratos en gran cantidad, así como que se asegura y refuerza la unión entre el soporte y la enzima puesto que al hablar de materiales nanoestructurados significa que existe una gran superficie de contacto. Según estudios recientes, los sistemas catalíticos a nivel nanométrico representan una forma muy viable para su aplicación en áreas afines con la biotecnología (Ansary y Husain, 2012) y es por lo ya señalado que el interés de emplear nanomateriales como soportes para inmovilizar enzimas ha ido en aumento. Los procedimientos utilizados en esta tecnología son los mismos que se utilizan generalmente en los mecanismos de los métodos tradicionales de inmovilización de enzimas, por ejemplo, la inmovilización de enzimas a partir de una superficie de nanopartículas fue una de las primeras formas en ser manejadas en esta área y actualmente continua siendo muy empleado.

#### **6.10 Quitosano como soporte para inmovilización enzimática.**

El quitosano es un amino polisacárido [(1-4)-2-amino-2-deoxi-b-D-glucano] derivado por N-desacetilación alcalina de la quitina. Es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza. Es no tóxico y puede ser usado para la inmovilización de enzimas, en especial lipasas, no solo porque su método de obtención es sencillo, sino también porque brinda propiedades químicas y físicas de interacción enzima-soporte atractivas para llevar a cabo reacciones biológicas con buen grado de actividad enzimática y eficiencia (Orrego *et al.*, 2009).

La razón para escoger el quitosano como soporte para la inmovilización de enzimas radica en su afinidad con las proteínas, su biocompatibilidad, porque en sus moléculas presenta grupos amino reactivos y porque se puede moldear en diferentes formas. De hecho, la formación de hidrogeles híbridos de quitosano con otros biopolímeros puede aumentar la densidad del gel, mejorar su resistencia mecánica y, consiguientemente, ampliar sus posibilidades de aplicación (Rangel *et al.*, 2011). Y dichos complejos polielectrolíticos se crean por las interacciones iónicas entre los



grupos amino cargados positivamente del quitosano con las cargas negativas (tales como las de los grupos sulfónicos y carboxilos) de otros biopolímeros. Por ejemplo, entre los biopolímeros que se han usado para combinar con el mismo se incluyen el alginato, la gelatina, el colágeno, el carragenano, el alcohol polivinílico y la carboximetilcelulosa (Berger *et al.*, 2004).

Del mismo modo, las soluciones acuosas de muchos polímeros sintéticos y naturales tales como alcohol polivinílico (PVA), quitosano, xantano, goma locust, amilopectina, amilasa y maltodextrinas experimentan cambios físicos como resultado de su congelación, almacenamiento en frío y subsecuente descongelación de sus dispersiones acuosas. Por eso, la estructura, estabilidad química y mecánica de estos criogeles y los materiales secos que se adquieren por su deshidratación, los hace útiles como matrices atractivas para cromatografía y soportes de nanopartículas biológicas, células y enzimas (Fennema *et al.*, 1973 y Filippova *et al.*, 1986).

Mientras que en los materiales conformados con quitosano, obtenidos por congelación y descongelación seguidas o no por un proceso final de deshidratación, el tamaño de los cristales y, por tanto, el tamaño promedio y la orientación de los poros en el producto seco se ajustan variando la temperatura, la velocidad y los tratamientos de congelación y descongelación (Suh & Matthew, 2000 y Orrego & Valencia, 2009).

Por todo lo anterior, una gran elección de material para ser usado como soporte en la inmovilización de enzimas es la quitina y el quitosano, debido a que son compuestos que cumplen con la mayoría de las características ya mencionadas debido a que son de origen natural y presentan características estructurales de biopolímeros. El quitosano puede modificar químicamente a los grupos hidroxilo y aminos que lo conforman, de hecho, se sabe que la forma primaria de sus grupos amino (-NH<sub>2</sub>), le puede conferir la propiedad de ser soluble en medios ácidos (en específico en pH menor a 6.5) al convertirse en un polielectrolito catiónico, y lo anterior le brinda la cabida de formar membranas y geles con buenas características mecánicas, esto lo hace perfecto para poder ser una base para crear materiales compuestos y diseñar con ello estructuras de inmovilización con características muy delimitadas. Para ver más propiedades del quitosano y la quitina, así como algunas de sus aplicaciones, ver la tabla 3.

**Tabla 3. Principales propiedades funcionales y aplicaciones de la quitina y el quitosano (Salazar, *et al.*, 2014).**

<i>Propiedad funcional</i>	<i>Principales aplicaciones</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Bioactividad</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Actividad anti-colesterolémica</li> <li>– Control de peso (efecto fibra dietaria)</li> <li>– Actividad anti-oxidante</li> <li>– Actividad anti-microbiana</li> <li>– Estimulante sistema inmune</li> <li>– Actividad anti-proliferativa</li> <li>– Capacidad cicatrizante</li> <li>– Capacidad humectante</li> </ul> </li> <li>• <b>Carácter policatiónico</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Capacidad de adsorción</li> <li>– Quelante de metales</li> </ul> </li> <li>• <b>Capacidad de formación de geles y películas</b></li> <li>• <b>Reactividad de grupos funcionales</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ingredientes en alimentos funcionales</b></li> <li>• <b>Fabricación de empaques activos de alimentos</b></li> <li>• <b>Aditivos antimicrobianos en industria textil</b></li> <li>• <b>Control de enfermedades en hortalizas</b></li> <li>• <b>Biomedicina</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Materiales de curación aceleradores del proceso de cicatrización</li> <li>– Regeneración de tejidos</li> </ul> </li> <li>• <b>Industria cosmética</b></li> <li>• <b>Reducción de contaminantes en aguas residuales (fenoles, metales pesados)</b></li> <li>• <b>Recuperación de metales valiosos</b></li> <li>• <b>Inactivación de metalo-enzimas que causan deterioro en alimentos</b></li> <li>• <b>Clarificación de jugo</b></li> <li>• <b>Fabricación de resinas cromatográficas</b></li> <li>• <b>Inmovilización de enzimas</b></li> <li>• <b>Fabricación de membranas de diálisis y fluidos dentales</b></li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Sistemas de liberación controlada de medicamentos y moléculas bioactivas</b></li></ul>
--	---

Asimismo, es relevante aclarar y mencionar que a su vez existen otros polisacáridos naturales que logran ser usados en la inmovilización de enzimas como soportes, como el almidón, la pectina, la carragenina, la celulosa y el alginato, sin embargo, también es importante resaltar que dichos compuestos no poseen de manera individual las propiedades funcionales que la quitina y el quitosano sí, por lo que esto se podría solucionar al crear sistemas de inmovilización empleando materiales compuestos (Salazar, *et al.*, 2014).

### **6.11 Nanopartículas de quitosano.**

Históricamente, las nanopartículas de quitosano se empezaron a estudiar en la década de los noventa, ya que el quitosano es un polisacárido natural muy empleado en la creación de diversos materiales puesto que presenta grandes propiedades tanto biológicas como fisicoquímicas, y es por ello que el interés por las nanopartículas de quitosano incrementó para conseguir opciones para crear sistemas poliméricos sintéticos, debido a que estos brindan la posibilidad de poder integrar a su estructura proteínas, gracias a que estas tienen estabilidad delimitada. Originalmente, las primeras nanopartículas de quitosano sintetizadas se lograron al suscitar interacciones covalentes entre grupos hidroxilo de diferentes agentes entrecruzantes y los grupos amino del polisacárido; para que después, con el paso del tiempo, estas nanopartículas, se creen a partir de interacciones iónicas prescindiendo de la incorporación de aditivos tóxicos, entrecruzantes o solventes.

Estas nanopartículas de quitosano son mayoritariamente producidas por estrategias llamadas de construcción o “bottom-up” provenientes del inglés, las cuales consisten en que el ensamblado polimérico sea originado por múltiples interacciones moleculares; aunque también estas pueden



crearse mediante las estrategias denominadas de deconstrucción o “top-down” provenientes del inglés, y para generarse gracias a la fragmentación de estructuras macroscópicas, las cuales hoy en día, representan una diferente y atractiva alternativa para producir nanopartículas. Y la búsqueda de nuevas técnicas de obtención de este tipo de nanopartículas está relacionado con la mejora de sus características: mucoadhesividad, estabilidad, carga superficial, capacidad de liberación e incorporación de principios activos con actividad biológica, tamaño de partícula, etc.

También se conocen los como métodos para la síntesis de nanopartículas de quitosano a la gelificación ionotrópica, la microencapsulación, el método de difusión del disolvente de emulsificación, la formación de complejos polielectrolíticos y al método micelar inverso; y el método más generalmente empleado y desarrollado es la gelificación ionotrópica, que se basa en la interacción de un polianión, habitualmente el TPP (Tripolifosfato de Sodio), con el grupo amino del quitosano (Divya *et al.*, 2018).

Según la literatura, se expuso que las nanopartículas de quitosano son muy relevantes en la investigación de los nanomateriales poliméricos, en especial para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, y esto se debe a que la variedad de las estrategias de obtención que se conocen, determinan las propiedades de los materiales. Por ejemplo, una de sus aplicaciones más destacadas en estas áreas de interés es que estas nanopartículas se emplearon como un sistema de administración no viral para biomoléculas tales como ácidos nucleicos, péptidos y fármacos, administradas por vía oral, nasal, parenteral y a través del colon (Caro *et al.*, 2019).

Algunos ejemplos de la aplicación de las mismas son los siguientes: en la industria alimentaria éstas se usan en la tecnología de encapsulación, ya que usualmente los compuestos endebles como los aceites esenciales, los polifenoles del té, las vitaminas, las enzimas, etc., son inestables y pueden alterarse o perder sus bioactividades durante la formulación, el procesamiento de alimentos o la digestión, por ello, las nanopartículas de quitosano y TPP dan la estabilidad a lo largo del tiempo de estos compuestos al encapsularlos, y del mismo modo, también les confiere una liberación controlada, además de una mejora en el potencial antioxidante, como una mayor



inhibición de microorganismos patógenos en comparación con los compuestos libres sin encapsular, donde se sabe que su tamaño influye en la actividad antimicrobiana (Singh *et al.*, 2021).

En la industria anterior también se pueden utilizar como recubrimientos o películas comestibles, donde la capacidad de las nanopartículas de quitosano para controlar la liberación de varios compuestos bioactivos puede mejorar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los materiales de envasado de alimentos, pues según lo reportado en diversos estudios, se ha demostrado que con el uso de un recubrimiento comestible que contiene nanopartículas de quitosano, retrasa la oxidación lipídica, puesto que se obtienen valores más bajos de peróxido, nitrógeno volátil total y ácido tiobarbitúrico, recuentos más bajos de bacterias mesófilas, psicotróficas y de ácido lácticas en comparación con aquellos alimentos de origen animal sin recubrimientos de nanopartículas de quitosano, por lo tanto se puede decir que las películas comestibles elaboradas a partir de nanopartículas de quitosano, se puede usar potencialmente para aumentar la vida útil de los alimentos (Singh *et al.*, 2021).

En otra área de interés, éstas se usan a su vez en la ingeniería de tejidos, ya que gracias a sus propiedades biológicas y de mucoadhesividad, pueden mejorar la permeabilidad transmucosa, mejorando así el transporte a través de la vía paracelular de las que puede incitar la reorganización estructural de las proteínas asociadas a las uniones estrechas (Peppas & Huang, 2004).

Las mismas también poseen una gran actividad como agente antioxidante, ya que descartan los radicales libres y pueden quelar iones metálicos para el tratamiento de aguas, donde se deshacen de forma eficaz de compuestos como colorantes, pesticidas y contaminantes metálicos (Leira, 2022).

En aplicaciones biomédicas; se pueden aplicar en sondas de detección de algunos tipos de cáncer, ya que actualmente éstas al estar compuestas por metales pesados tienden a presentar citotoxicidad, por ello, con el uso de las nanopartículas de quitosano que presentan una naturaleza biocompatible y no tóxica, pueden ser utilizadas para este propósito. Otra aplicación es la



liberación controlada de medicamentos, ya que estas nanopartículas tienen la capacidad de atravesar barreras biológicas, sirviendo así como una vía de administración de fármacos o macromoléculas mediante liberación controlada en un sitio objetivo, o bien para preservar a macromoléculas de la degradación en medios biológicos (Lopez-Leon *et al.*, 2005; Perera & Rajapakse 2013).

Por último, las nanopartículas de quitosano pueden considerarse como un material idóneo para la inmovilización de enzimas, ya que el grupo funcional amino del quitosano permite realizar dicha inmovilización (Ghadi *et al.*, 2015).

## **7. Metodología.**

Para poder evaluar la eficiencia del uso de las nanoesferas de quitosano se decidió evaluarlas contra macroesferas de quitosano, es por ello que, a continuación se mencionarán los métodos de síntesis, funcionalizaciones y caracterizaciones de ambas, así como los procesos de inmovilización, medición, acoplamiento y evaluación de los efectos del pH, temperatura y sustrato de las enzimas, para obtener la medición y determinación de los cambios de color que se experimentan en las reacciones químicas producidas por la interacción de los metabolitos evaluados (ácido úrico y creatinina) y sus enzimas correspondientes en relación a las diferentes concentraciones de los mismos.

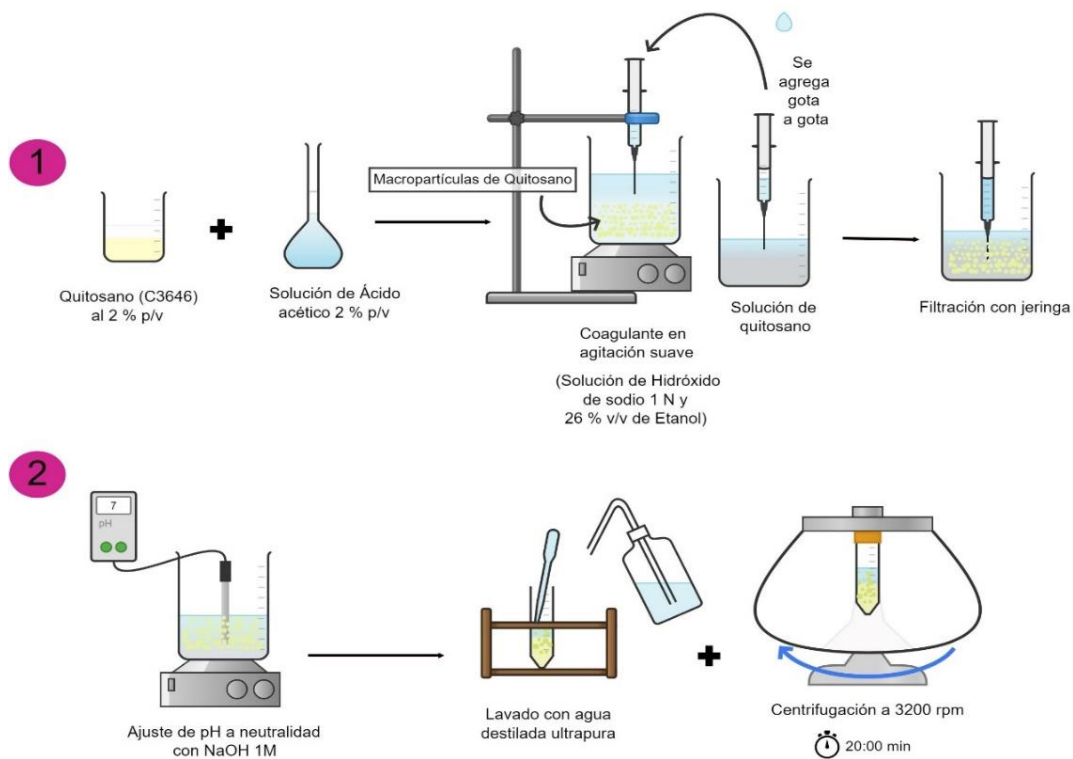
### **7.1 Síntesis de las macroesferas de quitosano.**

Las macroesferas de quitosano fueron preparadas mediante el método de precipitación (Biró E. *et al.* 2008) que se menciona a continuación:

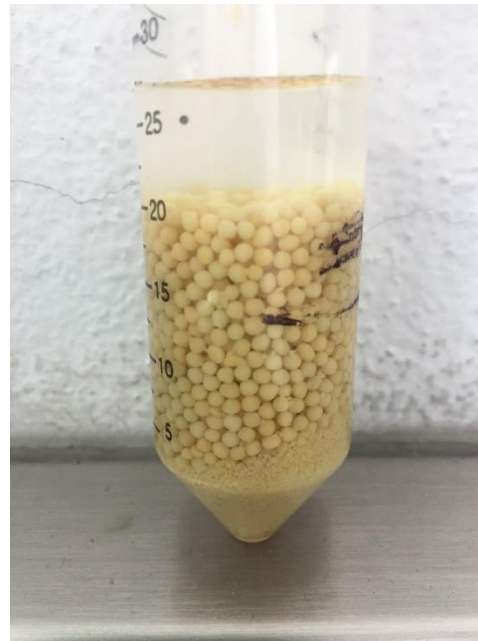
1. Primero, el quitosano (C3646, de caparazones de cangrejo) al 2 % p/v se disolvió en una solución acuosa de ácido acético (2 % p/v). Después, esta solución se añadió gota a gota por medio de una jeringa de 1 mL a través de un capilar a un líquido de coagulación

(hidróxido de sodio 1 N y 26% v/v de etanol) que se encontraba en agitación suave.

2. Por último; se filtraron, lavaron y centrifugaron las macroesferas resultantes con agua destilada hasta conseguir neutralidad.



**Fig. 7.- Procedimiento para la síntesis de macroesferas de quitosano.**

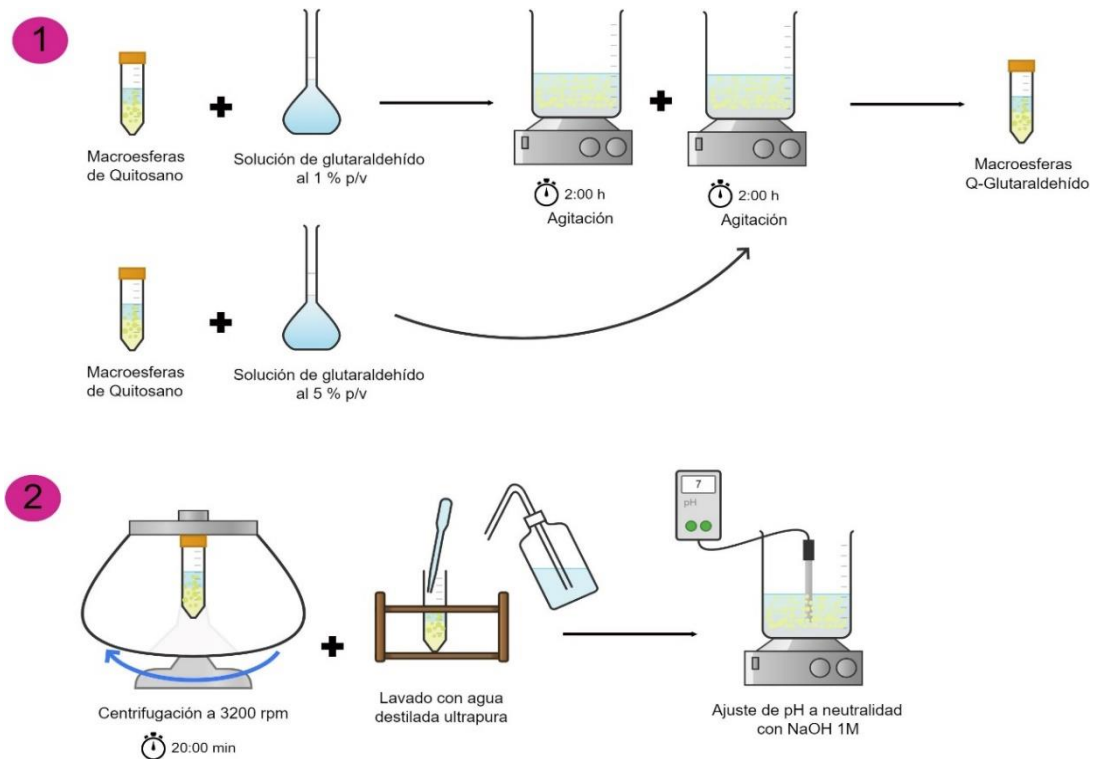


**Fig. 8.- Macroesferas de quitosano sintetizadas.**

### ***7.2 Funcionalización de las macroesferas de quitosano.***

El método de preparación para la funcionalización de las macroesferas de quitosano es el siguiente:

1. Las macroesferas de quitosano anteriormente sintetizadas se colocaron en agitación con una solución de glutaraldehído al 1% y otra al 5% durante 4 horas, utilizando dos horas para cada solución, y se mezclaron.
2. Posteriormente, la solución obtenida se centrifugó y se le realizaron lavados con agua destilada ultrapura para retirar el exceso de glutaraldehído junto con mediciones de valores de pH en un proceso repetido hasta conseguir un pH neutro.



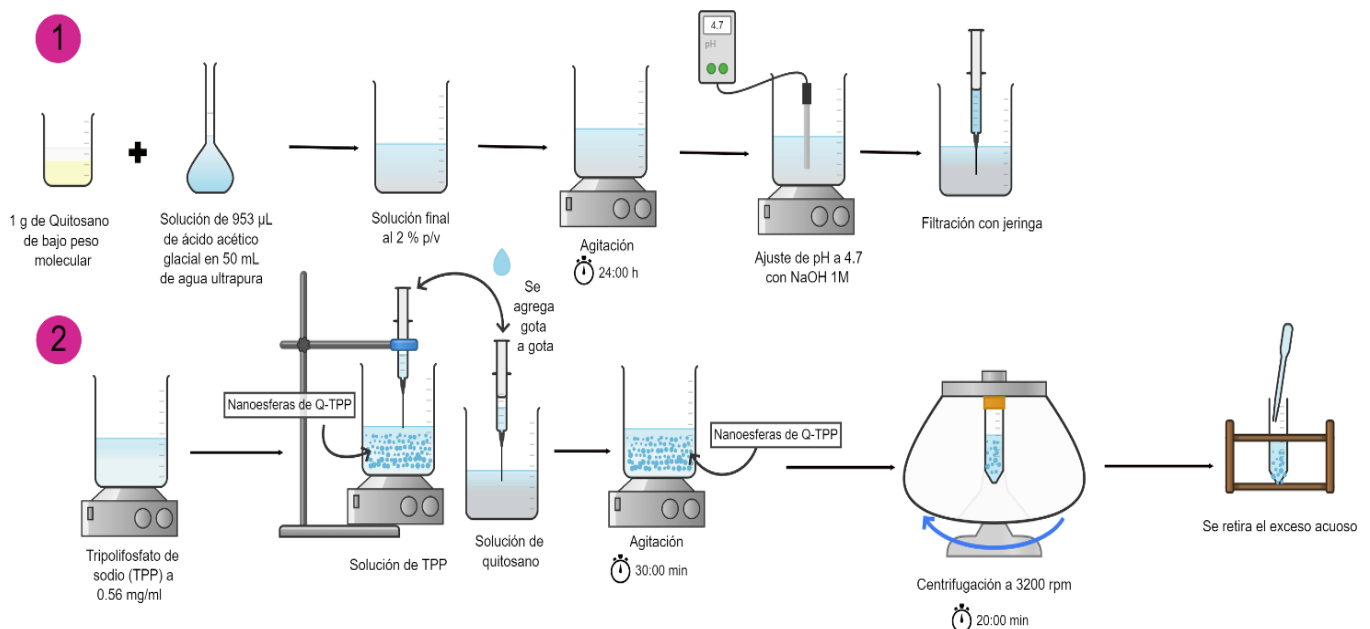
**Fig. 9.- Funcionalización con glutaraldehído de las macroesferas de quitosano.**

En este caso, la funcionalización de las macroesferas de quitosano es covalente y se realiza mediante la formación de enlaces de amida en presencia de sustratos de anhídrido, pues Nicole *et al.* (2021) establece que, junto con la activación mediada por agentes de acoplamiento, los anhídridos se han informado durante mucho tiempo en la literatura para la conjugación de aminas y quitosano. Además, se establece que en las moléculas injertadas covalentemente, como en este caso con el glutaraldehído, la presencia de agentes de entrecruzamiento sin reaccionar que quedan dentro del material final representa una toxicidad potencial.

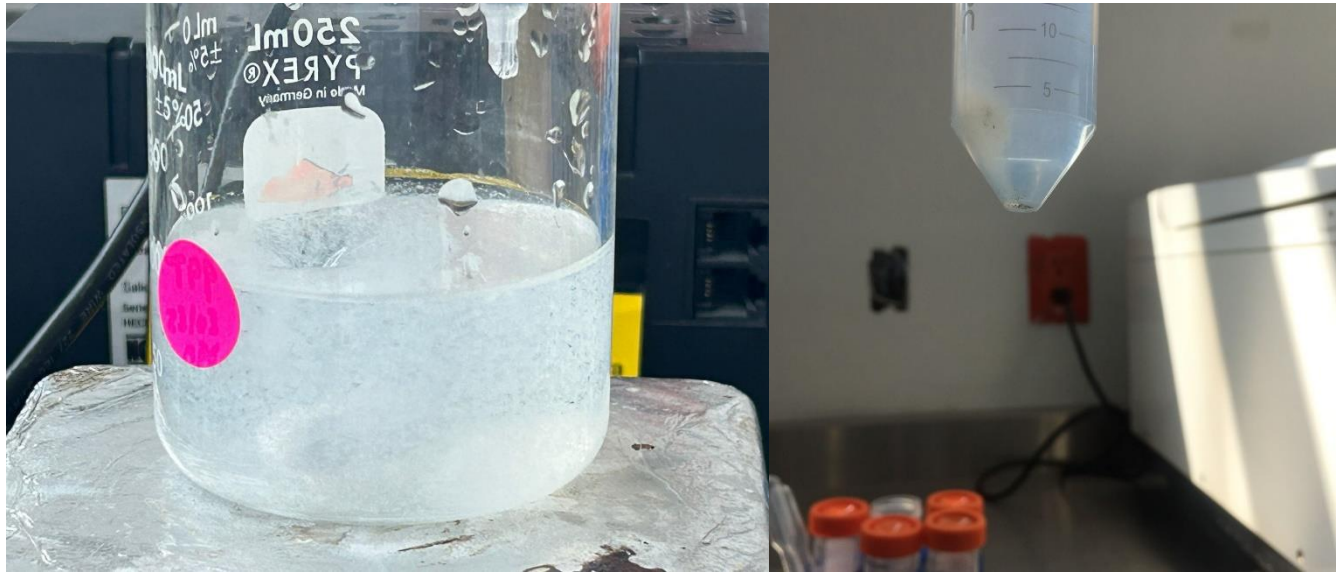
### 7.3 Síntesis de las nanoesferas de quitosano.

Las nanopartículas de quitosano se prepararon mediante el método de gelación iónica de acuerdo con las metodologías propuestas por Calvo *et al.* (1997) y Biró *et al.* (2008) con algunas modificaciones, su procedimiento se menciona a continuación:

1. El quitosano de bajo peso molecular (1 g) se disolvió en una solución acuosa de ácido acético glacial al 2% p/v (953  $\mu$ L de ácido acético glacial aforado en 50 mL de agua ultrapura). Esta solución se mantuvo en agitación por 24 h a temperatura ambiente utilizando un agitador magnético. Después, el pH resultante se ajustó a 4.7 usando una solución de NaOH 1M. La solución ajustada se filtró a través de una jeringa con un tamaño de poro de 6 mm para remover residuos de partículas insolubles.
2. Simultáneamente, el tripolifosfato de sodio (TPP) fue preparado y disuelto en agua ultrapura a una concentración final de 0.56 mg/mL con ayuda de agitación magnética. Finalmente para obtener las nanoesferas de Q-TPP, la solución de quitosano fue agregada gota a gota con una jeringa 2 mL en la solución de TPP hasta que se formaron las nanopartículas. La mezcla se mantuvo en constante agitación durante 30 min a temperatura ambiente, y luego, la suspensión resultante con las nanoesferas se centrifugó a 3200 rpm por 20 min. Por último se retiró el exceso acuoso.



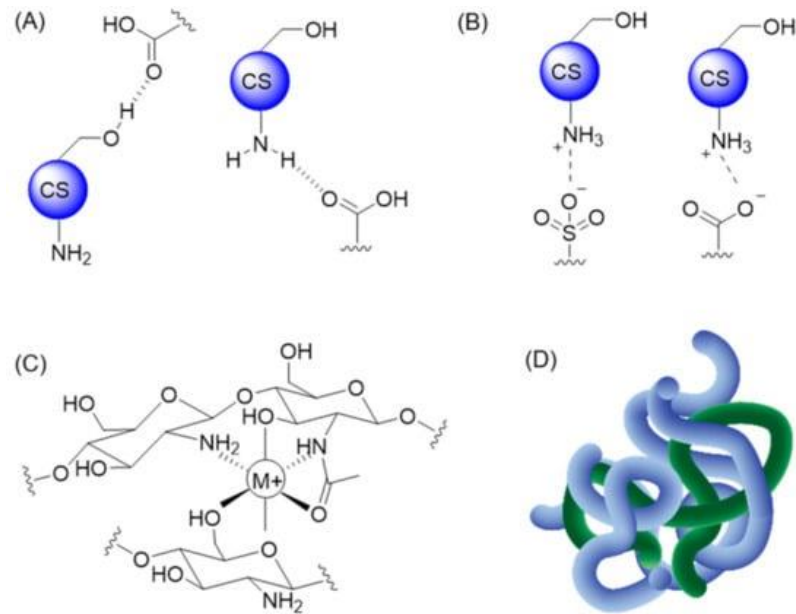
**Fig. 10.- Procedimiento para la síntesis de nanoesferas de quitosano.**



**Fig. 11.- Síntesis de nanoesferas de quitosano.**

#### ***7.4 Funcionalización de las nanoesferas de quitosano.***

Según Nicolle *et al.* (2021), para la funcionalización de los materiales basados en quitosano, estos se pueden combinar por medio de modificaciones no covalentes con moléculas pequeñas, proteínas y polímeros. En estos casos, la estabilidad de esos productos obtenidos de quitosano resultantes se basa en tres tipos principales de interacciones no covalentes: enlaces de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas (enlaces iónicos) y quelación.

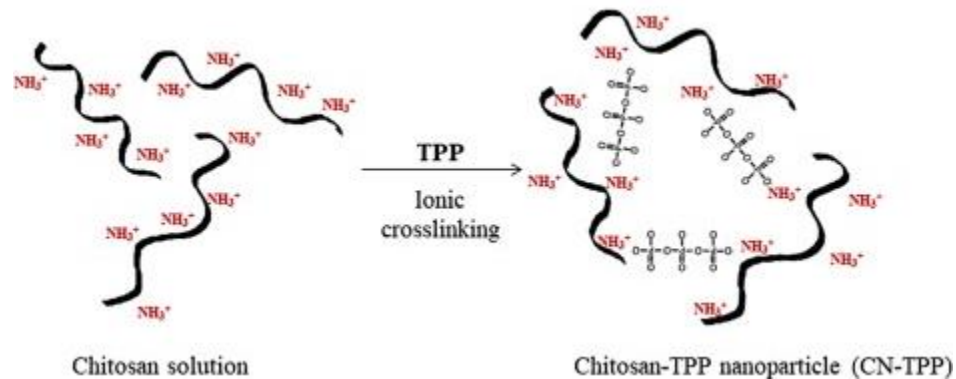


**Fig. 12.- Ejemplos de interacciones no covalentes con quitosano: (A) enlace con puentes de H, (B) interacciones iónicas, (C) quelación y (D) entrelazamiento entre múltiples cadenas poliméricas (Nicolle *et al.*, 2021).**

El ensamblaje de derivados de quitosano por medio de modificaciones no covalentes evita el uso de reactivos químicos, lo que simplifica los procedimientos de purificación, que pueden ser lentos y complejos. Según lo reportado en la literatura, las moléculas pequeñas cargadas negativamente pueden quedar atrapadas en la matriz de quitosano mediante interacciones electrostáticas (también llamadas entrecruzamiento físico, no covalente o iónico) con los grupos amino de las cadenas de quitosano. Las propiedades físicas de los geles resultantes, como la porosidad y la solubilidad, se pueden controlar cambiando la concentración, el peso molecular, la densidad de carga del agente iónico (por ejemplo utilizando un adyuvante de molécula pequeña), el pH del medio, etc... (Giraldo *et al.*, 2018). La preparación de estos geles se realiza en condiciones sencillas. Por lo general, el adyuvante (1–2 % *p/v*) se agrega a una solución acuosa de quitosano con 1–2 % (*v/v*) de ácido acético. El entrecruzamiento físico se considera menos propenso a los efectos secundarios tóxicos que el entrecruzamiento químico debido a su sensibilidad a las variaciones del medio. Además, los adyuvantes de

pequeño peso molecular usados comúnmente con quitosano no son tóxicos y ya están aprobados como aditivos seguros para el consumo humano (si corresponde) (Nicolle *et al.*, 2021).

En este caso, la funcionalización de las nanopartículas de quitosano viene implícita en la síntesis de las nanoesferas de quitosano, debido a que el TPP funciona como un agente de reticulación para inducir la unión intermolecular entre las cargas positivas de los grupos amino del quitosano y los fosfatos negativos en la estructura del TPP (ver Fig. 13), además de que también actúa como un adyuvante coagulante de molécula pequeña que forma un entrelazamiento físico de enlaces iónicos.



**Fig. 13.- Entrecruzamiento iónico entre quitosano y TPP. (Ribeiro *et al.*, 2020).**

### 7.5 Caracterizaciones.

Se llevaron a cabo las técnicas de caracterización de espectroscopia Raman y la microscopia electrónica de barrido para evaluar el tamaño, morfología y composición del material soporte que se utiliza en este proyecto. Las muestras se realizaron colocando 1 g/mL de quitosano.

#### 7.5.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) para macroesferas y nanoesferas de quitosano.

La morfología y el diámetro de las macros y nanoesferas de quitosano se observaron mediante



microscopía electrónica de barrido (FE-SEM, Hitachi S-7400. Hitachi, Japón) (Nirmala *et al.*, 2011).

### ***7.5.2 Espectroscopia Raman (RS) para macro y nanoesferas de quitosano.***

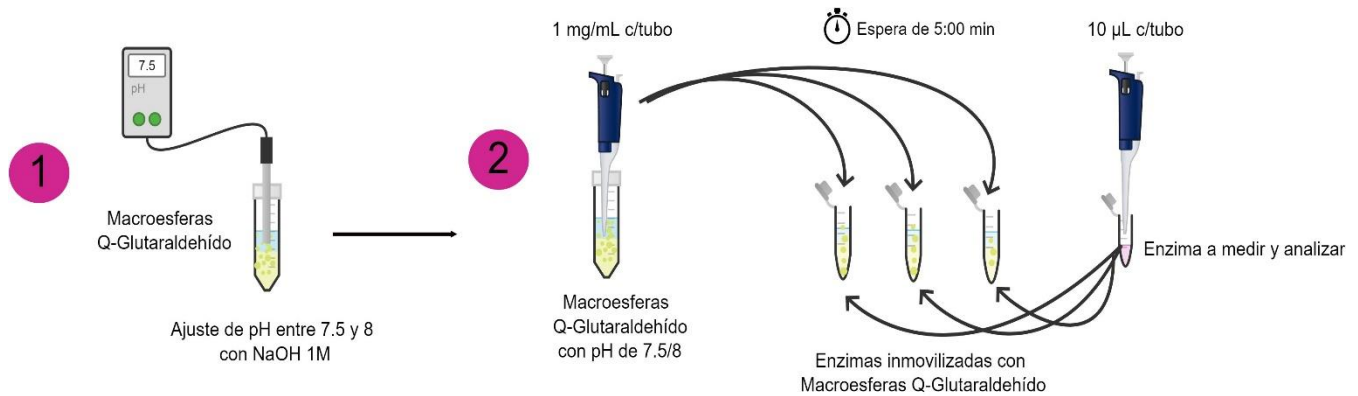
Los parámetros usados en la muestra para la dispersión Raman para el mapeado y la obtención de imágenes globales, fueron de una línea láser de iones de argón de 514.5 nm a 200 W. Para las líneas láser de 785 y 632.8 nm, la potencia en la muestra fue de 25 W. Y todas las mediciones se realizaron en una geometría de retrodispersión, utilizando un objetivo de microscopio de 50× con un valor de apertura numérica de 0.75 proporcionando áreas de dispersión de aproximadamente 1  $\mu\text{m}^2$ . También se registraron espectros de punto único con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  para obtener los resultados de mapeado 2D, mientras que para los resultados de la cartografía 2D se recogieron mediante el rasterizado de un de una platina motorizada de 3 ejes codificados, controlada por ordenador, con un paso de 1  $\mu\text{m}$  (Correa *et al.*, 2009).

### ***7.6 Inmovilización de las enzimas en macroesferas de quitosano.***

La inmovilización enzimática en las macroesferas de quitosano se realizó de la siguiente manera:

1. Primero fue necesario que el pH de las macroesferas fuera de entre 7.5 a 8, debido a que según lo reportado en la literatura en este pH se encuentra una mejor actividad enzimática de las moléculas de ácido úrico y creatinina.
2. Después, se colocó 1 mg/mL de macroesferas de quitosano en 3 tubos de ensayo a los cuales posteriormente se le añadieron 10  $\mu\text{L}$  de las enzimas que correspondían al metabolito al que se le iba a realizar la prueba. Finalmente, a esa mezcla se le dejó reposar

por 5 minutos para que ocurriera la adherencia de las mismas al quitosano.

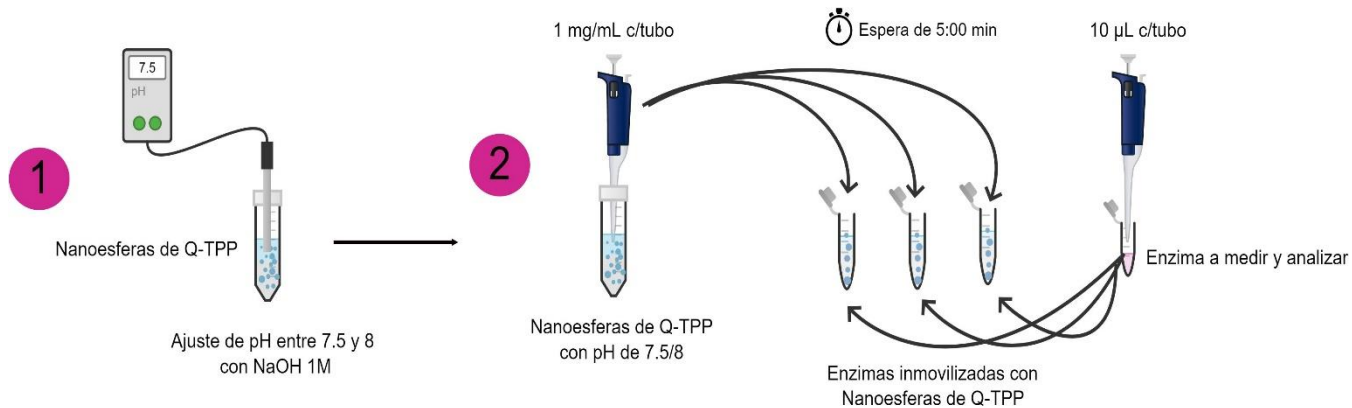


**Fig. 14.- Procedimiento para la inmovilización de las enzimas en macroesferas de quitosano.**

### ***7.7 Inmovilización de las enzimas en nanoesferas de quitosano.***

La inmovilización de las enzimas en las nanoesferas de quitosano se realizó de la siguiente manera:

1. Primero fue necesario que el pH de las mismas fuera de entre 7.5 a 8, debido a que según lo reportado en la literatura en este pH se encuentra una mejor actividad enzimática de las moléculas de ácido úrico y creatinina.
2. Después, se colocó 1 mg/mL de nanoesferas de quitosano en 3 tubos de ensayo a los cuales posteriormente se le añadieron 10 µL de las enzimas que correspondían al metabolito al que se le iba a realizar la prueba. Finalmente, a esa mezcla se le dejó reposar por 5 minutos para que ocurriera la adherencia de las mismas al quitosano.



**Fig. 15.- Procedimiento para la inmovilización de las enzimas en nanoesferas de quitosano.**

### **7.8 Método para la cuantificación de proteínas.**

Según García & Sánchez (1985) hoy en día se utilizan diversos métodos para la cuantificación de proteínas como las técnicas: colorimétricas (Folin-Lowry, Biuret), espectrofotométricas (absorción en el ultravioleta próximo o lejano), volumétricas (Kjeldalh) y turbidimétricas (precipitación con determinados reactivos). Y según la evidencia los que tienen una mayor aceptación en referente a sensibilidad y sencillez, son las de Folin-Lowry, absorción en el ultravioleta y Kjeldalh.

En este proyecto de investigación se empleó el método de Folin-Lowry para medir el acoplamiento enzimático, y el fundamento de dicha técnica colorimétrica, es la formación del complejo proteína-Cu, el cual reduce al fosfomolibdato del reactivo Folin- Ciocalteu produciendo un color azul que se puede comprobar colorimétricamente. El método de Folin-Lowry se ha usado desde 1951, y se le relaciona principalmente a la estabilidad de la reacción en función del tiempo y temperatura, y longitud de onda apropiada para la medida del color (García & Sánchez, 1985).

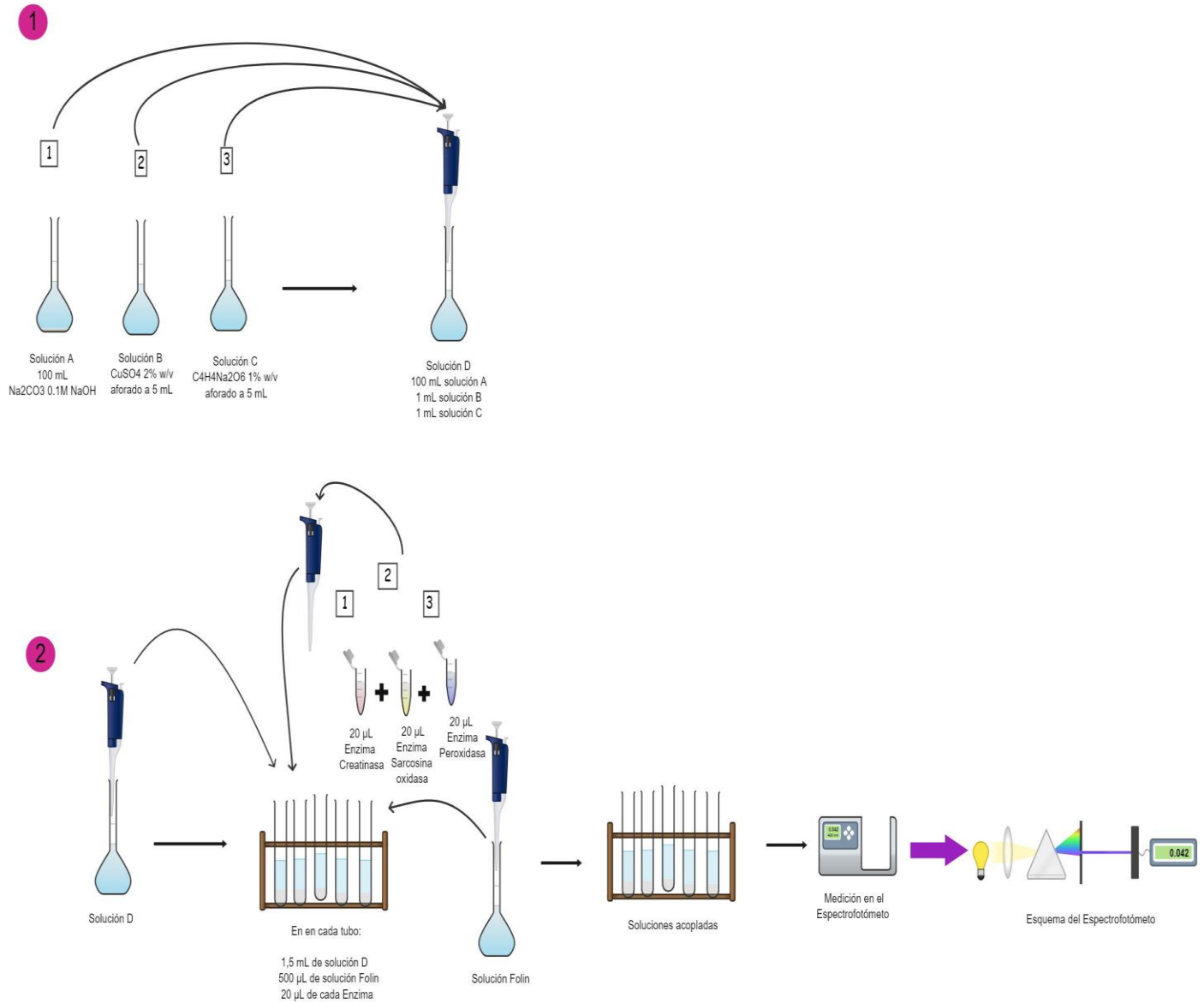


### 7.8.1 Prueba de acoplamiento en las microesferas de quitosano.

Las enzimas de las reacciones del ácido úrico y la creatinina fueron cuantificadas por el método de Folin-Lowry de acuerdo con las metodologías propuestas por Sigma Aldrich (2004) con algunas modificaciones, su procedimiento fue el siguiente:

1. Se prepararon las siguientes soluciones:
  - Solución A: 100 mL de carbonato de sodio 0.1 M (4.2396 g) en 0.1 M de NaOH (0.4 g).
  - Solución B: 5 mL de sulfato de cobre al 2% p/v (0.1 g) aforado con agua destilada ultrapura.
  - Solución C: 5 mL tartrato de sodio al 1% p/v (0.05 g) aforado con agua destilada ultrapura.
  - Solución D: mezcla de los 100 ml de la solución A, con 1 ml de la solución B y 1 ml de la solución C.
2. Después la solución D se dividió en 13 grupos de 3 tubos de ensayo (que cada uno corresponde a los tiempos que se evalúan en la prueba, de 0 a 60 minutos por intervalos de 5 minutos entre cada uno), colocando 1.5 ml en cada uno de ellos y posteriormente se añadieron 500  $\mu$ L de colorante Folin.
3. Posteriormente se inmovilizaron las enzimas en las microesferas de quitosano por el procedimiento descrito en el apartado 7.8 y 7.9, y después de los 5 minutos de espera se agregaron a cada tubo de ensayo, del primer grupo de 3 tubos, 20  $\mu$ L de cada enzima dependiendo de la prueba del metabolito y se dejaron reposar por otros 5 minutos. Repitiéndose así este pasó por ciclos de 5 minutos hasta terminar con la prueba a los 60 min.

4. Finalmente, se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-Vis con condiciones de: T = 25 °C, A 750 nm, Trayecto luminoso = 1 cm.



**Fig. 16.- Procedimiento para el acoplamiento enzimático (este diagrama ejemplifica el caso de la medición de creatina acoplada).**



Cálculos:

$$\text{mg Proteína/mL} = \frac{(\text{mg Proteína})(100)}{\text{mL de muestra/mL}}$$

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(\text{mg Proteína})(100)}{\text{mg de sólido/mL}}$$

100 = Conversión a porcentaje

Para la curva estándar se trazó el  $\Delta A_{750\text{nm}}$  de los Estándares vs mg de proteína:

$$\Delta A_{750\text{nm}} \text{ Estándar} = A_{750\text{nm}} \text{ Estándar} - A_{750\text{nm}} \text{ Blanco.}$$

Determinación de la muestra:

$$\Delta A_{750\text{nm}} \text{ Prueba} = A_{750\text{nm}} \text{ Prueba} - A_{750\text{nm}} \text{ Blanco.}$$

Determinación de los mg de proteína a partir de la Curva Estándar:

$$\text{mg Proteína} = (\text{mg de proteína de la Curva Estándar}) * (\text{df})$$

df = Factor de dilución

El método consiste en que la reacción ocurra mediante las siguientes fases según lo descrito por Flores & Ruiz (2017):

1. Primero la reacción de la proteína en un medio alcalino con iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en presencia de tartrato (este último se utiliza para evitar la precipitación), crea un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico.
2. Después, la reacción en contacto con el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles, permite que se la misma se reduzca por medio de los grupos fenol presentes en la



proteína a un complejo de color azul oscuro que se mide colorimétricamente de manera posterior (dicho complejo azul presenta una composición desconocida y presenta dos máximos de absorción a las longitudes de onda 560 y 680 nm).

### ***7.8.2 Prueba de acoplamiento en las nanoesferas de quitosano.***

Las enzimas de las reacciones del ácido úrico y la creatinina fueron cuantificadas por el método de Folin-Lowry de acuerdo con las metodologías propuestas por Sigma Aldrich (1994) con algunas modificaciones, su procedimiento fue el mismo que el mencionado en el apartado anterior solo que cambiando las macroesferas por nanoesferas de quitosano.

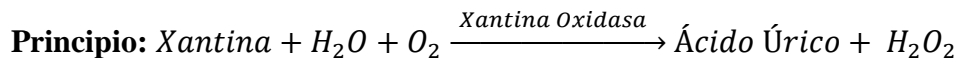
### ***7.9 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano.***

Para comprobar si las enzimas estaban inmovilizadas en las macroesferas y nanoesferas de quitosano, se midió la actividad enzimática de las enzimas inmovilizadas utilizando métodos estándar indicados por Sigma Aldrich (1994) y por Suzuki (1981) con algunas modificaciones.

Inicialmente se midió la actividad en solución para estandarizar el método, posteriormente se midió la actividad de cada enzima libre, después se inmovilizó cada una, primero en macroesferas y posteriormente en nanoesferas de quitosano según su método correspondiente.

- ✦ Para medir el Ácido úrico se empleó como base el siguiente método estándar indicado por Sigma Aldrich (1994) y posteriormente para cada analito y reacción se implementaron modificaciones que se describirán más adelante:

### Ensayo enzimático de la XANTINA OXIDASA (EC 1.1.3.22)



**Condiciones:** T= 25° C, pH= 7,5, A290-410 nm, Paso de luz= 1 cm

**Método:** Determinación de la tasa espectrofotométrica continua.

#### Reactivos:

- A. Buffer fosfato potásico 50 mM, pH 7.5 a 25 °C.  
(Preparar 200 ml en agua desionizada utilizando fosfato potásico, monobásico, anhidro, Sigma Prod. No. P-5379. Ajustar a pH 7.5 a 25° C con 1 M KOH).
- B. Solución de Xantina 0.15 mM  
(Preparar 100 ml disolviendo inicialmente Xantina, Sigma Prod. No. X-0626, en un volumen mínimo de NaOH. Añadir aproximadamente 90 ml de agua desionizada. Ajustar a pH 7.5 a 25° C con 1 M de NaOH o 1 M de HCl. Diluir hasta un volumen final de 100 ml. PREPARAR FRESCO).
- C. Solución enzimática de Xantina oxidasa  
(Inmediatamente antes de su uso, preparar una solución que contenga 0.1 – 0.2 unidad/ml de Xantina Oxidasa en Reactivo A frío).



### Procedimiento:

Pipetear (en mililitros) los siguientes reactivos en cubetas de cuarzo adecuadas:

	Prueba	Blanco
Reactivo A (Buffer)	1.90	1.90
Reactivo B (Xantina)	1.00	1.00
Agua desionizada	—	0.10

Mezclar por inversión y equilibrar a 25° C. Monitorizar el A (290-410nm) hasta que sea constante, utilizando un espectrofotómetro adecuadamente termostatado. A continuación, añadir:

	Prueba	Blanco
Reactivo C (Solución enzimática)	0.10	—

Mezclar inmediatamente por inversión y registrar el aumento de A<sub>290-410 nm</sub> durante aproximadamente 5 minutos. Obtenga la ΔA<sub>290-410nm</sub>/minuto utilizando la tasa lineal máxima tanto para la prueba como para el blanco.

### Cálculos:

$$\text{Unidades/mL de} = \frac{\Delta A_{(290 \text{ nm})}/\text{min Ensayo} - \Delta A_{(290 \text{ nm})}/\text{min}}{(\text{Blanco})(3)(df)(12.2)(0.1)}$$



3= Volumen Total (en mililitros) del ensayo.

df= Factor de dilución.

12.2= Coeficiente de extinción milimolar del ácido úrico a 290-410 nm.

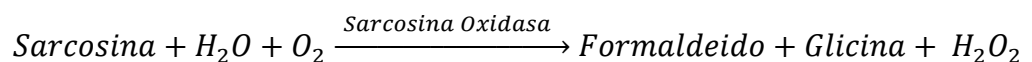
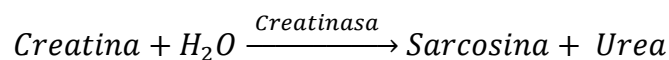
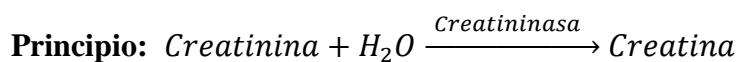
0.1 = Volumen (en mililitros) de enzima utilizada.

**Definición de unidad:** Una unidad convertirá 1.0  $\mu\text{mol}$  de Xantina en ácido úrico por minuto a pH 7,5 a 25° C.

**Concentración final del ensayo:** En una mezcla de reacción de 3.00 ml, las concentraciones finales son de 33 mM de fosfato potásico, 0.050 mM de Xantina y 0.01 – 0.02 unidades de Xantina oxidasa.

- Y para medir la creatinina se empleó el método estándar indicado por Suzuki (1981) y posteriormente para cada analito y reacción se implementaron modificaciones que se describirán más adelante:

#### Ensayo de actividad enzimática de Creatinina, Creatina y sarcosina oxidasa.



**Condiciones:** T = 37°C, pH = 8.3, A=410 nm

**Método:** espectrofotométrico

**Reactivos:**

- A. 60 mM Buffer glicilglicina, pH 8.3 at 37°C.  
(Preparar 100 ml en agua desionizada usando gly-gly, Base libre, Sigma Prod. No. G-1002. Ajustar a pH 8.3 at 37°C con 1 M NaOH.)
- B. 300 mM Solución de creatinina, creatina y/o sarcosina (según corresponda).  
(Preparar en Reactivo A usando sarcosina, Base libre, Sigma Prod. No. S-9881.)
- C. 500 mM Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH).  
(Preparar en agua desionizada usando Ácido acético Glacial, Sigma Prod. No. A-6283.)
- D. 2 M Solución acetato de amonio).  
(Preparar en agua desionizada usando Acetato de amonio, Sigma Prod. No. A-7262.)
- E. Isopropanol.  
(Usar Isopropanol, Anhídrido, Sigma Stock No. 405-7.)
- F. Acetilacetona.  
(Usar Acetilacetona, Sigma Prod. No. A-3511.)
- G. Reactivo de color.  
(Preparar añadiendo 20 ml de Reactivo D a 40 ml de Reactivo E. Entonces añadir 0.15 mL de reactivo F. Agitar y dejar en almacenamiento toda una noche entre 0-5°C.)
- H. Solución de enzima sarcosina oxidasa.
- I. (Inmediatamente antes de usar, preparar solución 0.5 - 1.0 unidades/mL de Creatininasa, Creatinasa y/o Sarcosina Oxidasa en Reactivo a 4°C (según corresponda).



### Procedimiento:

1. Se pipetearon (en mililitros) los siguientes reactivos en tubos Falcon:

	Prueba	Blanco
Reactivo A (Buffer)	0.20	0.30
Reactivo B (Solución de analito)	0.20	0.20

2. Se mezcló y se incubó a 37°C. Entonces se añadió:

	Prueba	Blanco
Reactivo H (Solución de enzima)	0.10	—

3. Se mezclaron e incubaron por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron:

	Prueba	Blanco
Reactivo C ( $CH_3COOH$ )	0.50	0.50

4. Se mezclaron y añadieron:

	Prueba	Blanco
Reactivo G (Reactivo color)	3.00	3.00



5. Se mezclaron e incubaron a 60°C por 30 minutos. Se realizó la medición en UV-vis a A=410 nm.

**Cálculos:**

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(\Delta A_{(410 \text{ nm})})(4)(df)}{(10)(8)(0.1)}$$

4=Total volumen de ensayo (en mililitros).

df= Factor de dilución.

10= Tiempo de ensayo (minutos) por definición de unidad.

8= Coeficiente de extinción molar.

0.1 = Volumen de enzima usada (en mililitros).

$$\text{Unidades/mL solido} = \frac{U/\text{mL enzima}}{\text{mg solido/mL enzima}}$$

$$\text{Unidades/mg proteina} = \frac{U/\text{mL enzima}}{\text{mg proteina/mL enzima}}$$

**Definición unidad:** Una unidad formará 1.0  $\mu\text{mol}$  de formaldehído a partir de sarcosina por minuto (pH 8.3 T=37°C)

**Concentración final de ensayo:** En 0.50 ml de mezcla de reacción, la concentración finales 60mM glicilglicina, 120mM sarcosina, y 0.05-0.10 unidades de sarcosina oxidasa.



### ***7.9.1 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano con respecto al efecto del Sustrato.***

De cada ensayo de cada metabolito se realizaron 3 pruebas por triplicado para cada valor de cada concentración, y para cada procedimiento se usaron como base los métodos anteriormente explicados en la sección 7.11 y se optaron por algunas modificaciones, además, cada prueba se realizó en tres formatos diferentes, uno con enzima libre, otro con inmovilización con macroesferas de quitosano y el último con inmovilización con nanoesferas de quitosano siguiendo el procedimiento de inmovilización de enzimas expuesto en la sección 7.10, para:

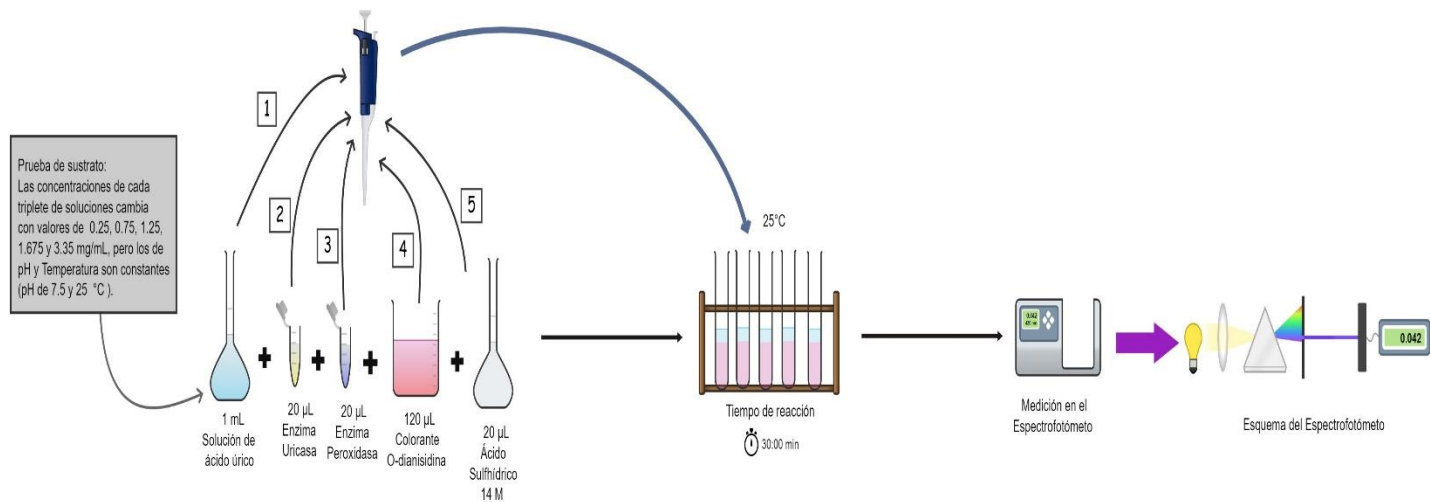
▲ **Ácido úrico (Uricasa o Xantina Oxidasa):**

1. Primero se realizaron cinco soluciones de ácido úrico con buffer fosfato de pH de 7.5, con concentraciones de 0.25, 0.75, 1.25, **1.675** y 3.35 mg/mL cada una (estos valores se determinaron tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico como biomarcador de preeclampsia que es 6.7 mg/dL o 0.067 mg/mL).
2. Después se realizó la solución del colorante O-Dianisidina (50 g con 5 mL de buffer fosfato de pH de 7.5).
3. Posteriormente, se hizo una solución de ácido sulfhídrico 14M.
4. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada valor de sustrato a evaluar (en esta prueba lo que se mide son los valores de las concentraciones (sustrato), siendo lo único que cambia y las otras dos variables (valores de pH (7.5) y temperatura (25 °C) son constantes), dichas soluciones constan de:

- ★ 1 mL de la solución de ácido úrico para cada valor de sustrato.

- ✦ 20  $\mu\text{L}$  de cada enzima (uricasa y peroxidasa).
- ✦ 120  $\mu\text{L}$  del colorante O-Dianisidina.
- ✦ 20  $\mu\text{L}$  de ácido sulfhídrico (para cortar la reacción).

Después, a cada triplete de soluciones se les deja reaccionar por 30 min. Terminado el procedimiento, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.



**Fig. 17.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática del ácido úrico con respecto al sustrato.**

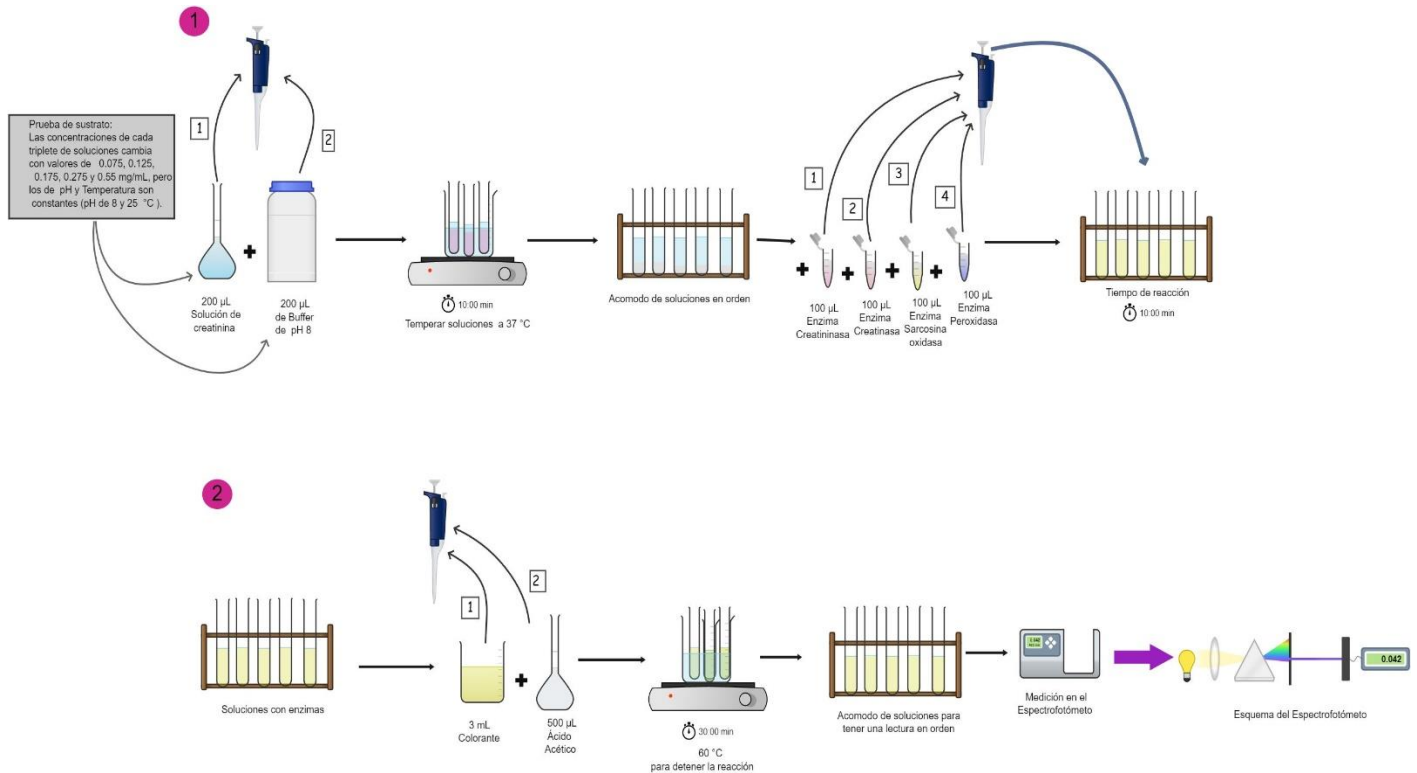
✦ **Creatinina (Reacción en cadena de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa):**

Para obtener los resultados de creatinina se tiene que realizar la reacción en cadena de las enzimas de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa, por lo que se evaluaron las tres juntas, sin embargo en este trabajo de tesis también se realizaron pruebas de creatina y sarcosina que son los subproductos de la reacción principal para realizar una comparativa.



1. Primero se realizaron cinco soluciones de creatinina con buffer fosfato de pH de 8, con concentraciones de 0.075, 0.125, 0.175, **0.275** y 0.55 mg/mL cada una (estos valores se determinaron tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de creatinina como biomarcador de preeclampsia que es 0.11 mg/mL).
2. Después se realizó la solución del colorante mezclando acetato de amonio 2M (solución de 15.4164 g y 100 mL de agua ultrapura), con 140 mL de Isopropanol y 0.525 mL de acetilacetona).
3. Posteriormente, se hizo una solución de ácido acético 500 mM (1.5013 g en 50 mL de agua ultrapura).
4. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada concentración (en esta prueba lo que se evalúa, son los valores de las concentraciones (sustrato), siendo lo único que cambia y las otras dos variables (valores de pH (8) y temperatura (25 °C) son constantes), dichas soluciones se realizan por medio de los siguientes pasos:
  1. Agregar 200  $\mu$ L de buffer fosfato de pH de 8 y 200  $\mu$ L de la solución de creatinina para después temperarlas a 37 °C (que es la temperatura óptima de la creatinina para que favorezca a la reacción).
  2. Después a las soluciones anteriores se le agregan 100  $\mu$ L de cada enzima (creatininasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa) y se dejan reaccionar por 10 min.
  3. Por último, se agregan 500  $\mu$ L de ácido acético y 3 mL del colorante a cada triplete de soluciones para cortar la reacción y se colocan a 60°C por 30 minutos.

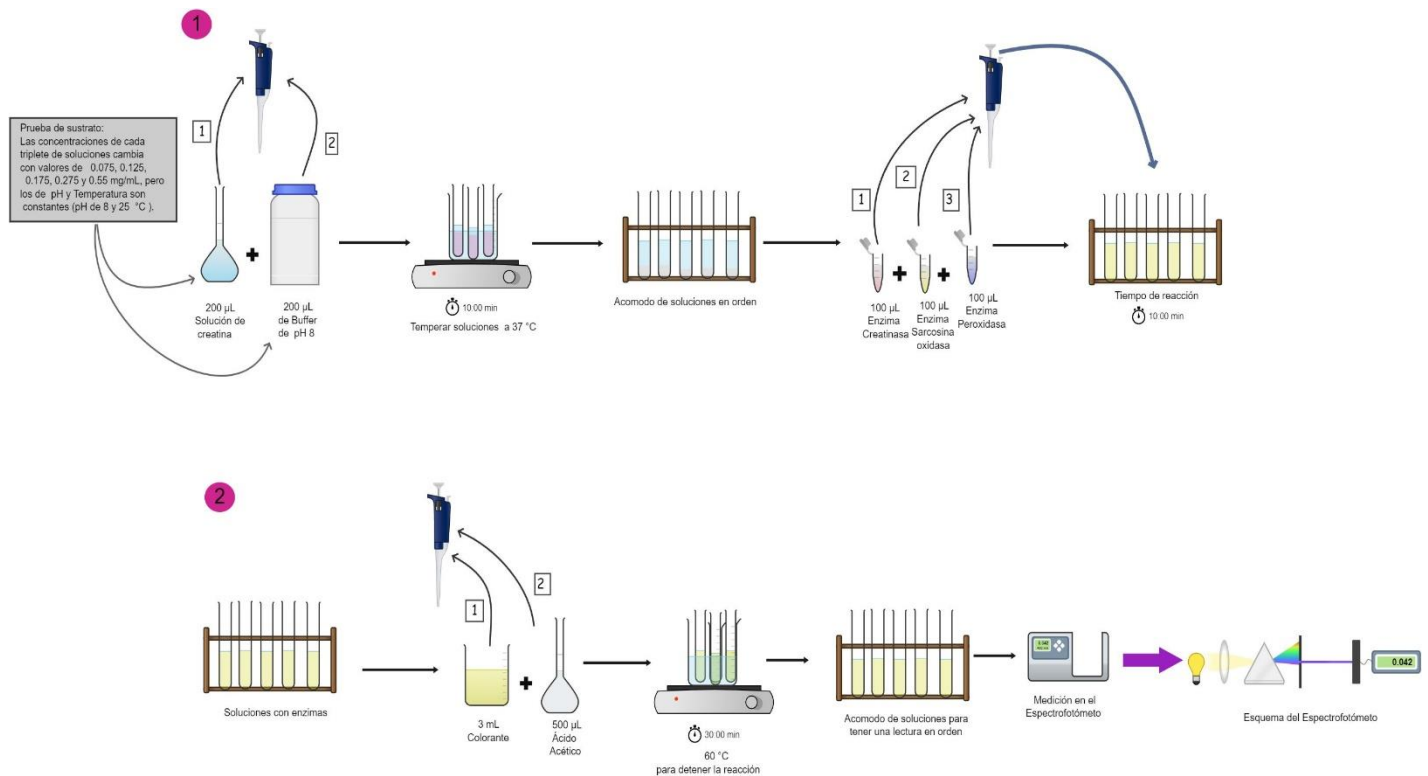
4. Terminadas las soluciones, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.



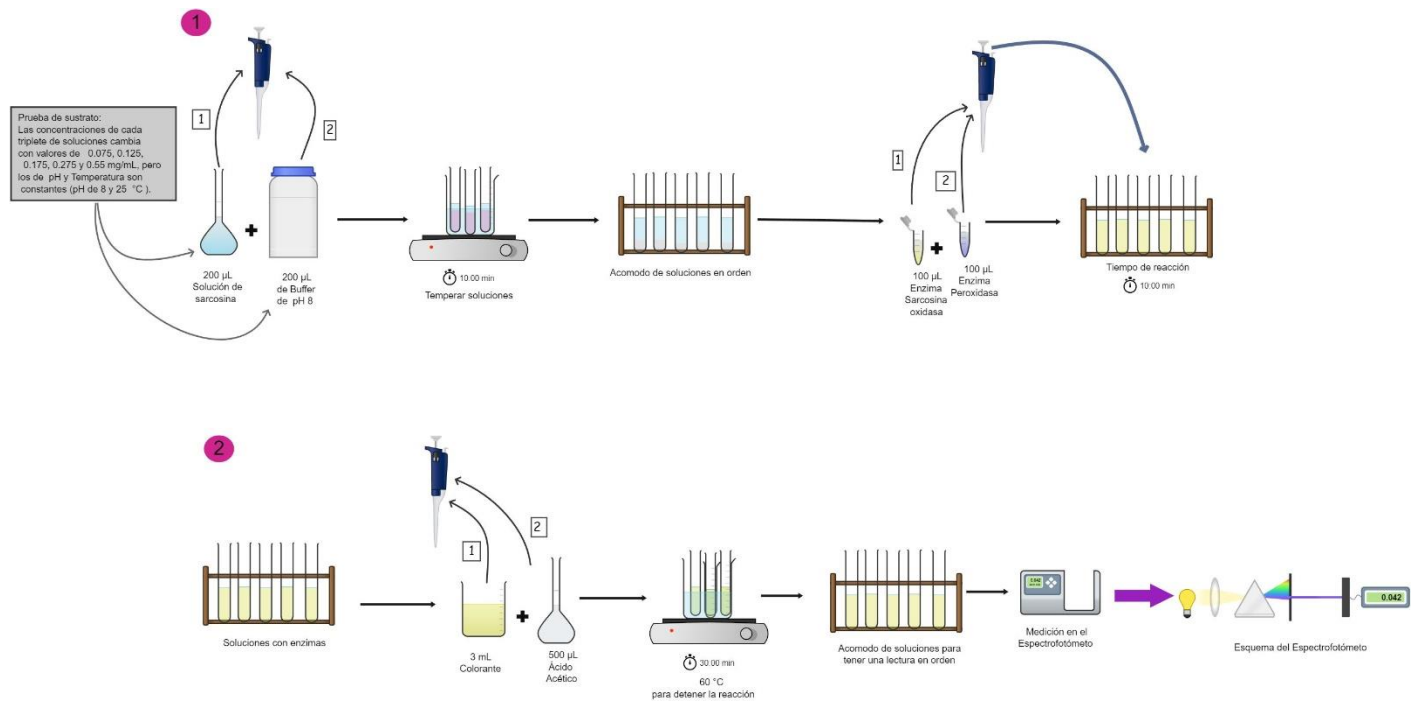
**Fig. 18.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de creatinina con respecto al sustrato.**

- ▲ Creatina (producto-segunda reacción de la cadena con enzimas de Creatinasa y Sarcosina Oxidasa) y Sarcosina (producto-tercera reacción de la cadena con la enzima Sarcosina Oxidasa):

También, se llevaron a cabo las pruebas de actividad enzimática de la creatina y sarcosina individualmente, siguiendo los mismos pasos anteriormente explicados en la sección de creatinina, omitiendo simplemente los reactivos de las reacciones anteriores según la cadena de la reacción para cada caso.



**Fig. 19.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de creatina con respecto al sustrato.**



**Fig. 20.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de sarcosina con respecto al sustrato.**

### 7.9.2 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano con respecto al efecto del pH.

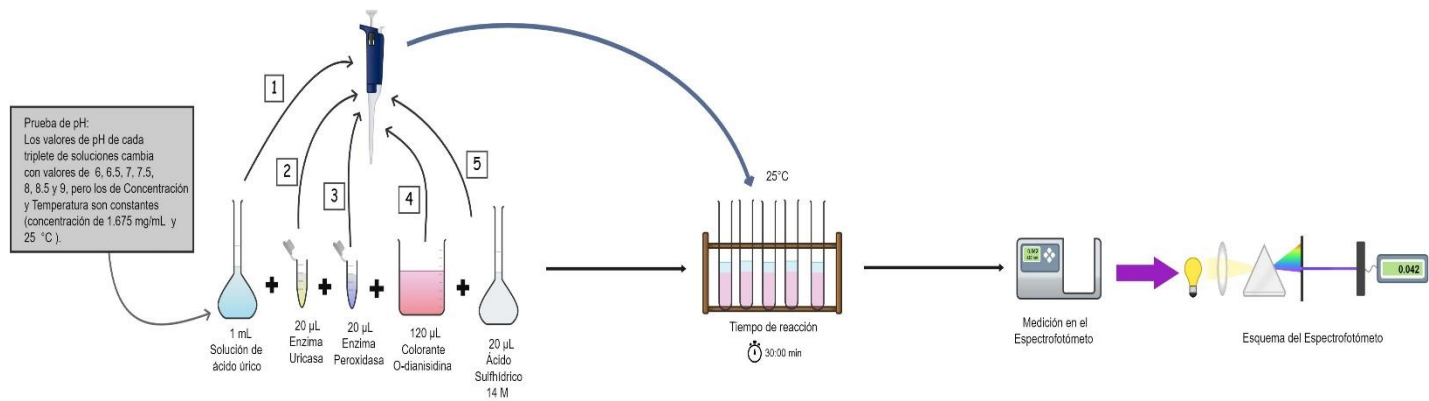
De cada ensayo de cada metabolito se realizaron 3 pruebas por triplicado para cada valor de pH, para cada procedimiento se usaron como base los métodos anteriormente explicados en la sección 7.11 y se optaron por algunas modificaciones, además, cada prueba se realizó en tres formatos diferentes, uno con enzima libre, otro con inmovilización con macroesferas de quitosano y el último con inmovilización con nanoesferas de quitosano siguiendo el procedimiento de inmovilización de enzimas expuesto en la sección 7.10, para:



✦ Ácido úrico (Uricasa o Xantina Oxidasa):

1. Primero se realizaron 7 soluciones de ácido úrico con siete diferentes valores de pH, cada solución tenía una concentración de **1.675 mg/mL** de ácido úrico (este valor se determinó tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico como biomarcador de preeclampsia que es 6.7 mg/dL o 0.067 mg/mL) con buffer fosfato de pH de 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9 cada una.
2. Después se realizó la solución del colorante O-Dianisidina (50 g con 5 mL de buffer fosfato de pH de 7.5).
3. Posteriormente, se hizo una solución de ácido sulfhídrico 14M.
4. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada valor de pH a evaluar (en esta prueba lo que se evalúa, son los valores del pH, siendo esto lo único que cambia y las otras dos variables (valores de concentración (1.675 mg/mL) y temperatura (25 °C) son constantes), dichas soluciones constan de:
  - ✦ 1 mL de la solución de ácido úrico para cada valor de pH.
  - ✦ 20  $\mu$ L de cada enzima (uricasa y peroxidasa).
  - ✦ 120  $\mu$ L del colorante O-Dianisidina.
  - ✦ 20  $\mu$ L de ácido sulfhídrico (para cortar la reacción).

Después, a cada triplete de soluciones se les deja reaccionar por 30 min. Terminado el procedimiento, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.



**Fig. 21.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática del ácido úrico con respecto al pH.**

✦ Creatinina (Reacción en cadena de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa):

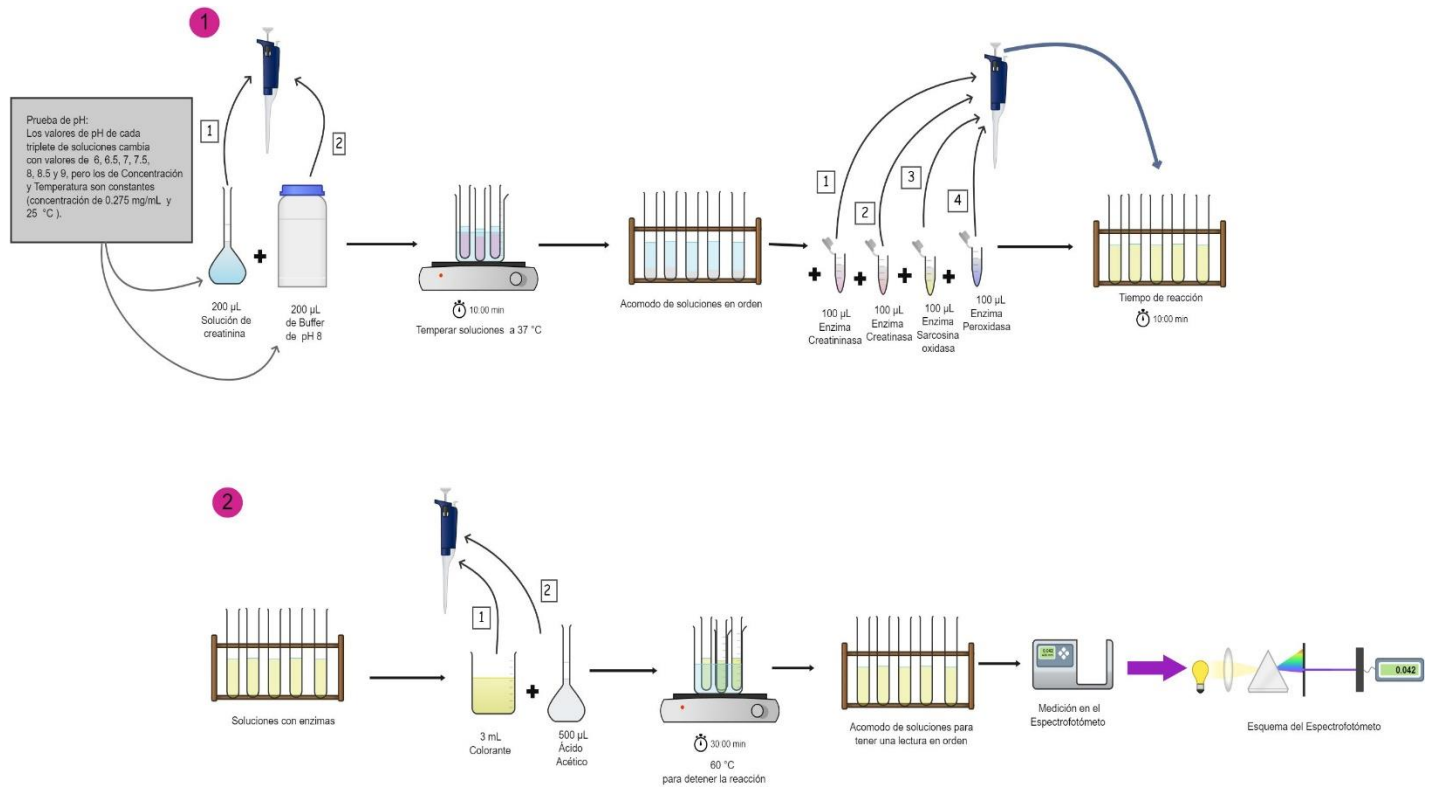
Para obtener los resultados de creatinina se tiene que realizar la reacción en cadena de las enzimas de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa, por lo que se evaluaron las tres juntas, sin embargo en este trabajo de tesis también se realizaron pruebas de creatina y sarcosina que son los subproductos de la reacción principal para realizar una comparativa.

1. Primero se realizaron 7 soluciones de creatinina con siete diferentes valores de pH, cada solución tenía una concentración de **0.275** mg/mL de creatinina (este valor se determinó tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de creatinina como biomarcador de preeclampsia que es 0.11 mg/mL) con buffer fosfato de pH de 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9 cada una.
2. Después se realizó la solución del colorante mezclando acetato de amonio 2M (solución de 15.4164 g y 100 mL de agua ultrapura), con 140 mL de isopropanol y



0.525 mL de acetilacetona).

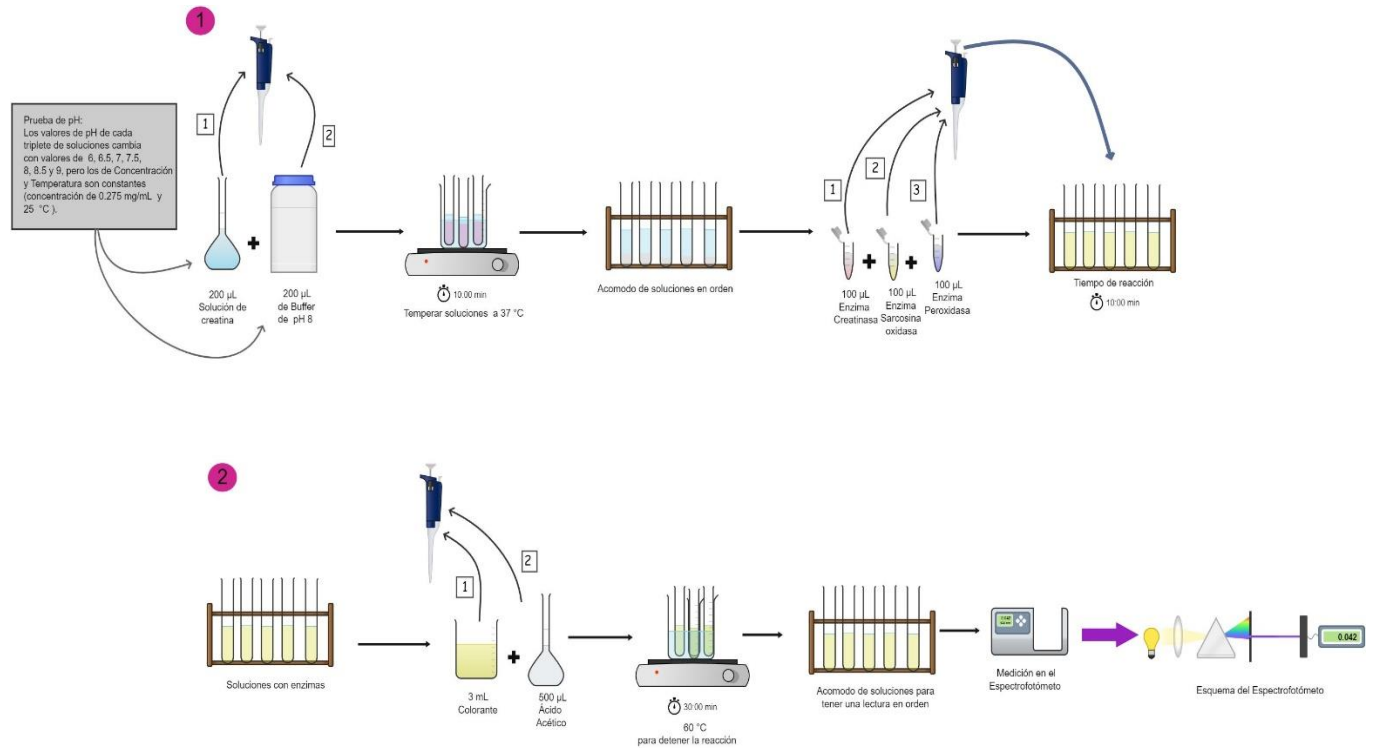
3. Posteriormente, se hizo una solución de ácido acético 500 mM (1.5013 g en 50 mL de agua ultrapura).
4. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada valor de pH a evaluar (en esta prueba lo que se evalúa, que en este caso son los valores del pH, es lo único que cambia y las otras dos variables (valores de concentración (1.675 mg/mL) y temperatura (25 °C) son constantes), dichas soluciones constan de:
  1. Agregar 200  $\mu$ L de buffer fosfato de pH de 8 y 200  $\mu$ L de la solución de creatinina para después temperarlas a 37 °C (que es la temperatura óptima de la creatinina para que favorezca a la reacción).
  2. Después a las soluciones anteriores se le agregan 100  $\mu$ L de cada enzima (creatininasa, Creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa) y se dejan reaccionar por 10 min.
  3. Por último, se agregan 500  $\mu$ L de ácido acético y 3 mL del colorante a cada triplete de soluciones para cortar la reacción y se colocan a 60°C por 30 minutos.
  4. Terminadas las soluciones, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.



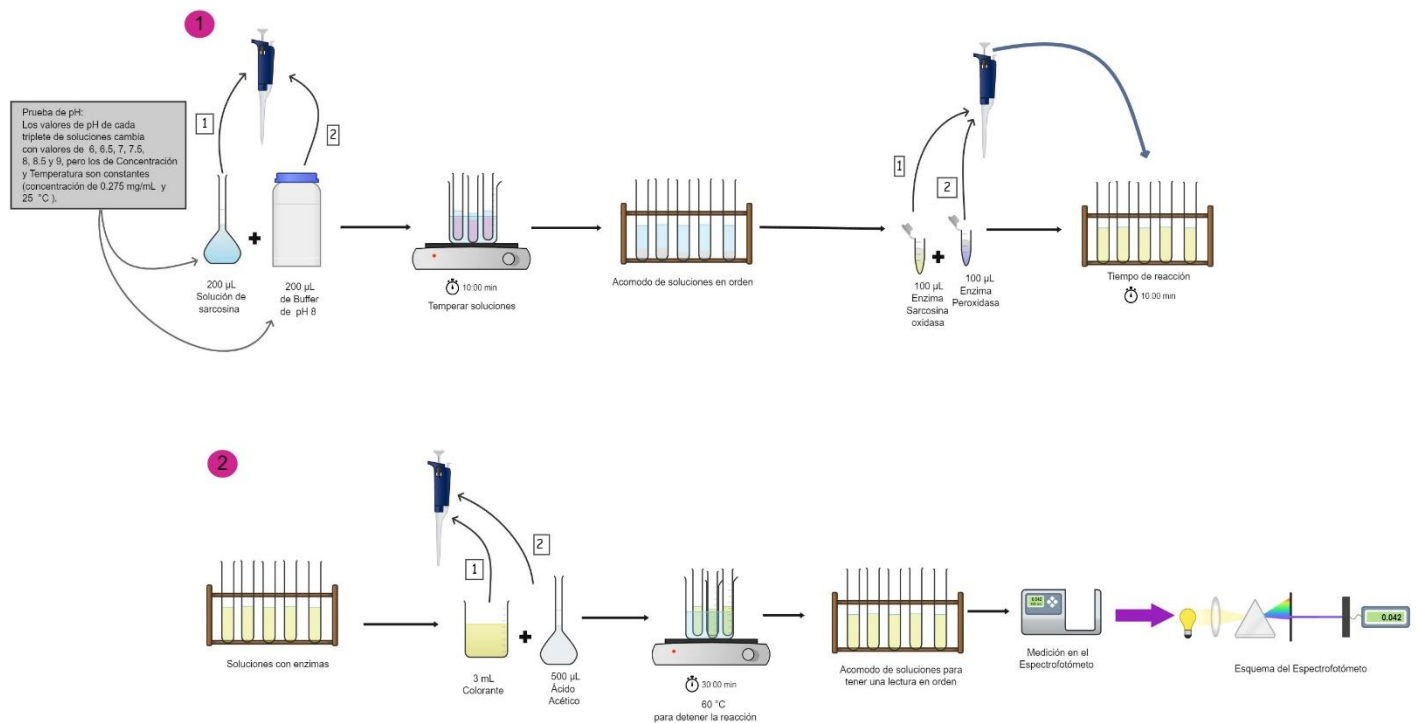
**Fig. 22.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de creatinina con respecto al pH.**

- Creatina (producto-segunda reacción de la cadena con enzimas de Creatinasa y Sarcosina Oxidasa) y Sarcosina (producto-tercera reacción de la cadena con la enzima Sarcosina Oxidasa):

También, se llevaron a cabo las pruebas de actividad enzimática de la creatina y sarcosina individualmente, siguiendo los mismos pasos anteriormente explicados en la sección de creatinina, omitiendo simplemente los reactivos de las reacciones anteriores según la cadena de la reacción para cada caso.



**Fig. 23.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de creatina con respecto al pH.**



**Fig. 24.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de sarcosina con respecto al pH.**

### 7.9.3 Actividad enzimática en las macroesferas y nanoesferas de quitosano con respecto al efecto de la Temperatura

De cada ensayo de cada metabolito se realizaron 3 pruebas por triplicado para cada valor de Temperatura, para cada procedimiento se usaron como base los métodos anteriormente explicados en la sección 7.11 y se optaron por algunas modificaciones, además, cada prueba se realizó en tres formatos diferentes, uno con enzima libre, otro con inmovilización con macroesferas de quitosano y el último con inmovilización con nanoesferas de quitosano siguiendo el procedimiento de inmovilización de enzimas expuesto en la sección 7.10, para:

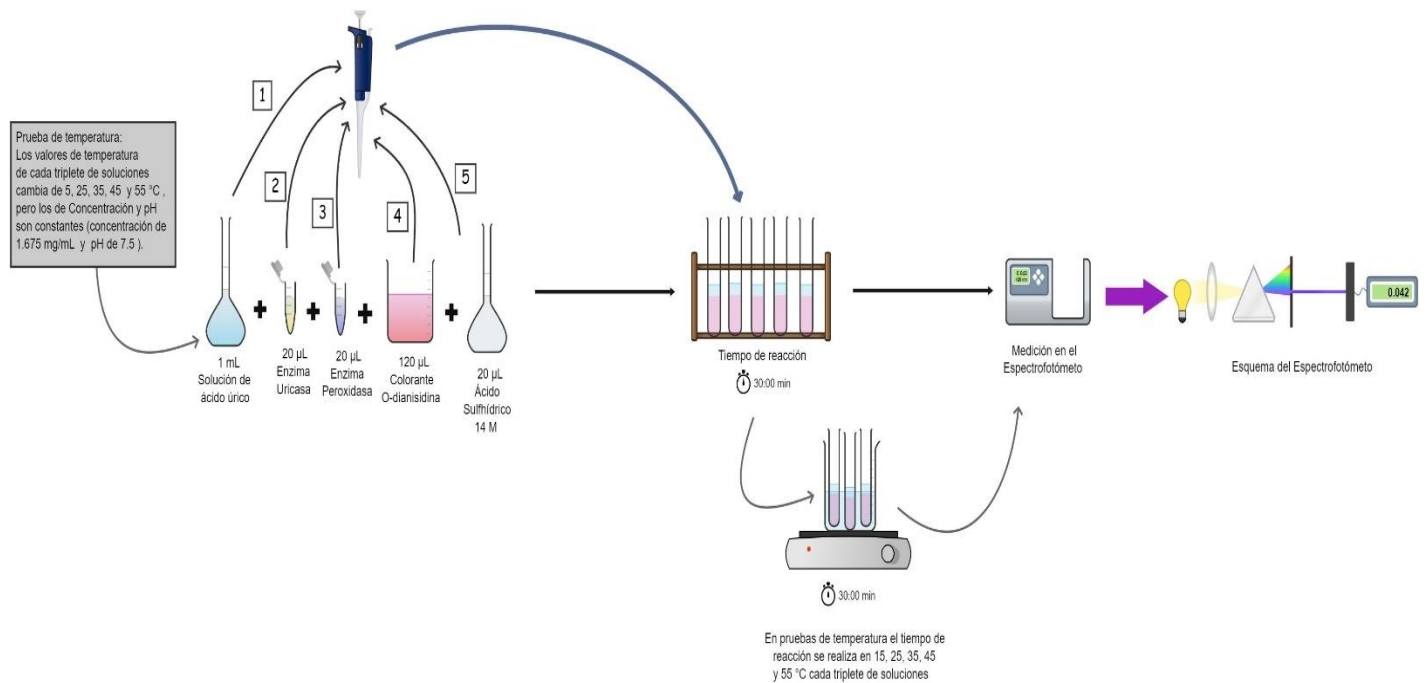


▲ Ácido úrico (Uricasa o Xantina Oxidasa):

1. Primero se realizaron 5 soluciones de ácido úrico con cinco diferentes valores de temperatura, con buffer fosfato de pH 7.5 y con una concentración de **1.675** mg/mL de ácido úrico (este valor se determinó tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico como biomarcador de preeclampsia que es 6.7 mg/dL o 0.067 mg/mL), cada solución fue sometida a diferentes variaciones de temperatura de 15, 25, 35, 45 y 55 °C en todo el método para cada triplete.
2. Después se realizó la solución del colorante O-Dianisidina (50 g con 5 mL de buffer fosfato de pH de 7.5).
3. Posteriormente, se hizo una solución de ácido sulfhídrico 14M.
4. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada valor de temperatura a evaluar (en esta prueba lo que se evalúa, son los valores de temperatura, siendo esto lo único que cambia y las otras dos variables (valores de concentración (1.675 mg/mL) y pH (7.5) son constantes), dichas soluciones constan de:
  1. Agregar 1 mL de la solución de ácido úrico para cada valor de cada temperatura, para después temperarlas 15, 25, 35, 45 y 55 °C cada triplete cada valor de temperatura.
  2. Después a las soluciones anteriores se le agregan 20 µL de cada enzima (uricasa y peroxidasa) y se dejan reaccionar por 10 min a cada temperatura correspondiente.
  3. Por último, se agregan 20 µL de ácido sulfhídrico (para cortar la reacción) y 120

$\mu\text{L}$  del colorante O-Dianisidina a cada triplete de soluciones para cortar la reacción y se colocan todas las soluciones a  $60^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

- Terminadas las soluciones, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.



**Fig. 25.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática del ácido úrico con respecto a la Temperatura.**



▲ Creatinina (Reacción en cadena de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa):

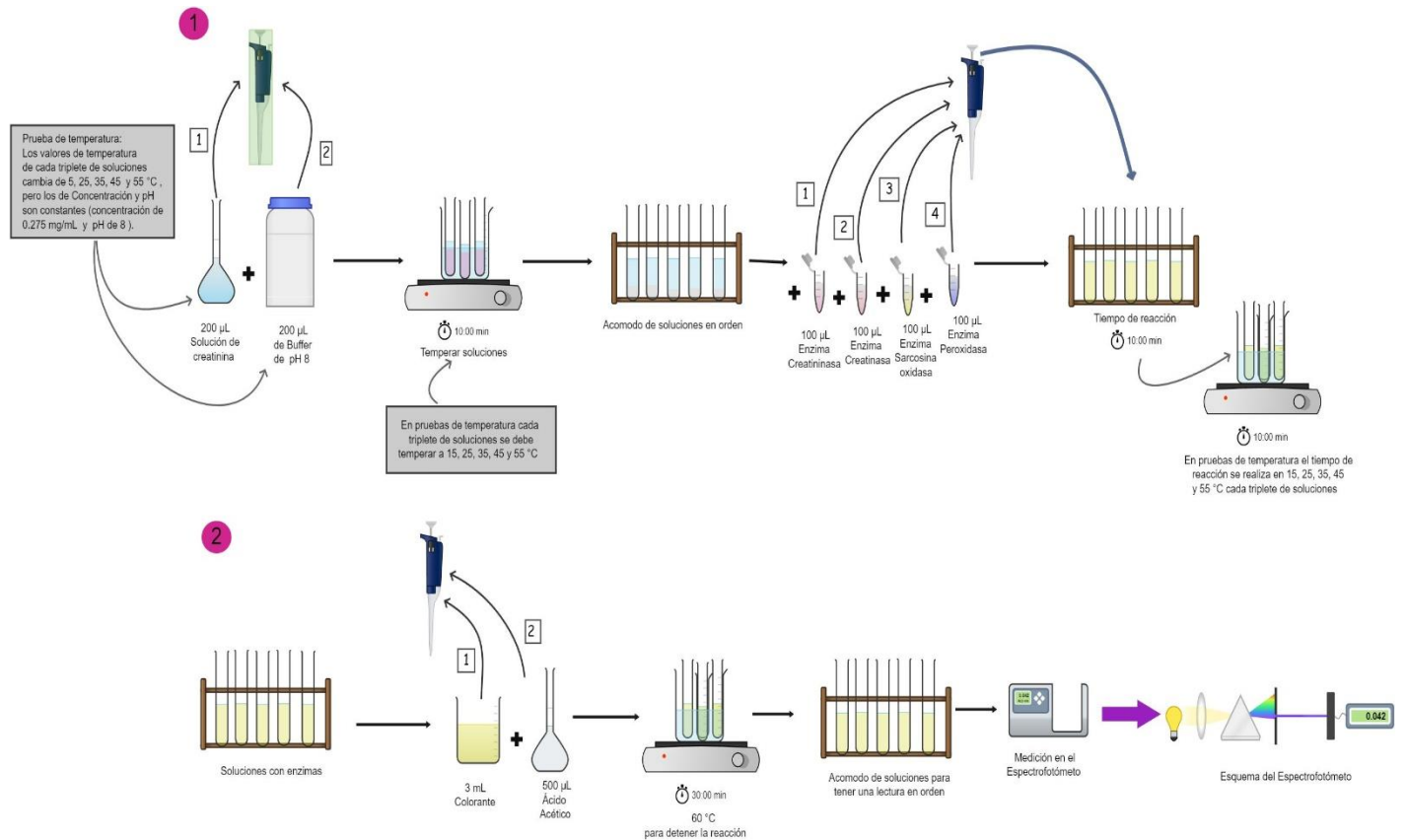
Para obtener los resultados de creatinina se tiene que realizar la reacción en cadena de las enzimas de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa, por lo que se evaluaron las tres juntas, sin embargo en este trabajo de tesis también se realizaron pruebas de creatina y sarcosina que son los subproductos de la reacción principal para realizar una comparativa.

1. Primero se realizaron 5 soluciones de creatinina con cinco diferentes valores de temperatura, con buffer fosfato de pH 8 y con una concentración de **0.275** mg/mL de creatinina (este valor se determinó tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico como biomarcador de preeclampsia que es 0.11 mg/mL), cada solución fue sometida a diferentes variaciones de temperatura de 15, 25, 35, 45 y 55 °C en todo el método para cada triplete.
2. Después se realizó la solución del colorante mezclando acetato de amonio 2M (solución de 15.4164 g y 100 mL de agua ultrapura), con 140 mL de isopropanol y 0.525 mL de acetilacetona).
3. Posteriormente, se hizo una solución de ácido acético 500 mM (1.5013 g en 50 mL de agua ultrapura).
4. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada valor de temperatura a evaluar (en esta prueba lo que se evalúa, son los valores de temperatura, siendo esto lo único que cambia y las otras dos variables (valores de concentración (0.275 mg/mL) y pH (8) son constantes), dichas soluciones constan de:
  1. Agregar 200  $\mu$ L de buffer fosfato de pH de 8 y 200  $\mu$ L de la solución de creatinina para cada valor de cada temperatura, para después temperarlas 15, 25, 35, 45 y 55



°C cada triplete cada valor de temperatura.

2. Después a las soluciones anteriores se le agregan 100  $\mu\text{L}$  de cada enzima (creatininasa, Creatinasa, sarcosina oxidasa y peroxidasa) y se dejan reaccionar por 10 min.
3. Por último, se agregan 500  $\mu\text{L}$  de ácido acético y 3 mL del colorante a cada triplete de soluciones para cortar la reacción y se colocan a 60°C por 30 minutos.
4. Terminadas las soluciones, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.

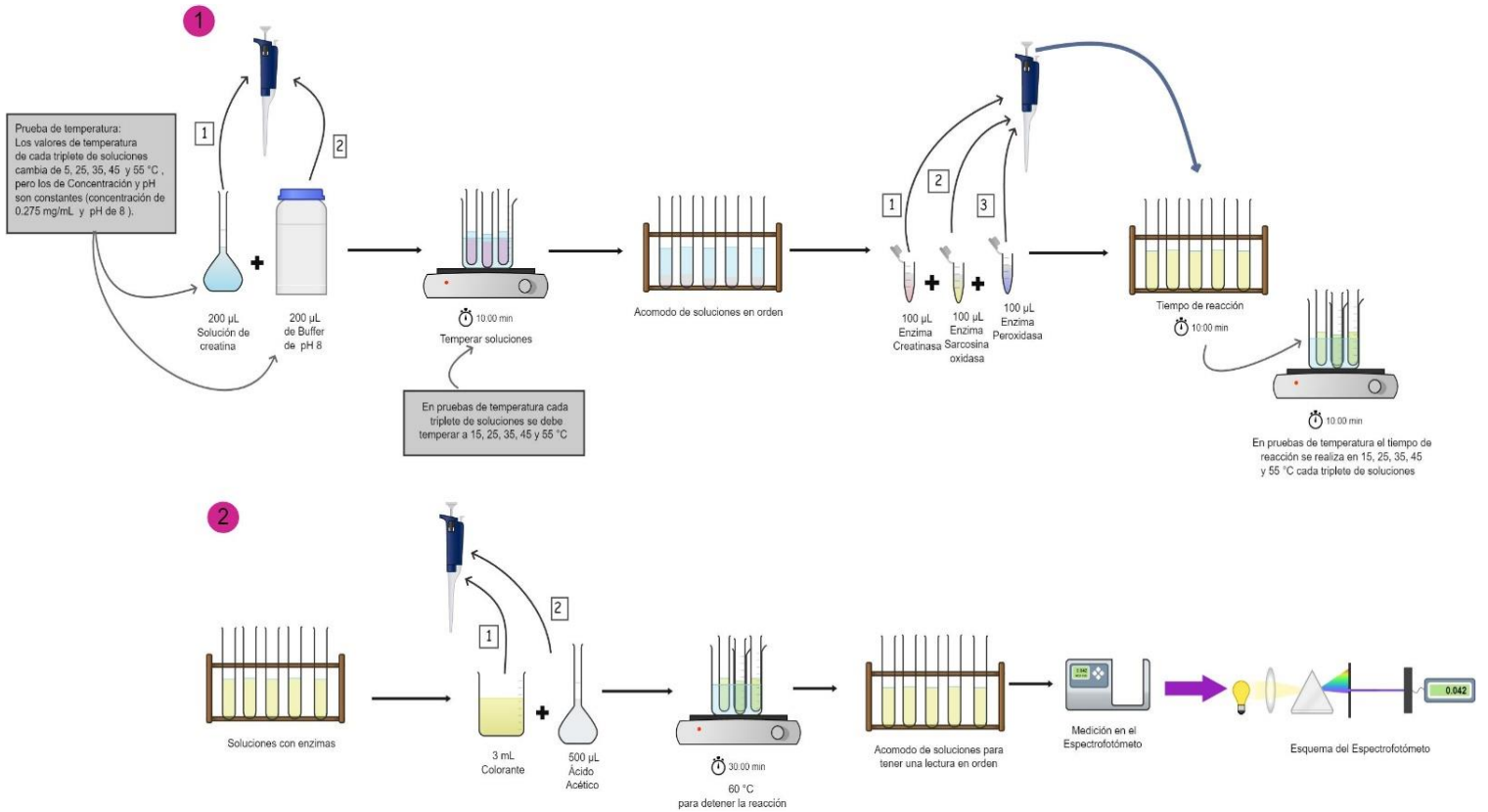


**Fig. 26.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de la creatinina con respecto a la Temperatura.**

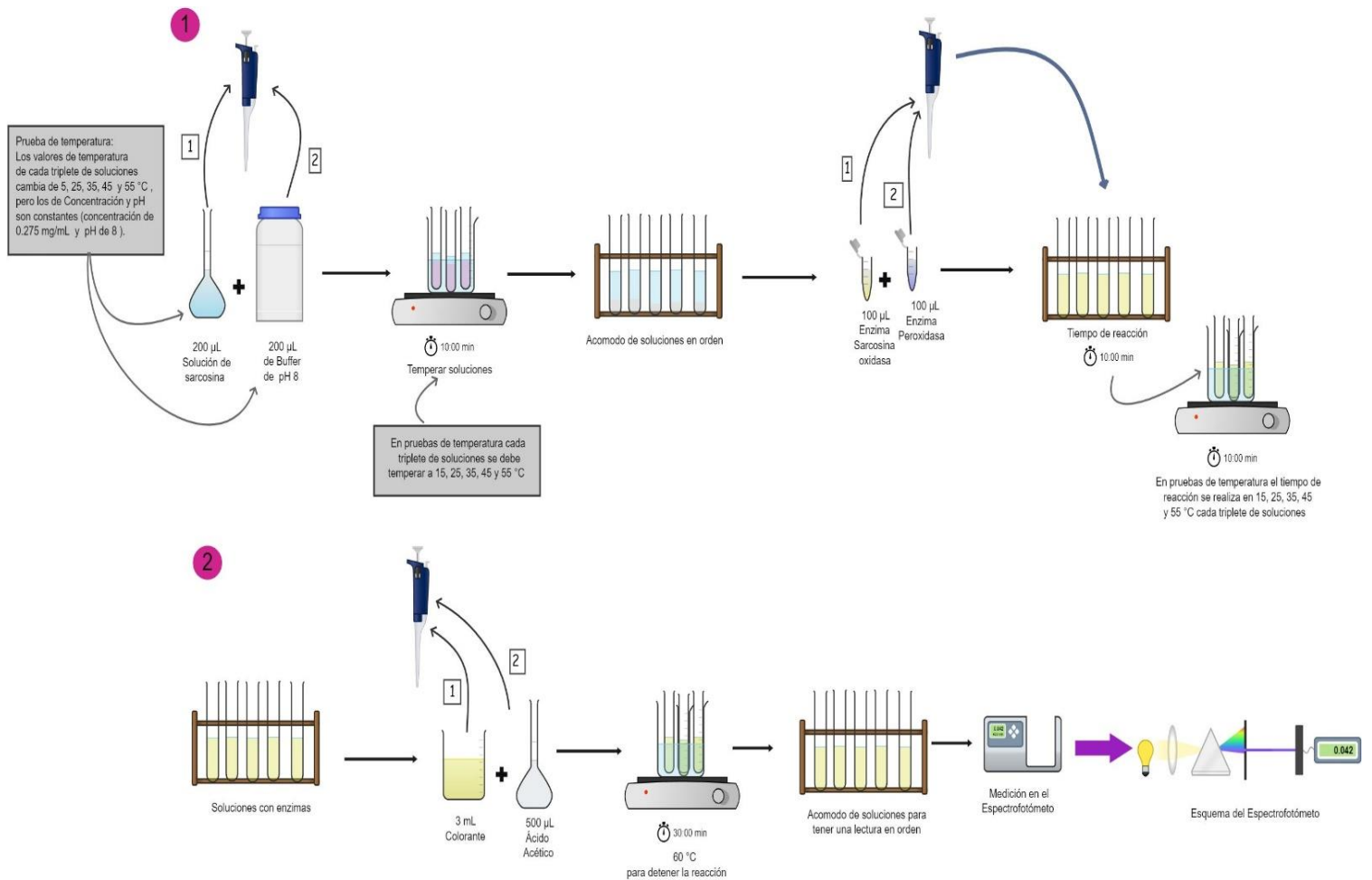
- Creatina (producto-segunda reacción de la cadena con enzimas de Creatinasa y Sarcosina Oxidasa) y Sarcosina (producto-tercera reacción de la cadena con la enzima Sarcosina Oxidasa):

También, se llevaron a cabo las pruebas de actividad enzimática de la creatina y sarcosina individualmente, siguiendo los mismos pasos anteriormente explicados en la sección de

creatinina, omitiendo simplemente los reactivos de las reacciones anteriores según la cadena de la reacción para cada caso.



**Fig. 27.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de la creatina con respecto a la Temperatura.**



**Fig. 28.- Procedimiento para las pruebas de actividad enzimática de la sarcosina con respecto a la Temperatura.**

### 7.10 Pruebas colorimétricas.

Según Nieves *et al.* (2017) y Dunez (2012), para poder estudiar a nivel bioquímico cualquier biomolécula es necesario el empleo de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica. Algunos de los



métodos más utilizados, sencillos, accesibles y útiles son las pruebas de color que se pueden llevar a cabo mediante técnicas y sus instrumentos de medición como lo son la espectroscopia, particularmente la espectroscopia ultravioleta-visible, y la colorimetría, donde la colorimetría utiliza longitudes de onda fijas, que están sólo en el rango visible, pero la espectrofotometría puede utilizar longitudes de onda en un rango más amplio (como el UV e IR).

Las diferencias entre un espectrofotómetro y un colorímetro, es que el primero mide la cantidad de luz que pasa a través de una muestra y calcula el color preciso en las longitudes de onda de la luz visible humana, mientras que el segundo cuantifica el color midiendo los tres componentes primarios de la luz (rojo, verde, azul). Por ejemplo mediante un espectrofotómetro se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras biológicas, con el empleo de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar y forman un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas, mientras que un colorímetro puede medir la absorbancia de la luz en una muestra (Nieves *et al.*, 2017 y Dunee, 2012).

A escala microscópica, la relación de la población de equilibrio en dos estados separados por una brecha de energía de  $\Delta E$  viene dada por la distribución de Boltzmann y las leyes de absorción, o en otros términos, las leyes de Beer y Lambert, indican hasta qué punto la intensidad del haz incidente se reduce por la absorción de la luz, por ello, por un lado tenemos que la ley de Lambert establece que el grado de absorción es proporcional al espesor de la muestra, mientras que la ley de Beer establece que el grado de absorción es proporcional a la concentración de la muestra, es decir, el principio detrás de la espectrofotometría y la colorimetría es el mismo (Dunee, 2012).

Debido a lo anterior se realizó la evaluación de cambios de color en las muestras por medio de inspección visual y del uso de dispositivos como un colorímetro que evalúa el modelo de color RGB y un espectrofotómetro UV-vis.



### ***7.10.1 Análisis colorimétrico cuantitativo por espectroscopia ultravioleta (UV-Vis).***

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que consiste en determinar la concentración de un compuesto en solución, esto ocurre debido a que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas, por lo que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para poder lograr dicha medición se hace uso de un espectrofotómetro, en el cual se puede elegir la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y calcular la cantidad de luz absorbida por la misma (Nieves et al., 2017).

Por lo que, para obtener de forma cuantitativa las concentraciones elementales de las soluciones de ácido úrico y creatinina se realizaron pruebas en el espectrofotómetro para corroborar los cambios de color experimentados por las diferentes concentraciones de los analitos. Las pruebas consistieron en la mezcla de una solución del metabolito con un colorante y con las enzimas que hacen posible que se produzca un cambio colorimétrico.

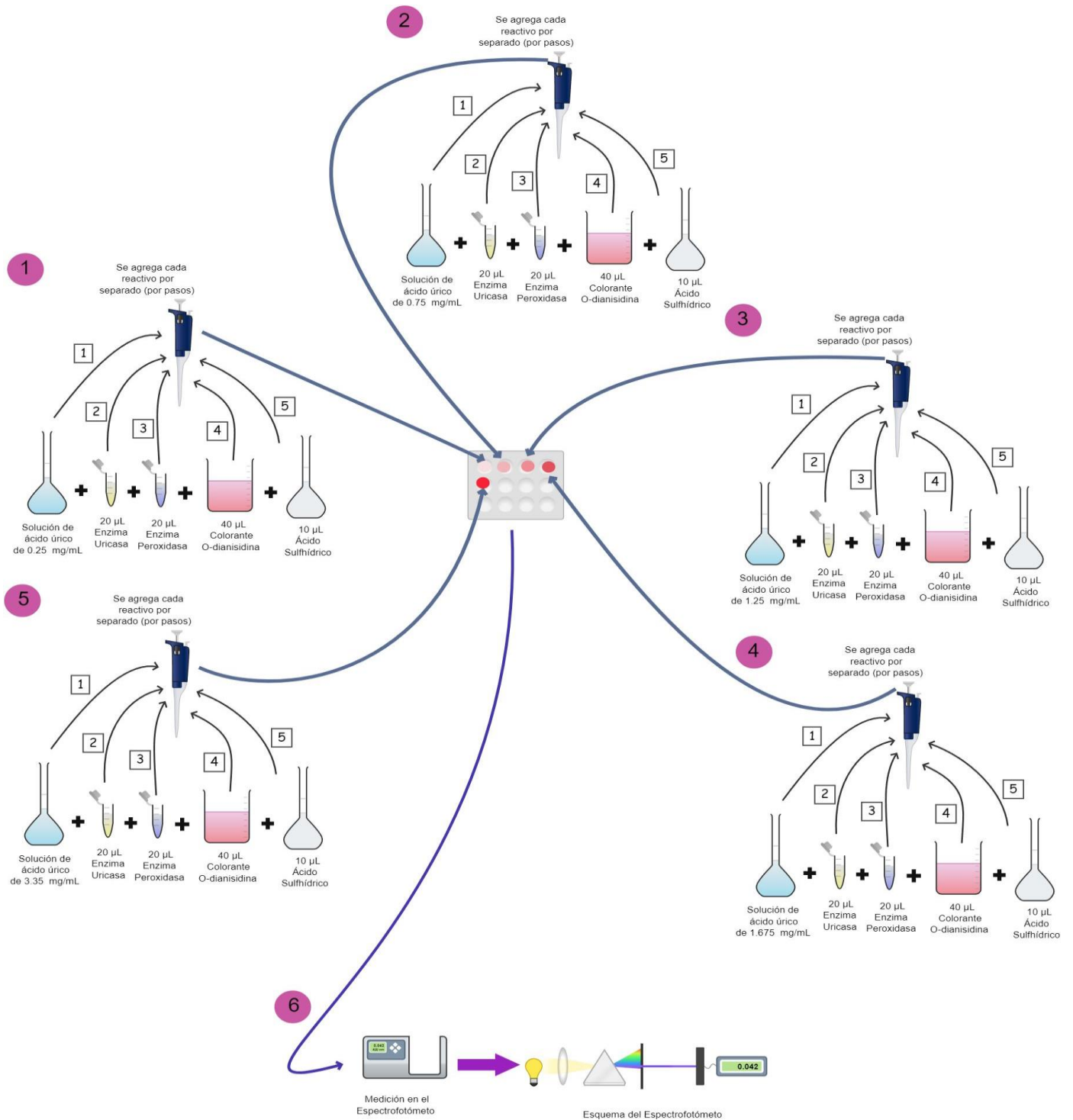
También, dicha concentración del analito se monitorea por inspección visual (presencia de cambio de color), así como por espectroscopia de ultravioleta (UV-Vis), identificando el número de señales e intensidad de las mismas de la absorbancia y longitud de onda que se obtendrá (Koh *et al.*, 2016).

De cada ensayo de cada metabolito se realizaron 3 pruebas por triplicado para cada valor de cada concentración, para cada procedimiento se usaron como base los métodos anteriormente explicados en la sección 7.11 y se optaron por algunas modificaciones, además, cada prueba se realizó en tres formatos diferentes, uno con enzima libre, otro con inmovilización con macroesferas de quitosano y el último con inmovilización con nanoesferas de quitosano siguiendo el procedimiento de inmovilización de enzimas expuesto en la sección 7.10, para:



▲ Ácido úrico (Uricasa o Xantina Oxidasa):

1. Primero se realizaron cinco soluciones de ácido úrico con buffer fosfato de pH de 7.5, con concentraciones de 0.25, 0.75, 1.25, 1.675 y 3.35 mg/mL cada una (estos valores se determinaron tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico como biomarcador de preeclampsia que es 6.7 mg/dL o 0.067 mg/mL).
2. Después se realizó la solución del colorante O-Dianisidina (50 g con 5 mL de buffer fosfato de pH de 7.5) y una solución de ácido sulfhídrico 14M.
3. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada valor de concentración a evaluar, dichas soluciones constan de:
  - ★ 1.5 mL de solución de ácido úrico.
  - ★ 20  $\mu$ L de la enzima uricasa (la mezcla de ácido úrico y uricasa produce una reacción que da como producto peróxido de hidrógeno).
  - ★ 20  $\mu$ L de la enzima peroxidasa.
  - ★ 40  $\mu$ L de colorante O-Dianisidina (50 g con 5 mL de buffer fosfato de pH de 7.5) (la mezcla del peróxido de hidrógeno obtenido anteriormente durante la reacción con el colorante y la enzima peroxidasa produce el cambio colorimétrico).
  - ★ 10  $\mu$ L de ácido sulfhídrico (y el agregar al último al ácido sulfhídrico provoca que se detenga la reacción).
4. Terminadas las soluciones, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.



**Fig. 29.- Procedimiento para las pruebas de color del ácido úrico.**



✦ **Creatinina (Reacción en cadena de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa):**

Para obtener los resultados de creatinina se tiene que realizar la reacción en cadena de las enzimas de Creatininasa, Creatinasa y Sarcosina Oxidasa, por lo que se evaluaron las tres juntas, sin embargo en este trabajo de tesis también se realizaron pruebas de creatina y sarcosina que son los subproductos de la reacción principal para realizar una comparativa.

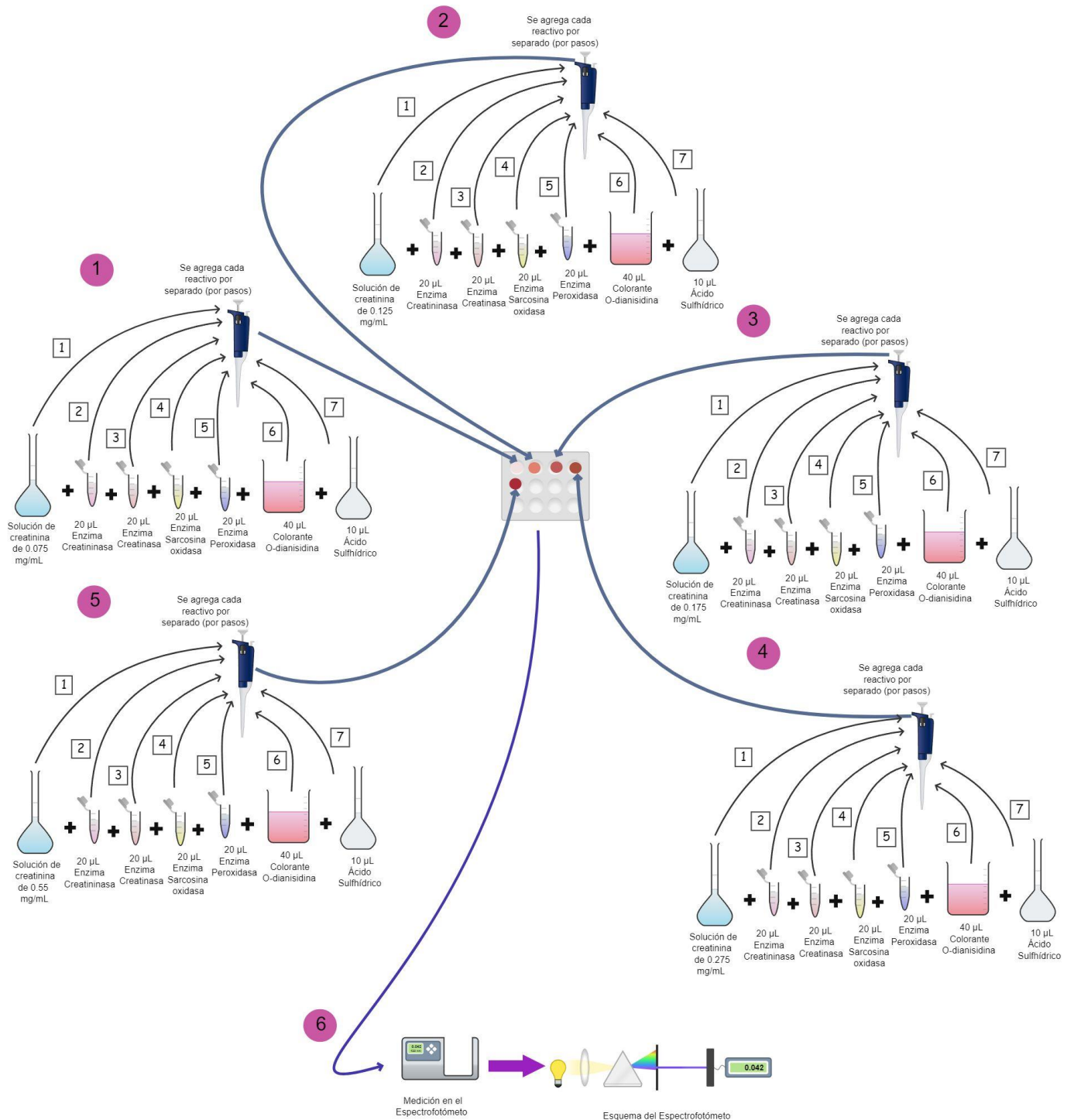
1. Primero se realizaron cinco soluciones de creatinina con buffer fosfato de pH de 8, con concentraciones de 0.075, 0.125, 0.175, **0.275** y 0.55 mg/mL cada una (estos valores se determinaron tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de creatinina como biomarcador de preeclampsia que es 0.11 mg/mL).
2. Después se realizó la solución del colorante O-Dianisidina (50 g con 5 mL de buffer fosfato de pH de 7.5).
3. Posteriormente, se hizo una solución de ácido sulfhídrico 14M.
4. Finalmente se hicieron tres soluciones iguales en tubos de ensayo para cada valor de concentración a evaluar, dichas soluciones constan de:
  - ✦ 1.5 mL para cada solución de creatinina.
  - ✦ 20  $\mu$ L de la enzima creatininasa (la mezcla de creatinina y creatininasa produce una reacción que da como producto creatina).
  - ✦ 20  $\mu$ L de la enzima creatinasa (la mezcla de creatina y creatinasa produce una reacción que da como producto sarcosina).
  - ✦ 20  $\mu$ L de la enzima sarcosina oxidasa (la mezcla de sarcosina y la enzima sarcosina oxidasa produce una reacción que da como producto peróxido de hidrógeno).
  - ✦ 40  $\mu$ L de colorante O-Dianisidina (50 g con 5 mL de buffer fosfato de pH de 7.5) (la mezcla del peróxido de hidrógeno obtenido anteriormente durante la reacción



con el colorante y la enzima peroxidasa produce el cambio colorimétrico)

★ 10  $\mu$ L de ácido sulfhídrico (y el agregar al último al ácido sulfhídrico provoca que se detenga la reacción)

5. Terminadas las soluciones, cada grupo de tres se procede a medir en el espectrofotómetro, primero se hace una medición con enzima libre, después otra con enzima inmovilizada con macroesferas de quitosano y una última medición con enzima inmovilizada con nanoesferas de quitosano.

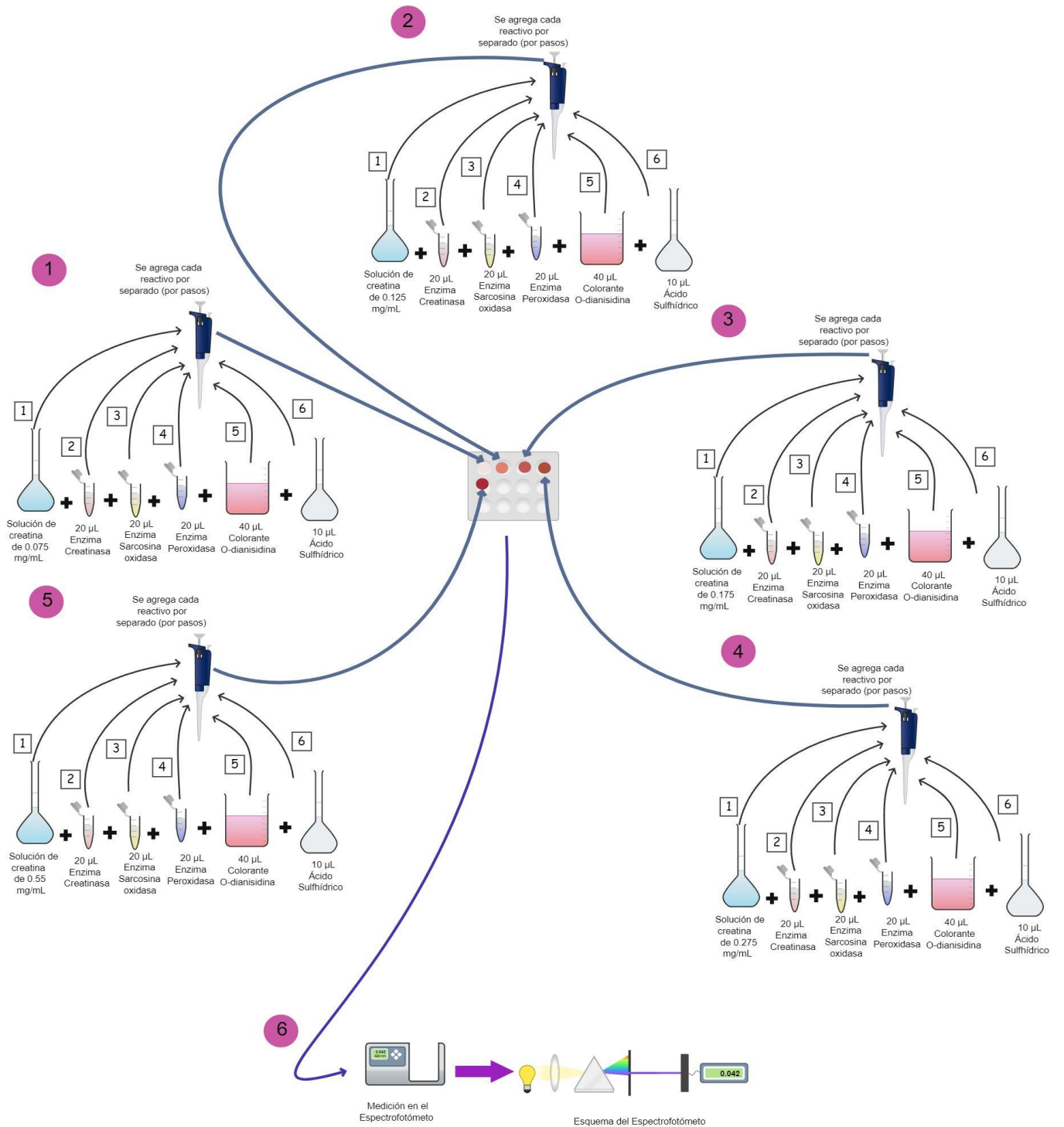


**Fig. 30.- Procedimiento para las pruebas de color del creatinina.**

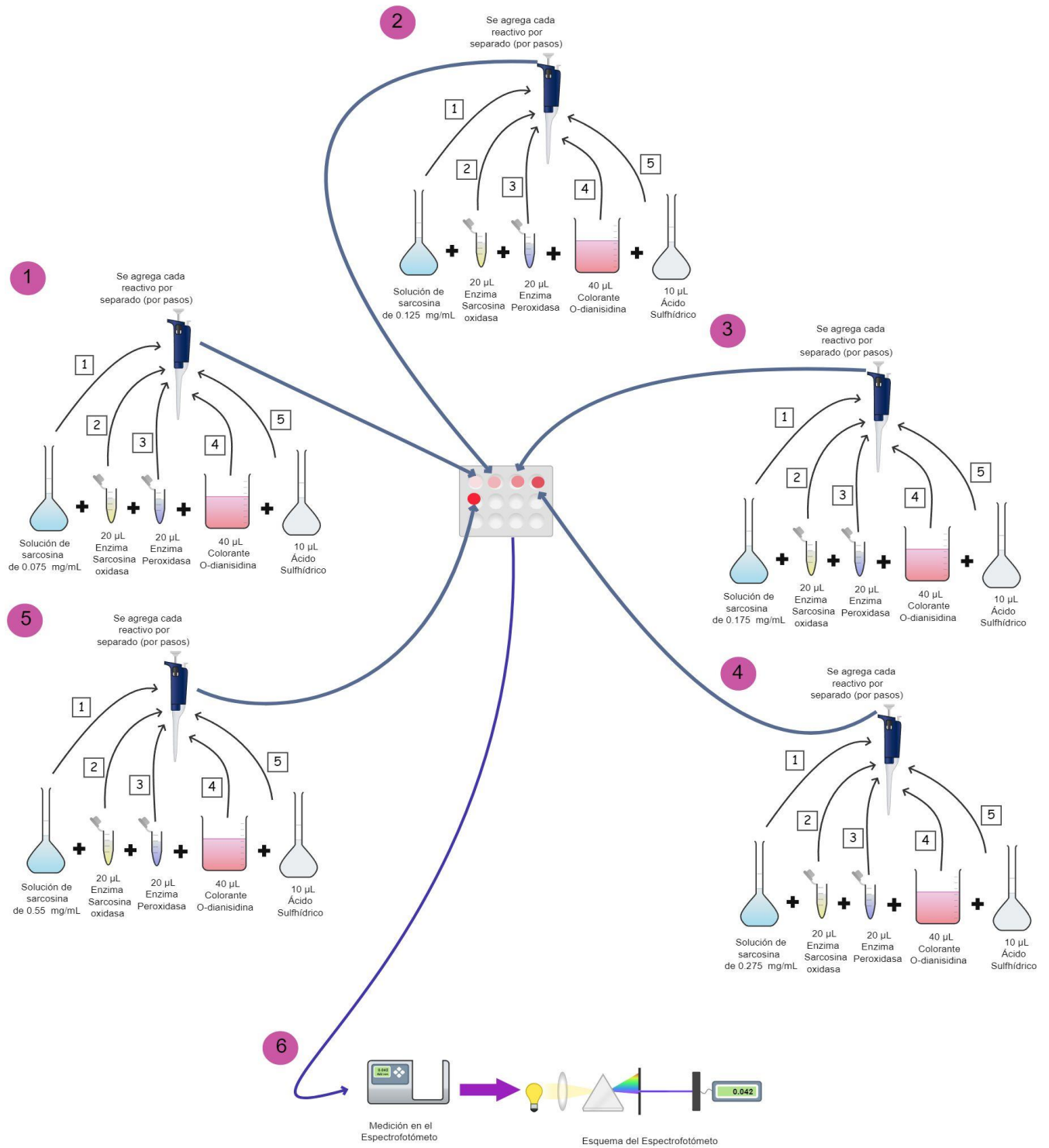


- ✦ Creatina (producto-segunda reacción de la cadena con enzimas de Creatinasa y Sarcosina Oxidasa) y Sarcosina (producto-tercera reacción de la cadena con la enzima Sarcosina Oxidasa):

También, se llevaron a cabo las pruebas de color de la creatina y sarcosina individualmente, siguiendo los mismos pasos anteriormente explicados en la sección de creatinina, omitiendo simplemente los reactivos de las reacciones anteriores según la cadena de la reacción para cada caso.



**Fig. 31.- Procedimiento para las pruebas de color de creatina.**



**Fig. 32.- Procedimiento para las pruebas de color de sarcosina.**



### ***7.10.2 Análisis colorimétrico por medio de un colorímetro.***

Después de realizados y comprobados los cambios de color de forma cuantitativa en solución a través de la espectroscopia UV-vis, se realizaron pruebas de colorimetría directamente en papel y con las enzimas inmovilizadas en las macro y nanoesferas de quitosano previamente preparadas con ayuda de un dispositivo de colorímetro.

A partir de esto se obtienen los valores de un espacio de coordenadas tridimensional específico, con el cual cada punto medido obtenido está referido por un valor en el modelo de color del RGB (que es uno de los más usados), convirtiendo así la información de color en valores numéricos que pueden tratarse como información analítica (Fan Y. et al. 2021).

La metodología empleada para la realización de estas pruebas es la siguiente:

1. Se prepararon las soluciones de ácido úrico, creatinina, creatina y sarcosina a diferentes concentraciones cada una (seguir la metodología descrita en la sección 7.12.1 para cada analito).
2. Se preparó 50 ml de O-Dianisidina a 2mg/ml aforando con buffer de fosfatos pH 7.5.
3. Se prepararon las siguientes enzimas: 1 ml de peroxidasa, 1 mL de uricasa, 1 mL de creatininasa, 1 mL de creatinasa, 1 ml de sarcosina oxidasa a 1mg/ml con buffer de fosfatos pH 7.5.
4. Se cortaron círculos de papel pequeños de aproximadamente 1 cm de diámetro, a los cuales se les agrego un 1 g de quitosano, el cual se acomodó de forma homogénea y cuidando que cubriera toda la circunferencia.
5. A cada uno de estos círculos se le fue agregando:



- ★ 2 gotas de pipeta Pasteur de cada una de las concentraciones de analito (una concentración por círculo).
- ★ 100  $\mu\text{l}$  de cada enzima necesaria para cada reacción de analito.
- ★ 1 ml de O-Dianisidina

Después de agregar todos los reactivos, cada una de las muestras adquirió un color específico correspondiente a la reacción colorimétrica de cada analito, las cuales posteriormente, a través del uso de un colorímetro que obtiene los espacios de color RGB, se midieron y registraron a diferentes tiempos para posteriormente estudiarse en los resultados.

Para realizar la prueba con precisión del análisis colorimétrico en diversas condiciones de iluminación, los colores absolutos extraídos de las imágenes digitales de los ensayos colorimétricos dependerán de las condiciones de iluminación ambiental y las temperaturas de color asociadas: 2500 K (amanecer, atardecer), 4000 K (blanco neutro), 5500 K (luz del día), 7000 K (día nublado) y 9000 K (sombra bajo un cielo azul). Los 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 entre 2500 y 9000 K, así como en luz amarilla, luz blanca y luz solar (Choi *et al.*, 2019).

### **7.11 Evaluación de los metabolitos de interés por medio de colorimetría.**

Para la detección, medición y comprobación del analito por medio de colorimetría se necesitan realizar curvas de calibración para cada uno de acuerdo a los resultados obtenidos por medio de los patrones que se midieron en el espectrofotómetro en cada prueba de color, en este dispositivo se usó un blanco (el cual no contenía ningún analito) como referencia además de los reactivos a



analizar, así como que cada patrón de prueba se midió por triplicado.

“Para obtener una curva de calibrado de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a  $\lambda_{\max}$ . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de abscisas (eje de x) y los de concentración en el eje de ordenadas (eje de y). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables. La representación de Lambert-Beer,  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta” (Nieves et al., 2017 y Dunee, 2012).

#### ***7.11.1 Determinación de parámetros de desempeño.***

Según lo reportado por Reyes & Quiroa (2012), la fusión de las leyes empíricas de Beer y Lambert arroja la absorbancia total por un cuerpo, cuando interacciona con un haz monocromado, la primera describe la relación entre la concentración de la fase absorbente con la radiación, es decir, establece la absorción de la luz por una solución disuelta, mientras que la ley de Lambert explica la relación entre la absorción de la luz y el camino recorrido por ésta. Entonces, para poder realizar un análisis cualitativo de cualquier especie en solución, es necesario un método estadístico que obedezca la ley de Beer-Lambert, y esto se puede obtener mediante la determinación de la absorbancia en función de soluciones de concentración conocidas a través de la elaboración de una curva de calibración que las relacione de manera proporcional y linealmente, conociendo claro la longitud de onda de máxima absorbancia del analito.

Dicho método estadístico clásico es el de los Mínimos Cuadrados en los que se grafica la ordenada (la variable independiente (y), que son los datos obtenidos de la respuesta del



dispositivo) y la abscisa (la variable dependiente (x) que son las concentraciones o el tanto por ciento del analito), esperando obtener una gráfica que se aproxime a una línea recta, pero cuando ocurre el caso de que los valores no coinciden en una recta es a causa de errores aleatorios del proceso de medida; por lo tanto, se puede decir que el método de los mínimos cuadrados sirve para intentar ajustar la “mejor” línea recta que conecte los puntos.

La ecuación canónica de la recta se expresa matemáticamente como:  $Y = mx + b$

Y en el método de mínimos cuadrados estos valores se obtienen realizando las siguientes operaciones manuales:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad y, \quad b = \frac{n \sum x^2 \sum y - \sum x \sum xy}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Donde n, indica el número de datos y  $\sum$  las sumatorias correspondientes de los términos tabulados.

Y la viabilidad del método de curva de calibración queda establecida por el valor del cuadrado del Coeficiente de Correlación Lineal ( $r^2$ ), que debe ser superior a 0.998, para realizar un estudio cualitativo adecuado (Reyes & Quiroa, 2012).

Debido a lo anterior en este trabajo de tesis, se determinó que los intervalos lineales de concentración para cada uno de los analitos y los parámetros utilizados para la valoración de la linealidad fueron: un coeficiente de correlación (r) mayor o igual a 0.99 y el cumplimiento de la aleatoriedad de los residuos.

Para la precisión de las pruebas, se establecieron y realizaron siempre para tres niveles de concentración de cada analito preparados por triplicado de manera independiente, donde se



consideraba un valor de baja concentración, uno intermedio y uno alto, todos ellos dentro del intervalo lineal de cada elemento.

### **7.12      *Diseño del prototipo de un biosensor microfluídico colorimétrico.***

Opción 1:

El diseño del biosensor microfluídico colorimétrico se conformará de una pila multicapa de tres subsistemas que serán fabricados mediante técnicas litográficas blandas, moldeados y curados de PDMS contra moldes preparados litográficamente:

1. Una capa compatible con la piel con aberturas de microcanales que definirán las áreas de acumulación del biofluido ( $\sim 5.7$  N) en el dispositivo de una manera que ofrezca compatibilidad con la piel, para así facilitar comodidad y facilidad de uso a largo plazo. Esta película podría tener una geometría de  $25 \mu\text{m}$  y un módulo bajo de cerca de  $17$  kPa.
2. Depósitos y canales de microfluidos cerrados y flexibles suaves, que estarán llenos de materiales elastómeros sólidos y sensibles al color para el análisis cuantitativo del volumen y la química del biofluido. Las aberturas de estos canales se crearán mediante golpes mecánicos y definirán las áreas de recolección y serán de  $3$  mm de diámetro a través de las cuales se podría pasar a las regiones de entrada del sistema. La presión que impulsa el flujo de líquido surgirá de la propia acción de la extracción del biofluido, pues éstas serán asistidas por efectos capilares en los microcanales y los materiales incrustados en ellos. Y el contacto del biofluido inhibirá el flujo lateral de mismo de las regiones ubicadas fuera de las aberturas definidas, asegurando que el fluido que saldrá del área de recolección será dominado por la muestra misma.
3. Una antena de bucle magnético y electrónica asociada de comunicación de campo cercano (NFC) para la interfaz con dispositivos inalámbricos externos (Koh *et al.*, 2016).



## Opción 2:

El biosensor microfluídico colorimétrico estará formado por elastómeros de silicona de bajo módulo mediante la técnica de la litografía blanda, estas estructuras servirán como plataformas de recolección, manipulación, almacenamiento y análisis. Las marcas gráficas de los canales de los microfluidos serán impresas en poliéster transparente en películas de colores que coinciden con precisión con los de las reacciones de ensayo, estas películas con los canales se laminarán sobre la superficie superior del dispositivo para rodear cada uno de los microdepósitos y ciertos segmentos de los microcanales. Los microdepósitos aislados tendrán volúmenes de alrededor de 5  $\mu\text{L}$  y profundidades de aproximadamente 600  $\mu\text{m}$ , serán lo suficientemente grandes para obtener fácilmente imágenes y trayectorias ópticas adecuadamente largas para producir intensidades de color fácilmente medibles en rangos de concentraciones fisiológicamente relevantes para cada analito. Y el microcanal serpenteante largo será de 1 cm para producir un desarrollo de color uniforme. Después se realizará la adición de cortes a estas superposiciones de poliéster para producir las estructuras que minimizarán las limitaciones mecánicas sobre las deformaciones naturales del material. También contará con un cristal líquido termocrómico incrustado en una capa separada de poliéster para proporcionar un método colorimétrico.

Y en la última capa que se encuentra en la base del dispositivo incorporará aberturas alineadas con dos puertos de entrada en la parte posterior del biosensor para que a medida que la muestra del biofluido sea tomada sea dirigida a estas regiones, esto será el canal serpentino y el conjunto de microrreservorios separados por válvulas, a través de presiones asociadas a la acción de las glándulas sudoríparas sin bombas externas, capilaridad o actuadores. Los microrreservorios estarán conformados por materiales termocrómicos para poder detectar la temperatura y los reactivos químicos o enzimáticos para el análisis de ácido úrico, creatinina y pH, a su vez, el componente del sistema diseñado también incluirá un ensayo colorimétrico de cloruro (ver Figura 7) (Choi *et al.*, 2019).

## 8. Resultados y discusión.

### 8.1 Caracterizaciones de las nanoesferas de quitosano.

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

En este trabajo de investigación se obtuvieron las imágenes SEM para las nanoesferas (nanopartículas) de quitosano, como se muestra en la Figura 33. a), y a partir de dichos datos se ejecutó un análisis mediante el uso del software ImageJ para obtener el tamaño de partículas y la distribución de áreas, donde a partir de la obtención del área de cada elemento procesado de la imagen SEM se pudo calcular los diámetros de las nanopartículas obtenidas, parte de dicho procesamiento se puede ver en las imágenes b) y c) de la Figura 33.

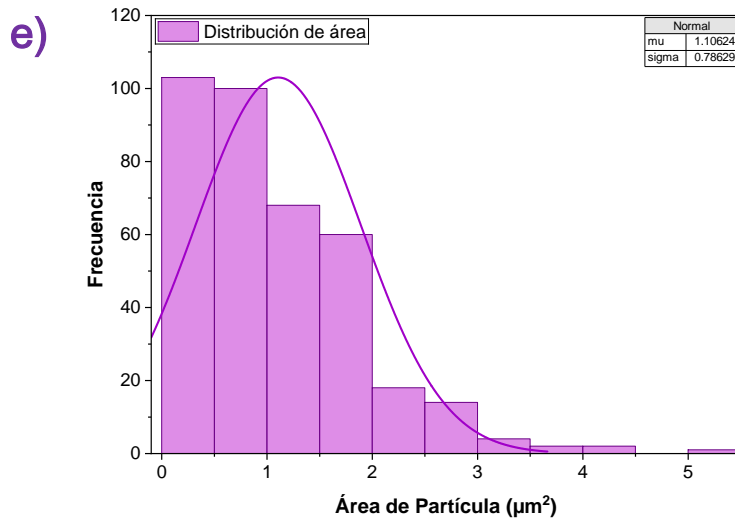
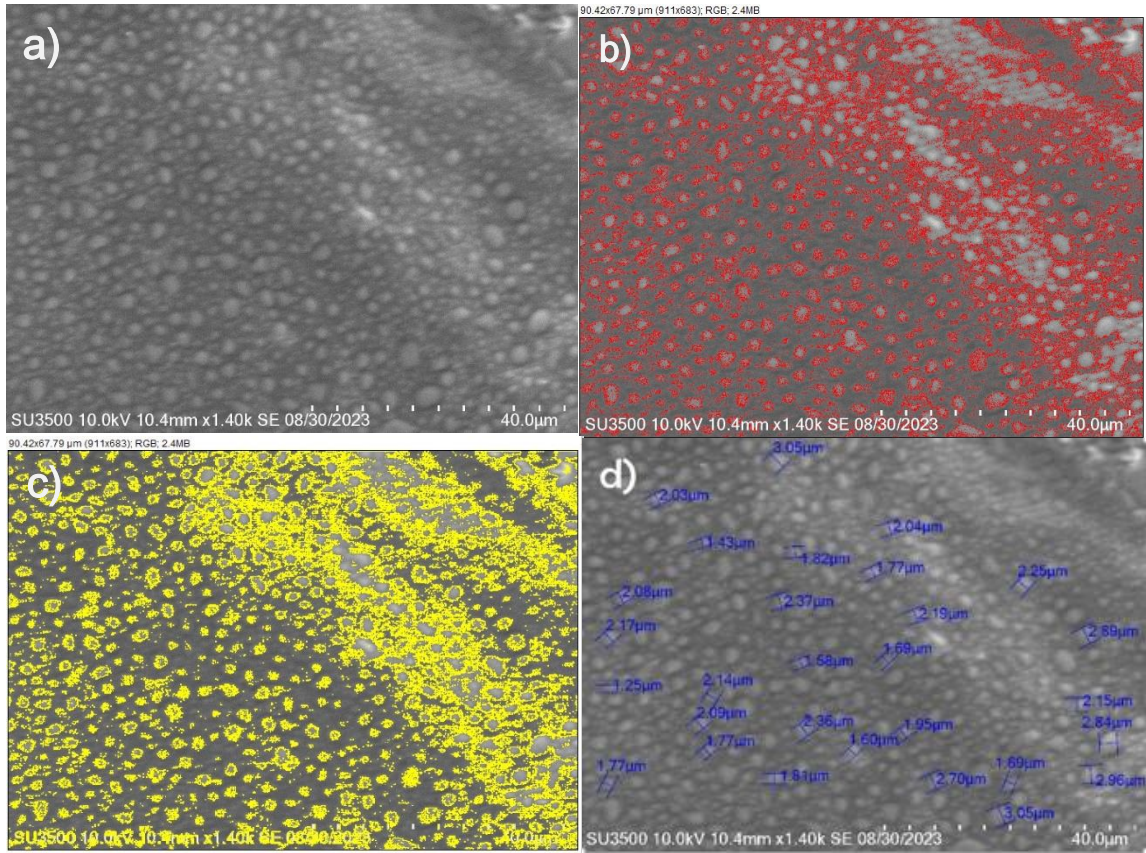
En la imagen de la Figura 33. d) se ejemplifica como se midieron sin distinción algunas nanopartículas de quitosano para poder ver los valores estimados de sus diámetros, y como se puede vislumbrar, los valores de las más pequeñas fueron de aproximadamente 80 nm, mientras que las más grandes fueron de alrededor de 3534 nm, esa distribución tan amplia de variación de valores se puede deber a factores inherentes al método de síntesis, pues según Asif *et al.* (2023) las nanopartículas de quitosano formuladas con tripolifosfato de sodio (TPP) (que actúa como ligante (cross-linker)) pueden alcanzar un rango de tamaños de partículas desde 1 a 1000 nm.

Además, acorde a lo reportado por Kahdestani *et al.* (2020) y Kamat *et al.* (2016), dicha variación en los tamaños de las nanopartículas se puede deber a que éstas están relacionadas y son dependientes de la relación quitosano/TPP, del nivel de la concentración y/o deacetilación del quitosano o del pH de la solución, así como que se ha reportado que a menor temperatura utilizada, menor es el tamaño de las NP en conjunto con una distribución más estrecha según los estudios simulados y experimentales que se han hecho, estas razones hacen que exista una dificultad para que se produzcan y obtengan tamaños uniformes.



Por otro lado, el valor promedio de las nanopartículas de quitosano se pudo obtener mediante el histograma que se realizó con los datos generados del software ImageJ a partir de los rangos de áreas estimadas para ver su distribución y poder también generar un aproximado del diámetro promedio de las nanopartículas de quitosano, contemplándolas como esféricas, que se muestra en la imagen e) de la Figura 33., a partir de dicha gráfica y sus datos se obtuvo que el área promedio fue de  $1.10624 \mu\text{m}^2$ , de modo que podemos inferir que el diámetro promedio es de aproximadamente 1186.8060 nm, este último dato corrobora lo que se había podido analizar a partir de las imagen d) de la Figura 33., comprobando así que las nanopartículas de quitosano obtenidas están aproximadamente dentro del rango reportado de las mismas que es de 1 a 1000 nm.

También es significativo indicar que más del 50% de las nanopartículas de quitosano obtenidas, están muy próximas del diámetro promedio, lo cual es un resultado bueno, asimismo se podría contemplar e imputar esa gran diversidad y distribución de tamaños a la rápida aglomeración de las nanopartículas en la solución, relacionadas además por los factores mencionados anteriormente como el tamaño de diámetro de la aguja utilizada para el microgoteo de la solución o por la temperatura.



**Fig. 33. Imagen SEM de las nanoesferas (nanopartículas) de quitosano (NE-Q/TTP) obtenidas y su distribución de tamaños: a) Imagen SEM con resolución de 40  $\mu\text{m}$ , b) y c) Análisis de tamaño de partículas y áreas realizada con el software ImageJ, d) Paneo**



## **de medición de algunas nanopartículas mayores a 1000 nm y e) Histograma de distribución de la frecuencia de áreas de las nanopartículas.**

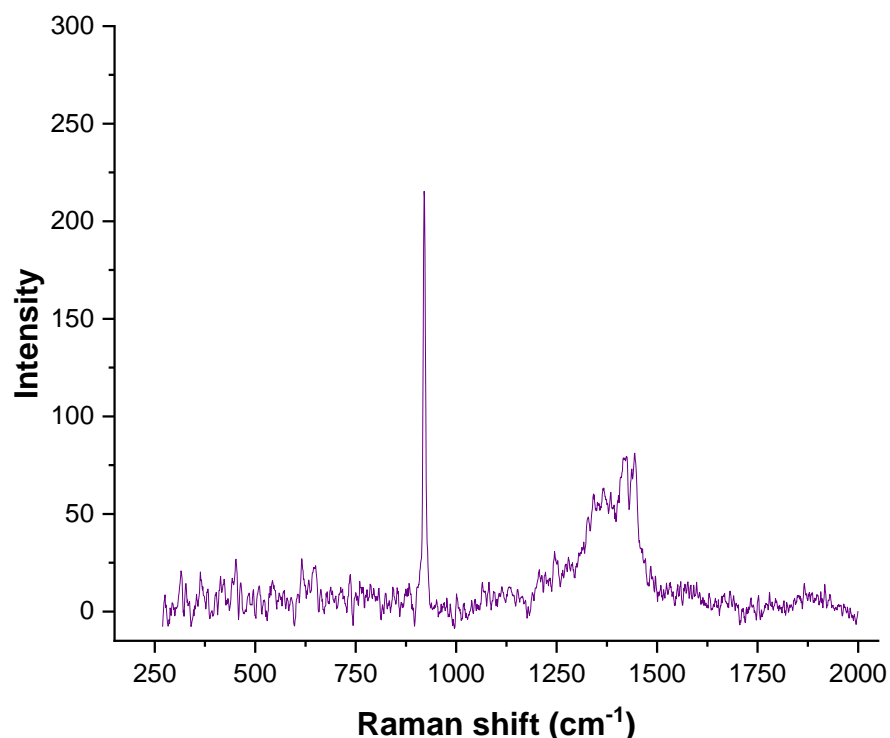
### ***8.1.2 Caracterización por Espectroscopia Raman de las nanoesferas de quitosano.***

La espectroscopia Raman (Raman Spectroscopy por sus siglas en inglés) es una técnica por la cual se capta la luz que ha sido esparcida inelásticamente por un medio de interés (que es el material que se desea estudiar), y gracias a que esta luz trae consigo información a nivel molecular, se puede conseguir un espectro único característico del material; la energía de esta radiación está relacionada con la vibración provocada en las moléculas que es lo que permite obtener su información molecular con alto grado de especificidad, ya que cada molécula tiene modos de vibración particulares (Edwards, 2005).

Mediante este tipo de espectroscopia se pueden identificar marcadores de diversos tipos de enfermedades pues se obtienen detalles específicos sobre la bioquímica de la muestra biológica, y el espectro obtenido es una combinación de las vibraciones moleculares de las diferentes biomoléculas que conforman la muestra. El espectro Raman de cada una de estas biomoléculas tiene bandas particulares que pueden permitir su identificación en el espectro total (Hernández, 2021). También es importante señalar que las técnicas espectroscópicas de Raman e infrarrojo corresponden al mismo espectro vibratorio molecular, solo que Raman se caracteriza por poder medir la muestra directamente sin pretratamiento, lo cual es apropiado para medir compuestos hidrosolubles (Ren *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se obtuvo el espectro Raman para las nanoesferas (nanopartículas) de quitosano (NE-Q/TTP), como se evidencia en la Figura 34., en este gráfico se puede observar un claro pico cerca de los  $919\text{ cm}^{-1}$ , el cual puede ser perteneciente a la banda vibratoria de los enlaces C-C de ciclohexanos que es correspondiente y característico a la estructura quitosano, y que según lo reportado por Socrates (2001) debe observarse cerca de los  $900\text{ cm}^{-1}$  y que Ren *et al.* (2014) también concuerda y estipula que los picos característicos de

nanopartículas de quitosano aparecen en los correspondientes a la vibración de estiramiento de los anillos ( $969\text{ cm}^{-1}$ ,  $1212\text{ cm}^{-1}$ ,  $1325\text{ cm}^{-1}$ ). Por otro lado, otros picos muy notorios, resaltados que se pueden observar están entre los  $1430$  y los  $1455\text{ cm}^{-1}$ , y estos pueden conferirse a los estiramientos C-N, concordancia que también se puede relacionar con los picos propios de este material, pues también concuerda con lo expuesto por Nirmala *et al.* (2011) y Socrates (2001) que publicaron que los picos del quitosano suelen aparecer también entre los rangos de  $1050\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  que representa la región de estiramiento C-C, los de  $1290\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$  que muestran la región de flexión CNH, la de los tres picos de  $1445\text{ cm}^{-1}$ ,  $1550\text{ cm}^{-1}$  y  $1635\text{ cm}^{-1}$ , donde el primero indica la presencia de amida-III correspondiente al estiramiento C-N, mientras que el segundo de amida-II particular de la deformación de  $\text{NH}_2$ , y la del tercero de amida-I afín al estiramiento  $\text{C}=\text{O}$ , y de los cuales todos estos últimos se pueden notar en el espectro Raman de este trabajo pero de forma atenuada.



**Fig. 34. Espectro Raman de las nanoesferas (nanopartículas) de quitosano (NE-Q/TTP).**



## **8.2 Evaluación Enzimática del ácido úrico (uricasa).**

### **8.2.1 Evaluación del acoplamiento enzimático de la uricasa.**

Las nanoesferas (nanopartículas) de quitosano pueden considerarse como un material idóneo para la inmovilización de enzimas, ya que el grupo funcional amino del quitosano permite realizar inmovilización enzimática (Ghadi *et al.* 2015), y además, otras características que brinda al ser un nanomaterial, son que ayuda a poder tener un buen rendimiento de inmovilización de las enzimas, lo que conlleva a tener una mayor estabilidad y sensibilidad, junto con una mayor capacidad de detección, en este caso de los biomarcadores de preeclampsia que son ácido úrico (con la enzima de la uricasa) y creatinina (con las enzimas de sarcosina, creatina y creatinina). Además de que también brindan la capacidad de incrementar la relación de área de superficie a volumen, lo que incrementa la estabilidad de la enzima inmovilizada e incrementa el desempeño enzimático, así como, que permiten realizar procesos enzimáticos continuos dando la posibilidad de recuperar y reutilizar las enzimas (Fatima *et al.*, 2021) y conceder resistencia frente a agentes como proteasas o solventes orgánicos (Ache, 2018).

En este estudio se hizo uso del quitosano como material de soporte para la inmovilización de las enzimas involucradas en el multisensor y después de algunas modificaciones químicas, sus grupos amino e hidroxilo reactivos, son los que hacen posible el acoplamiento de enzimas. El quitosano es un poliaminosacárido natural obtenido por N-desacetilación de la quitina, es una buena opción de uso en los biosensores debido a sus características pues es un material atóxico, biocompatible y biodegradable. (Biró *et al.*, 2008). Es por ello que se decidió realizar una comparativa entre el comportamiento y rendimiento de las enzimas en 2 soportes del mismo material pero con tamaños distintos, que como se explicó anteriormente dicho material se considera el más adecuado para trabajar con enzimas, que es el quitosano, para poder evaluar sus diferencias y discernir que opción es la mejor.

Por lo que, en este trabajo, se evaluó dicho comportamiento en la enzima uricasa inmovilizada



con macroesferas de quitosano (ME-Q/G) y nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP) como modelo guía para las demás enzimas en la creatinina que preveían un comportamiento y resultado similar por su misma naturaleza.

La gráfica que se muestra en la Figura 35 fue generada a partir de la inmovilización de la enzima uricasa con las macro y nanoesferas de quitosano con relación al tiempo necesario para su correcta inmovilización; en ésta se observa que a 5 minutos de comenzar las pruebas se logró inmovilizar aproximadamente un 38% de uricasa en el soporte de las ME-Q/G mientras que para las NE-Q/TTP se consigue inmovilizar un 50% de la misma, denostando una gran diferencia en la efectividad de la unión del soporte con la enzima, mostrando que desde un inicio las nanoesferas de quitosano representan una mejor opción; asimismo se sigue viendo que conforme pasan los minutos el acoplamiento sigue aumentando en ambos casos, a los 10 minutos para las ME-Q/G solo hay un incremento de un 1% de enzima inmovilizada (dando un 39%) mientras que para las NE-Q/TTP ya hay más del 60% de enzima inmovilizada (con un aumento del 10%).

Después se puede observar una gran variación en los resultados respecto al acoplamiento en comparación de ambos soportes, mientras que para las ME-Q/G que hasta los 55 minutos transcurridos logra su porcentaje de acoplamiento máximo con un 55% y solo lo logra mantener constante hasta los 60 minutos, para la estructura de las NE-Q/TTP el porcentaje de acoplamiento máximo lo consigue a solo 25 minutos transcurridos en la prueba con un 70% de acoplamiento de la enzima uricasa y donde después de ese tiempo el acoplamiento enzimático se mantiene constante incluso hasta los 60 minutos de comenzada la experimentación (aproximadamente 2 veces más rápido que con las macroesferas), esto debido a que el máximo de las moléculas de enzima presente se han unido a la cantidad de sustrato disponible, confirmando de nuevo que las NE-Q/TTP presentan un mejor rendimiento.

Conforme a los resultados anteriores, se puede concluir que aunque las macroesferas de quitosano que fueron realizadas por el método de precipitación pueden proporcionar buenos



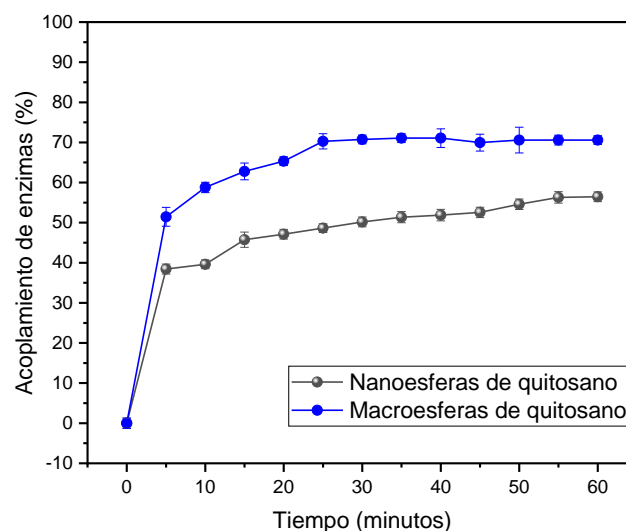
resultados (un 55% de acoplamiento enzimático aprox.), que se logran debido a que éstas poseen un área de superficie específica alta y numerosos sitios activos, disponibles para que se fijen las moléculas de enzima, y un menor tamaño de partícula de soporte que permite que el impedimento de difusión interna disminuya; las NE-Q/TTP significan la mejor opción respecto a los resultados de la efectividad de la unión del soporte con la enzima (acoplamiento) y del rendimiento, pues éstas por su tamaño nanométrico también tienen un área de superficie específica alta y numerosos sitios activos disponibles donde se fijan y quedan atrapadas las moléculas de la enzima uricasa, dando así la capacidad de incrementar la relación de área de superficie a volumen, lo que incrementa la estabilidad de la enzima inmovilizada y aumenta el desempeño enzimático; y a su vez por su menor tamaño de partícula de soporte, permiten que el impedimento de difusión interna disminuya proporcionando a su vez una mayor capacidad de detección lo que conlleva a tener una mayor sensibilidad y accesibilidad del sustrato a la enzima inmovilizada, siendo también capaz de realizar procesos enzimáticos continuos dando la posibilidad de recuperar y reutilizar las enzimas y conceder resistencia frente a agentes externos.

Al mismo tiempo, es importante consumir que se optó por la elección del quitosano como estructura de soporte para la inmovilización enzimática debido a sus características importantes al ser un polímero natural o material orgánico y atóxico, biocompatible y biodegradable, otra razón es porque las enzimas recubiertas de quitosano tienden a sufrir menos el efecto de lixiviación por las interacciones iónicas entre la enzima y el soporte, esto se puede corroborar, ya que, el quitosano en forma de perlas, en este caso, en este trabajo que fueron en macro y nanoesferas, se mostraron también excelentes resultados al permitir la inmovilización del doble de enzimas.

En suma, se sabe que las enzimas que son fijadas con quitosano tienen un contacto más pequeño con la interacción de iones entre enzimas y soporte, por eso, entre los métodos de inmovilización de enzimas por unión química se encuentra el método de unión de soportes, que es el método de inmovilización más utilizado y el más fuerte, y que en este caso es el que

se usó en las ME-Q/TPP, mientras que para las NE-Q/TPP se consideró el método de entrelazamiento físico de enlaces iónicos que se formó en conjunto y consecuencia del proceso de síntesis de las mismas y que funciona como un agente de reticulación para inducir la unión intermolecular entre las cargas positivas de los grupos amino del quitosano y los fosfatos negativos en la estructura del TPP, además de que también actúa como un adyuvante coagulante de molécula pequeña, y este a pesar de no ser el más fuerte para la inmovilización también puede representar buenos resultados, en este caso incluso brindó la mejor opción entre las diferentes estructuras de quitosano, demostrando así que la aplicación de la nanotecnología puede ofrecer e implicar mejoras significativas pues la elección del soporte y del tipo de enlace es muy importante para obtener una buena actividad posterior del biocatalizador.

Finalmente, es imperioso señalar que no existe en la actualidad una técnica para una inmovilización total efectiva, es decir, no se podría inmovilizar al 100 % una enzima, por lo que los valores obtenidos en este trabajo son bastante satisfactorios.



**Fig. 35. Evaluación de acoplamiento de la enzima uricasa sobre macroesferas de**



**quitosano (ME-Q/G) y nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP) con respecto al tiempo.**

### ***8.2.2 Evaluación de la actividad enzimática del ácido úrico (uricasa) con respecto al efecto del Sustrato.***

La Figura 36 constituye los resultados de las pruebas de la actividad enzimática de la enzima uricasa correspondiente para la detección de ácido úrico con respecto al efecto del sustrato, realizadas al cambiar valores de cinco concentraciones de las soluciones de ácido úrico con buffer fosfato de pH de 7.5 de 0.25, 0.75, 1.25, 1.675 y 3.35 mg/mL cada una (estos valores se determinaron tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico como biomarcador de preeclampsia en suero sanguíneo que es 6.7 mg/dL o 0.067 mg/mL).

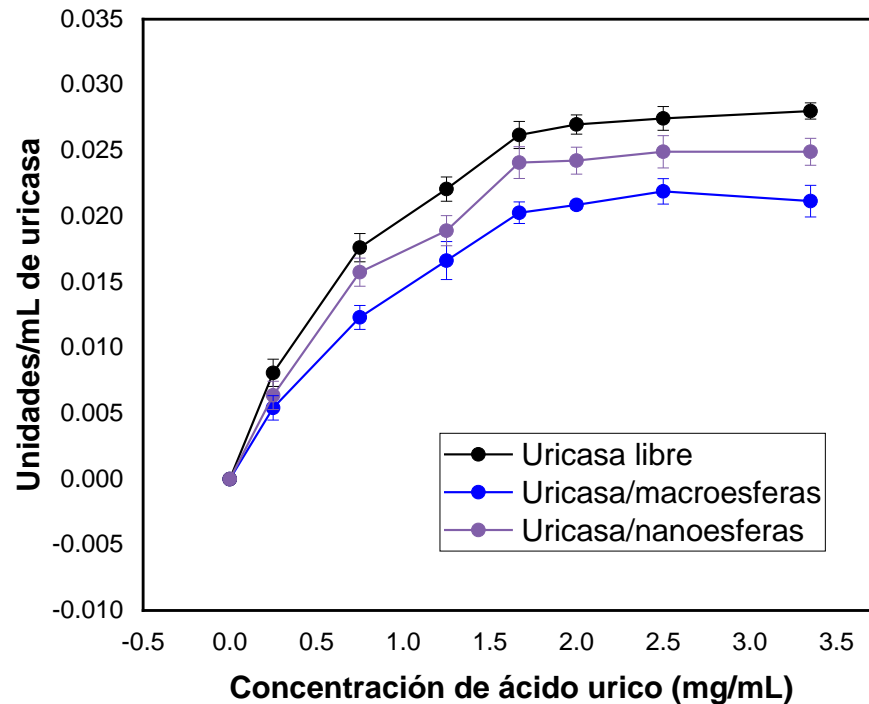
La actividad de la enzima uricasa se evaluó en dos tipos de soportes, estos son: nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP) y macroesferas de quitosano (ME-Q/G), los cuales cada uno de ellos individualmente arrojaron actividades diferentes, por un lado la enzima soportada en ME-Q/G muestra un rango de Concentración óptima entre 1.675 a 3.35 mg/mL pero con valores más bajos de enzima presente a comparación del soporte con NE-Q/TTP, que si bien también presentan la mejor actividad enzimática un rango entre 1.675 a 3.35 mg/mL de concentración, la velocidad de la reacción es mayor con un incremento de 0.005 unidades/mL de uricasa aprox., que es más cercano y similar a los valores cuando la enzima se encuentra en estado libre, denostando que la actividad de la misma es mejor con la opción de las NE-Q/TTP.

Estos resultados indican que la enzima uricasa, tanto libre como inmovilizada, alcanza una actividad máxima en soluciones con concentraciones mayores a 1.5 mg/mL. Una diferencia que es notable en el sistema inmovilizado con NE-Q/TTP es que este ayudo a alcanzar una mayor presencia de la enzima en comparativa con el soporte de ME-Q/G.



Por lo tanto, podemos concluir que en la reacción catalizada del ácido úrico, el sustrato se une primero con la enzima uricasa (ya sea inmovilizada en cualquiera de los dos soportes o libre) para formar el complejo enzima-sustrato; por eso mismo, para una concentración de sustrato particular, un incremento en la concentración enzimática aumenta la velocidad de la reacción catalizada, por lo que, a concentraciones enzimáticas mayores, más moléculas están disponibles para unirse al sustrato y catalizar la reacción, eso indica que hay una relación directa entre la concentración de la enzima y la actividad enzimática, siempre y cuando, la concentración de sustrato sea mayor que la concentración de la enzima. En este caso, cuando la concentración de enzima se mantiene constante (entre los valores de 1.675 a 3.35 mg/mL), significa que la adición de más sustrato aumentará la velocidad de la reacción, por lo que, si la concentración del sustrato es alta, se pueden llegar a saturar todas las moléculas de la enzima y es ahí cuando la velocidad de la reacción alcanza su máximo, en donde por más que se adicione de más sustrato, la velocidad de la reacción no aumenta más.

También se puede apreciar que existe un decremento notorio en la actividad cuando la enzima se inmoviliza, la disminución es más significativa cuando es inmovilizada sobre ME-Q/G pero no tan grande cuando la enzima se soporta en NE-Q/TPP. Una de las posibles razones de esto último es debido a la posible aglomeración de las ME-Q/G y NE-Q/TPP de cada una respectivamente, lo cual podría estar obstaculizando el sitio activo de la enzima, y por ende, conlleve a obtener una menor o nula interacción y actividad de la misma; o también esta disminución de la actividad podría deberse a los inconvenientes inherentes de inmovilizar, que ya fueron explicados en el apartado anterior.



**Fig. 36.** Evaluación del efecto del Sustrato sobre la actividad del ácido úrico (uricasa) sobre macroesferas de quitosano (ME-Q/G) y nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP).

### 8.2.3 Evaluación de la actividad enzimática del ácido úrico (uricasa) con respecto al efecto del pH.

La Figura 37 constituye los resultados de las pruebas de la actividad enzimática de la enzima uricasa correspondiente para la detección de ácido úrico con respecto al efecto del pH, realizadas al cambiar 7 valores de pH de las soluciones de ácido úrico, donde cada solución tenía una concentración de 1.675 mg/mL de ácido úrico (este valor se determinó tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico en suero sanguíneo como biomarcador de preeclampsia que es 6.7 mg/dL o 0.067 mg/mL) con buffers fosfato de



pH de 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9 respectivamente.

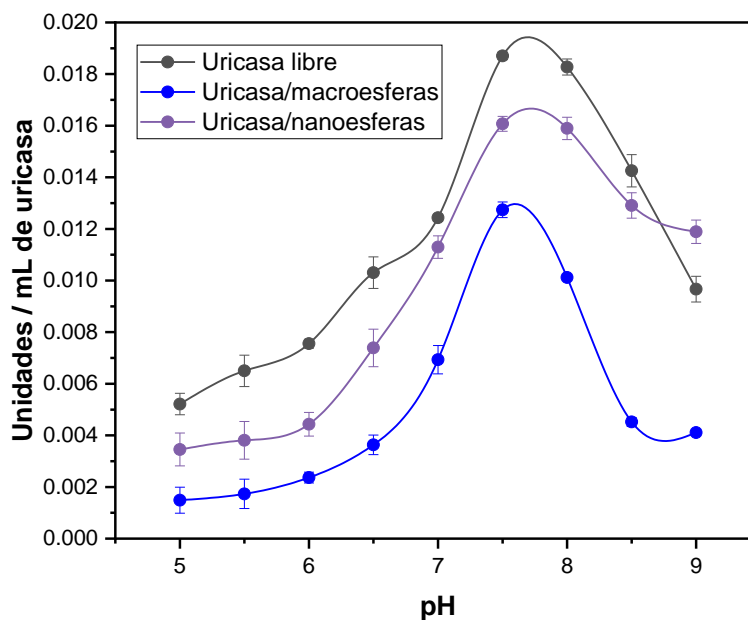
La actividad de la enzima uricasa se evaluó en dos tipos de soportes, estos son: nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP) y macroesferas de quitosano (ME-Q/G), los cuales cada uno de ellos individualmente arrojaron actividades diferentes, por un lado la enzima soportada en ME-Q/G muestra un rango de pH óptimo a 7.5 pero con valores considerablemente más bajos de enzima presente a comparación del soporte con NE-Q/TTP, que si bien también presenta la mejor actividad enzimática a un pH de 7.5 y se mantiene hasta alcanzar uno de 8, e inclusive no llega a presentar un decaimiento tan grande en pH más básicos como pasa con el otro soporte y la enzima libre, y la velocidad de la reacción es mayor con un incremento del 21% o 0.004 unidades/mL de uricasa aprox., que es más cercano a cuando la enzima se encuentra en estado libre, denostando que la actividad de la misma es mejor con la opción de las NE-Q/TTP.

Además, los resultados a su vez indican que la enzima uricasa, tanto libre como inmovilizada, tiene una actividad máxima en soluciones ligeramente alcalinas, corroborando así una concordancia con lo reportado en la literatura, pues se obtuvo un valor de pH óptimo de 7.5 en las tres modalidades que se llevaron en este trabajo con enzima libre e inmovilizada tanto con ME-Q/G y NE-Q/TTP pues según lo reportado por Sigma Aldrich (1994), el pH óptimo del ácido úrico es de 7.5. También, una diferencia que es notable en el sistema inmovilizado con NE-Q/TTP, es que este ayudo a la enzima a resistir en un rango de pH más amplio.

Es importante mencionar que generalmente las enzimas son más activas a su pH óptimo, debido a que el pH es el que mantiene la estructura terciaria adecuada de la proteína, pero si un valor de pH está arriba o abajo del pH óptimo, se alteran las interacciones de los grupos R (radicales), lo que provoca que se destruya la estructura terciaria y el sitio activo, lo que causa que la enzima ya no pueda unirse a un sustrato de manera adecuada y no se lleven a cabo reacciones. Entonces se puede deducir que, si bien, a pesar de que en el soporte de NE-Q/TTP la enzima no disminuyó tan drásticamente la actividad como si estuviera libre o con ME-Q/G

en valores de pH más básico, esa caída de actividad se podría deber a que las grandes variaciones respecto del pH óptimo destruyen de manera permanente la estructura de la enzima, aunque es importante mencionar que si se revierte un pequeño cambio en el pH, una enzima puede recuperar su estructura y actividad (Timberlake, 2013).

También se puede apreciar que existe un decremento notorio en la actividad cuando la enzima se inmoviliza, la disminución es más significativa cuando es inmovilizada sobre ME-Q/G pero no tan grande cuando la enzima se soporta en NE-Q/TPP. Una de las posibles razones de esto último es debido a la posible aglomeración de las ME-Q/G y NE-Q/TPP de cada una respectivamente, lo cual podría estar obstaculizando el sitio activo de la enzima, y por ende, conlleve a obtener una menor o nula interacción y actividad de la misma; o también esta disminución de la actividad podría deberse a los inconvenientes inherentes de inmovilizar, que ya fueron explicados en el apartado anterior.



**Fig. 37. Evaluación del efecto del pH sobre la actividad del ácido úrico (uricasa)**



**sobre macroesferas de quitosano (ME-Q/G) y nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP).**

#### ***8.2.4 Evaluación de la actividad enzimática del ácido úrico (uricasa) con respecto al efecto de la Temperatura.***

La Figura 38 constituye los resultados de las pruebas de la actividad enzimática de la enzima uricasa correspondiente para la detección de ácido úrico con respecto al efecto de la Temperatura, realizadas al cambiar 5 valores de temperatura en las soluciones de ácido úrico, donde cada solución era realizada con buffer fosfato de pH 7.5 y con una concentración de 1.675 mg/mL de ácido úrico (este valor se determinó tomando como parámetro el rango promedio de la concentración de ácido úrico en suero sanguíneo como biomarcador de preeclampsia que es 6.7 mg/dL o 0.067 mg/mL) y sometida a diferentes variaciones de temperatura de 15, 25, 35, 45 y 55 °C.

La actividad de la enzima uricasa se evaluó en dos tipos de soportes, estos son: nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP) y macroesferas de quitosano (ME-Q/G), los cuales cada uno de ellos individualmente arrojaron actividades diferentes, por un lado la enzima soportada en ME-Q/G muestra un rango de temperatura óptimo de 35 °C pero con valores considerablemente más bajos de enzima presente a comparación del soporte con NE-Q/TTP, que si bien también presenta la mejor actividad enzimática a una temperatura de 35 °C y se mantiene hasta alcanzar casi la de 50 °C, la velocidad de la reacción es mayor con un incremento del 25% o 0.005 unidades/mL de uricasa aprox., que es más cercano a cuando la enzima se encuentra en estado libre, denostando que la actividad de la misma es mejor con la opción de las NE-Q/TTP.

Además, los resultados a su vez indican que la enzima uricasa, tanto libre como inmovilizada, tiene una actividad máxima a un rango de alrededor de 35 a 50 °C de temperatura, corroborando así una concordancia y similitud al menos dentro del rango de lo reportado en



la literatura, pues se obtuvo una actividad máxima a dichos valores en las tres modalidades que se llevaron en este trabajo, con enzima libre e inmovilizada tanto con ME-Q/G y NE-Q/TTP pues según lo reportado por Gota (2014), la temperatura óptima del ácido úrico es de 37 °C. También, una diferencia que es notable en el sistema inmovilizado con NE-Q/TTP, es que este ayudo a la enzima a conservar el rendimiento de la mejor actividad en un rango de temperatura más amplio.

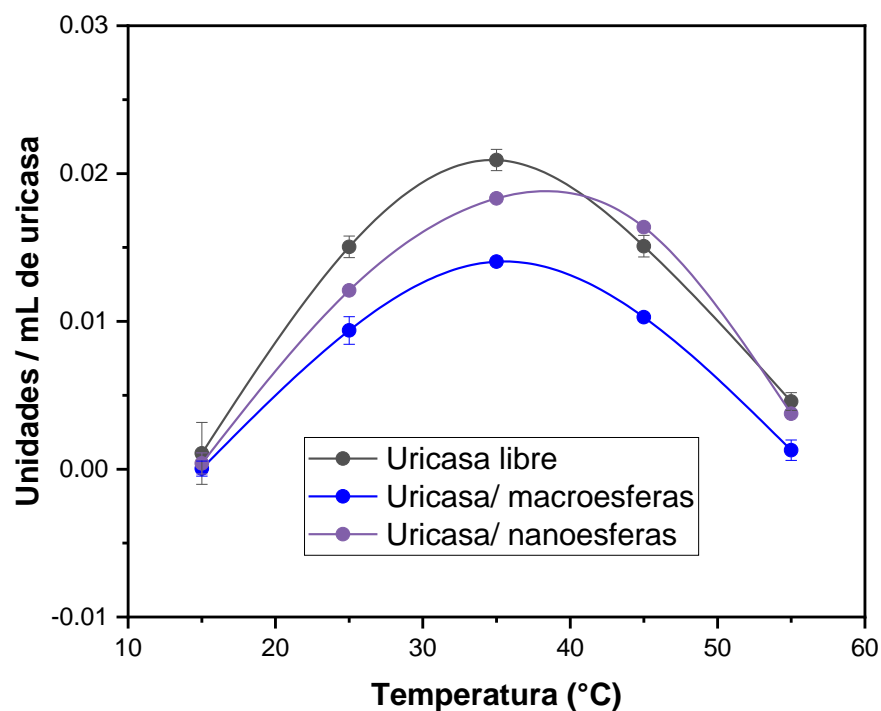
Esta grafica también muestra, que existe una tendencia de incremento de la actividad enzimática conforme se aumenta la temperatura en las tres configuraciones diferentes en que se tiene la enzima y con una tendencia bastante similar, hasta llegar a su máximo el cual converge en el mismo punto para los tres casos, y el cual se encuentra en una temperatura de 37 °C. Esta tendencia creciente podría deberse a la capacidad de carga de enzima y a la gran cantidad de sitios de unión potenciales que puede tener en su superficie, lo que significaría que le podría permitirse extenderse más fácilmente en el área de los soportes, pero con una mejor actividad en las NE-Q/TTP según lo obtenido.

A los 55 °C se puede apreciar la completa desnaturalización de la enzima y su pérdida de actividad, por lo que se puede concluir que a medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción, gracias a que las moléculas reactantes se mueven más rápido para generar más colisiones con las enzimas, y cuando alcanza el máximo de actividad comienza una disminución de la misma, ocasionada por la desnaturalización de la enzima, debido a un aumento de energía cinética de las moléculas que reaccionan.

Es decir, las enzimas son muy sensibles a la temperatura, pues a bajas temperaturas, la mayor parte de las enzimas muestra poca actividad porque no hay suficiente cantidad de energía para que tenga lugar la reacción catalizada, por ejemplo, la mayoría de las enzimas humanas son más activas a temperatura óptima, que es de 37°C o temperatura corporal, coincidente con la de la biomolécula del ácido úrico de este trabajo; mientras que a temperaturas superiores a 50°C, la estructura terciaria, y por ende la forma de la mayor parte de las proteínas, se

destruye, lo que causa una pérdida de actividad enzimática (Timberlake, 2013).

Por último, con el total de rangos de temperaturas evaluadas se puede observar que la relación temperatura-actividad enzimática mantiene cierta concordancia, teniendo así, mejores resultados para la enzima libre, seguidos de la enzima en NE-Q/TTP, y finalmente los obtenidos con las ME-Q/G, tendencia la cual también puede observarse en todo el rango de la evaluación del efecto del Sustrato y el del pH.



**Fig. 38. Evaluación del efecto de la Temperatura sobre la actividad del ácido úrico (uricasa) sobre macroesferas de quitosano (ME-Q/G) y nanoesferas de quitosano (NE-Q/TTP).**



Si bien, con los resultados obtenidos tanto de la evaluación a diferentes concentraciones, pH y temperaturas, podría parecer que la mejor opción sería hacer uso de la enzima sin ningún tipo de soporte, sin embargo, el usar el soporte de NE-Q/TT representa y permite un mejor resultado práctico, además de que con respecto al sustrato, al pH e inclusive a la temperatura, no hay una variación significativa ni preocupante de la actividad, pues prácticamente están muy cercanas o hasta podría considerarse la misma con fines prácticos y de rendimiento, e incluso podría compensarse con el decremento que si existe en la actividad de la enzima con pH mayores a 8 en estado libre, donde existe una mejora en los resultados significativa cuando se está en la configuración NE-Q/TT.

### ***8.3 Determinación colorimétrica del ácido úrico (uricasa).***

#### ***8.3.1 Determinación colorimétrica del ácido úrico (uricasa) por muestras.***

Se realizaron las pruebas colorimétricas en solución en cerámica, y en la Figura 39 se puede observar el cambio colorimétrico del ácido úrico y como va ocurriendo la reacción, ya que a medida que aumenta la concentración del analito en las muestras, un color rosado se formaba y se volvía cada vez más intenso respecto al cambio de concentración. Esto se debe a que el ácido úrico es oxidado por el oxígeno disuelto en presencia de la enzima uricasa, lo que produce Alantoína,  $\text{CO}_2$  y peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y donde posteriormente ese  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida el colorante o-Dianisidina por la presencia de peroxidasa de rábano picante, para que así, dependiendo de la cantidad de ácido úrico reaccionado y la creciente cantidad de peróxido liberado al aumentar la concentración del mismo, se obtienen tonos cada vez más intensos.

Mediante la experimentación se determinó que conforme pasa el tiempo, y después de agregar todos los componentes a las muestras (descritos anteriormente en la sección 7.12), estas se vuelven cada vez más oscuras hasta alcanzar un color homogéneo.



**Fig. 39. Muestras colorimétricas de ácido úrico (uricasa) en cerámica.**

### ***8.3.2 Determinación colorimétrica de ácido úrico (uricasa) por RGB y distancias euclidianas.***

Primero para empezar a determinar los valores colorimétricos de las muestras se implementó un análisis de color por medio de un canal de combinación de colores primarios RGB para poder ver y discernir la variación de color en las soluciones con respecto a la concentración, incluyendo el blanco, para ello se realizó la gráfica que se observa en la Figura 40, donde los valores RGB de las muestras van disminuyendo conforme aumenta la concentración de ácido úrico, esto debido a que, en imágenes en color de 8 bits por canal, los valores de intensidad varían del color negro con valor de 0 hasta el color blanco con valor de 255 para cada uno de los componentes RGB (rojo, verde, azul), por lo tanto, al aumentar la concentración de ácido úrico en la solución, el color se vuelve más intenso, por lo que los valores tenderán al cero que representa el negro y entre menos concentración el tono es más claro, por lo que los valores del pixel en RGB son más altos.

Según lo obtenido en la gráfica, cuando la muestra no posee concentración de ácido úrico, los valores de RGB son los mayores, con rojo en valor de 225, verde de 220 y azul en 210, y que conforme se va incrementando la concentración los valores van disminuyendo hasta alcanzar 215 en rojo, 195 en verde y 160 en azul.

También se puede observar que el canal R de las pruebas colorimétricas es más alto debido a

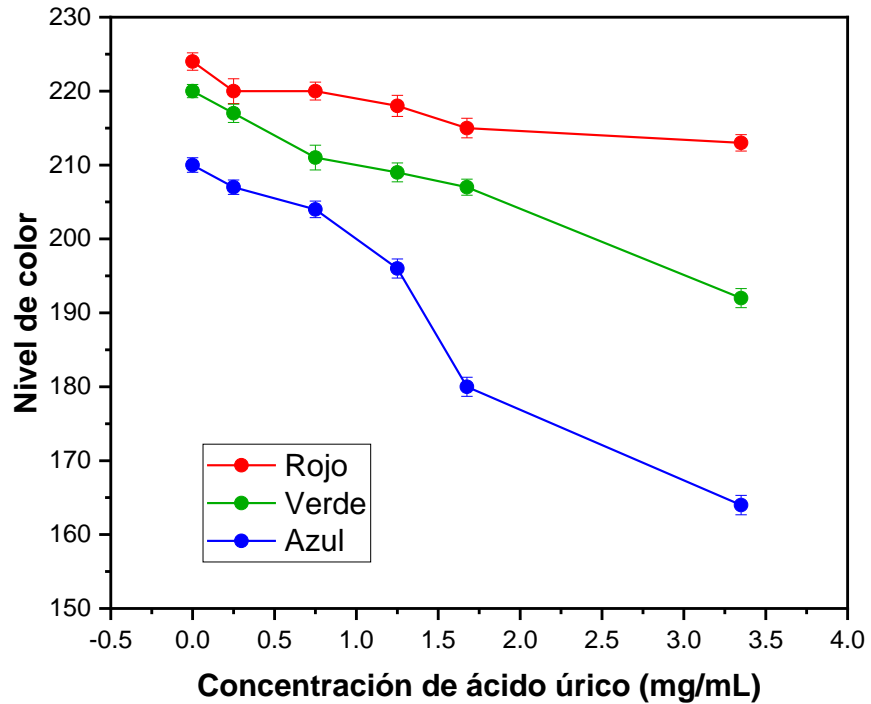


la utilización del colorante (o-Dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) que se empleó como sustrato de peroxidasa y el cual produce un producto final soluble de color rojo-anaranjado.

Y es así como se determina la concentración de ácido úrico al hacer una relación entre el valor RGB y la concentración con solo obtener el valor RGB de un pixel, por lo que se llega a la conclusión acorde a los resultados de que si se obtienen valores altos de RGB la concentración del analito es menor y viceversa.

Gracias a esta gráfica también es posible apreciar que existe una tendencia visible para cada grupo de componentes, es decir, en el caso de las componentes R, la tendencia es decreciente conforme también incrementa la concentración del ácido úrico, confirmando así la presencia de los colores rosados pertenecientes al rango de R, y que coinciden con las intensidades y tonalidades obtenidas de las pruebas por muestras en cerámica con esos tonos rosados que se apreciaban al incrementar la concentración a simple vista; y en el caso de las componentes G y B, ambas también tienen una tendencia de disminuir pero con un ritmo diferente, perdiendo más notoriamente el nivel de color hasta alcanzar el mínimo valor para cada una.

Está gráfica permite visualizar y confirmar que para el caso de la evaluación del ácido úrico, el color predominante es el de componentes R, por lo que incluso a simple vista esperaríamos ver colores con predominancia hacia los rojos, o derivados cercanos de este color, como en este caso está entre los colores rosados.



**Fig. 40. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de ácido úrico (uricasa).**

Otra forma de evaluar colorimétricamente es al simplificar los parámetros de color de manera estandarizada, y esto se logra al implementar un modelo de color cuyo propósito es calcular y arrojar donde se dan las coordenadas tridimensionales y el subespacio de este sistema, donde cada color está representando por un solo punto. Y para lograr lo anterior se hizo uso del método de la Distancia Euclidiana (DE) determinando así la diferencia de color computacionalmente lo cual se puede ver representado mediante la gráfica obtenida que se puede ver en la Figura 41.

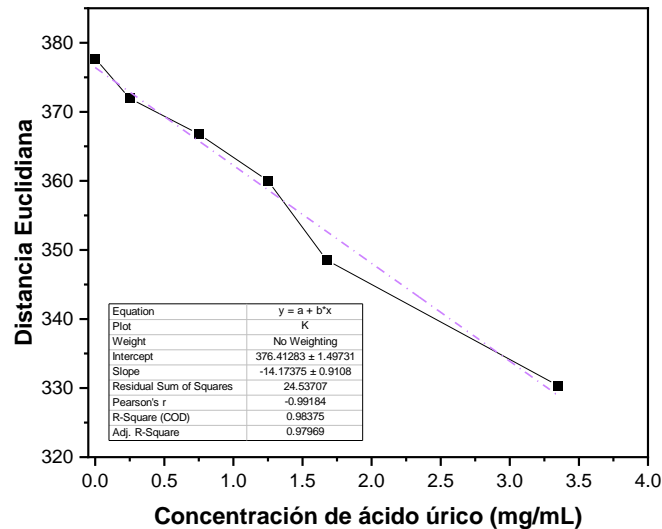
Y en base a los resultados obtenidos en la Figura 41, se pueden aplicar valores para la

determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), donde  $\sigma$  es la desviación estándar y  $s$  es la pendiente de la ecuación, en este caso para la evaluación de ácido úrico es:

$$LOD = 3 \left( \frac{\sigma}{s} \right) = 3 \left( \frac{1.49731}{14.17375} \right) = 0.3169 \text{ mg/mL}$$

$$LOQ = 10 \left( \frac{\sigma}{s} \right) = 10 \left( \frac{1.49731}{14.17375} \right) = 1.0564 \text{ mg/mL}$$

Además de lo anterior, con la Figura 41 que grafica la regresión lineal a partir de los datos colorimétricos, también se pudo encontrar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que a grandes rasgos, es el indicador de la relación lineal entre la distancia Euclidiana y la concentración del analito, que en este caso es el ácido úrico, el cual fue de un valor  $R^2$  ya ajustado de 0.98375, lo que nos sugiere que el modelo, o la relación entre DE y concentración de ácido úrico, es altamente predictivo. De igual manera, se obtuvo el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r$ ) con un valor de 0.9984, con el cual se puede confirmar y afirmar, ya no solo visualmente, que existe una fuerte y positiva relación lineal del cambio de color con las concentraciones del sustrato.



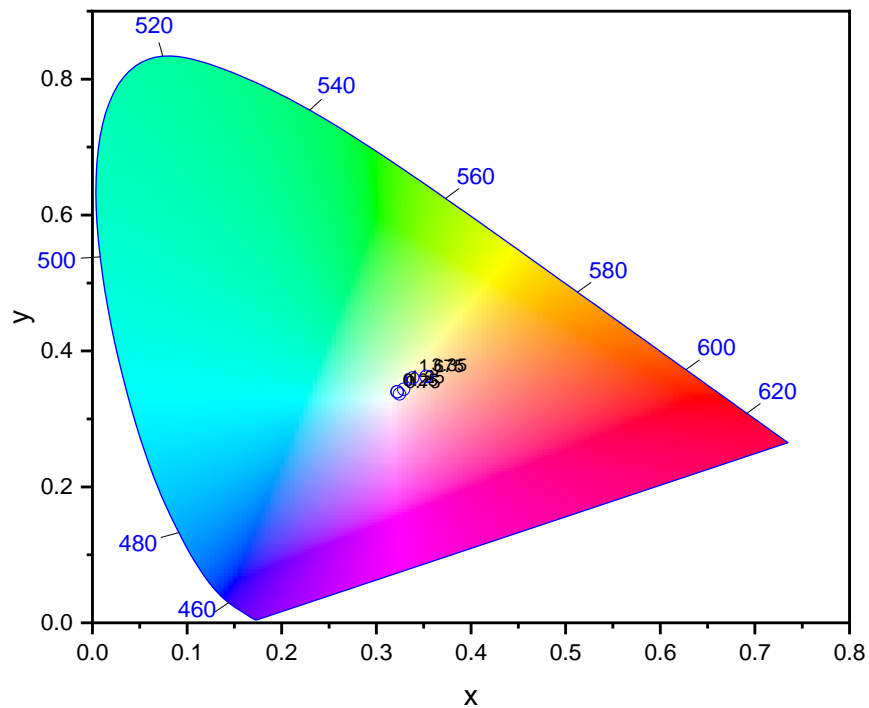
**Fig. 41. Curva de calibración de ácido úrico (uricasa) a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas.**

Por último, pero no menos importante, otra forma de evaluar y comprobar el cambio colorimétrico del analito analizado, es mediante la aplicación del histograma acromático CIE, ya que proporciona la capacidad de reconocimiento del ojo humano según dos parámetros CIE que son los valores de x y los valores de y. El proceso CIE convierte la distribución espectral de la energía luminosa de un objeto en un parámetro de luminancia donde se va asignando color a tono y saturación en coordenadas x y en un diagrama CIE bidimensional. El diagrama CIE se basa en la selección de tres colores estándar que son 3 colores primarios (rojo, verde y azul), para ir creando mezclas aditivas de todos los demás colores del espectro, y el valor del triestímulo es la cantidad de los tres colores primarios que ayudan a describir un estímulo de color, los cuales son llamados X, Y, Z.

En este diagrama CIE, los límites exteriores simbolizan los colores puros expresados con sus correspondientes longitudes de onda, donde el blanco se coloca aproximadamente en el centro y ahí es el área en la que el nivel de saturación es el más bajo.

Por ello en la Figura 42 se puede observar cómo se aplicó el diagrama CIE a los valores colorimétricos ya obtenidos y se puede apreciar con evidencia que las mediciones de ácido úrico realizadas en este proyecto se encuentran aproximadamente en la región naranja-amarillento y la región rosa-naranja, dándonos como resultado unos colores con más tendencia a las tonalidades rosas. Y gracias al mapeo de los colores confirmamos reiteradamente que los resultados son positivos y los esperados, debido a que como se vislumbraba, mientras más concentración de ácido úrico haya más oscuro o intenso se tornará el color de la muestra.

**CIE 1931**



**Fig. 42. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de ácido úrico (uricasa).**

A continuación, la Tabla 4 recopila los límites de detección reportados en la bibliografía, comparado con el método desarrollado en este proyecto, el cual se considera que es aceptable ya que está en un rango aceptable a la mayoría de los métodos discutidos en la bibliografía presentada en la tabla.

**Tabla 4. Tabla comparativa del límite de detección de ácido úrico (uricasa) con respecto a otros trabajos.**

Analito sentido	Material/ sistema de reconocimiento	Material de soporte	Biofluido/ Muestra	Límite de detección	Nombre del artículo	Referencias
Ácido úrico	Nanopartículas de níquel (NiNP) con protección de acetato de 1-H-3-metilimidazolio (líquido iónico, IL)	Nanopartículas de níquel (NiNP)	Suero real	$1,30 \times 10^{-7}$ M	Development of a Nonenzymatic Colorimetric Sensor for the Detection of Uric Acid Based on Ionic Liquid-Mediated Nickel Nanostructures	(Nishan <i>et al.</i> , 2022)
Ácido úrico	Nanotubos de carbono CE	Electrodo de carbón-cerámica	Suero humano y de farmacia	0.42 $\mu$ M	Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by use of a MWCNT modified carbon-ceramic electrode and differential pulse voltammetry	(Habibi & Pournaghi 2010)
Ácido úrico	AgNPs mono dispersas recubiertas de citrato + NaOH	Nanopartículas de plata	Orina humana	0.85 $\mu$ M	Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on direct electron transfer of Hemoglobin-encapsulated chitosan-modified glassy carbon electrode	(Zhao <i>et al.</i> , 2009)
Ácido úrico	Membrana de cáscara de huevo inmovilizada con uricasa y un electrodo de oxígeno.	Membrana de cáscara de huevo de BSA y glutaraldehído (microfibras y cavidades proteicas altamente reticuladas)	Suero y Orina	2,0 $\mu$ M (S/N = 3)	Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane	(Yan <i>et al.</i> , 2007)

Ácido úrico	HAP nanofibras/r GO/AuNPs	Nanofibras de hidroxiapatita/Ox ido de grafeno oxidado/ Nanopartículas de oro	Orina humana	3.9 $\mu$ M	Potential of a sensitive uric acid biosensor fabricated using hydroxyapatite nanowire/reduced graphene oxide/gold nanoparticle	(Chen <i>et al.</i> , 2020)
Ácido úrico	<b>Uricasa/O-dianisidina</b>	<b>Nanopartículas de quitosano inmovilizadas con NE-Q/TTP</b>	<b>Suero sanguíneo</b>	<b>0.3169 mg/mL</b>	<b>Este trabajo</b>	<b>Este trabajo</b>
Ácido úrico	Sistema de electrodos serigrafiados modificados con enzimas (uricasa/ o- fenilendiamina)	Solución de uricasa con glutaraldehído al 8 %	Saliva artificial y saliva humana sin diluir	350 $\mu$ M de UA	Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics	(Kim <i>et al.</i> , 2015)
Ácido úrico	H2O2-sensitive Puntos cuánticos sensibles/Enzimas duales	HRP–CdS	Medios líquidos	125 mM	A simple and sensitive fluorescence based biosensor for the determination of uric acid using H2O2-sensitive quantum dots/dual enzymes	(Nur <i>et al.</i> , 2015)

#### 8.4 Evaluación enzimática de la creatinina (creatininasa).

Los resultados de las evaluaciones de actividad enzimática de la creatinina, creatina y sarcosina tanto para las pruebas de sustrato, como de temperatura y pH fueron realizadas y comprobadas en la tesis de López (2024) también del laboratorio de BIOSENS de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Aeropuerto, y dichos resultados se tomaron como referencia para confirmar que la actividad enzimática aumenta y es más estable con inmovilización de las nanopartículas de quitosano en comparación con las macroesferas de quitosano, ya que se obtuvieron los mismos resultados que con la evaluación de la enzima uricasa, en cada una de las modalidades, corroborando que la aplicación de la nanotecnología ofrece e implica mejoras significativas pues la elección del soporte y del tipo de enlace es muy importante para obtener una buena actividad posterior del biocatalizador.

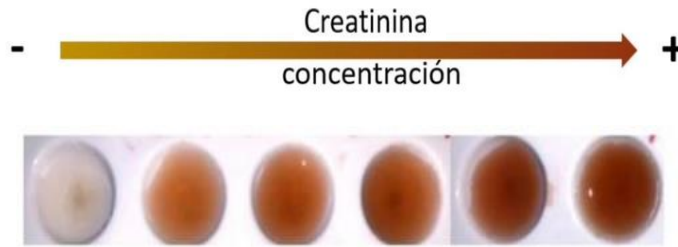


## **8.5 Determinación colorimétrica de la creatinina (creatininasa).**

### **8.5.1 Determinación colorimétrica de creatinina (creatininasa) por muestras.**

Se realizaron las pruebas colorimétricas en solución en cerámica, y en la Figura 43 se puede observar el cambio colorimétrico de la creatinina y como va ocurriendo la reacción, en este caso esta biomolécula requiere de una reacción en cadena con la producción y presencia de otros dos analitos que son la creatina y sarcosina con todos sus componentes correspondientes, y se pudo dilucidar que a medida que aumenta la concentración del analito en las muestras, un color naranja-rojizo (incluso concordante con el color representativo del colorante o-dianisidina) se formaba y se volvía cada vez más intenso respecto al cambio de concentración. Esto se debe a que en esta reacción en cadena primero la creatinina es oxidada por el oxígeno disuelto en presencia de la enzima creatininasa, lo que produce creatina; después esa creatina es oxidada por el oxígeno disuelto en presencia de la enzima creatinasa, lo que produce sarcosina y urea; posteriormente, la sarcosina es oxidada por el oxígeno disuelto en presencia de la enzima sarcosina oxidasa, lo que produce formaldehído, glicina y peróxido ( $H_2O_2$ ); para que por último ese  $H_2O_2$  oxida el colorante o-Dianisidina por la presencia de peroxidasa de rábano picante, para que así, dependiendo de la cantidad de creatinina reaccionada y la creciente cantidad de peróxido liberado al aumentar la concentración del mismo, se obtenga un cambio colorimétrico con tonos cada vez más intensos.

Mediante la experimentación se determinó que conforme pasa el tiempo, y después de agregar todos los componentes a las muestras (descritos anteriormente en la sección 7.12), estas se vuelven cada vez más oscuras hasta alcanzar un color homogéneo.



**Fig. 43. Muestras colorimétricas de creatinina (creatininasa) en cerámica.**

### **8.5.2 Determinación colorimétrica de creatinina por RGB y distancias euclidianas.**

Primero para empezar a determinar los valores colorimétricos de las muestras se implementó un análisis de color por medio de un canal de combinación de colores primarios RGB para poder distinguir la variación de color en las soluciones con respecto a la concentración, incluyendo el blanco, para ello se realizó la gráfica que se observa en la Figura 44, donde los valores RGB de las muestras van disminuyendo conforme aumenta la concentración de creatinina, esto debido a que, en imágenes en color de 8 bits por canal, los valores de intensidad varían del color negro con valor de 0 hasta el color blanco con valor de 255 para cada uno de los componentes RGB (rojo, verde, azul), por lo tanto, al aumentar la concentración de creatinina en la solución, el color se vuelve más intenso, por lo que los valores tenderán al cero que representa el negro y entre menos concentración el tono es más claro, por lo que los valores del pixel en RGB son más altos.

Según lo obtenido en la gráfica, cuando la muestra no posee concentración de creatinina, los valores de RGB son los mayores, con rojo en valor de 225, verde de 220 y azul en 210, y que conforme se va incrementando la concentración los valores van disminuyendo hasta alcanzar 210 en rojo, 188 en verde y 160 en azul.

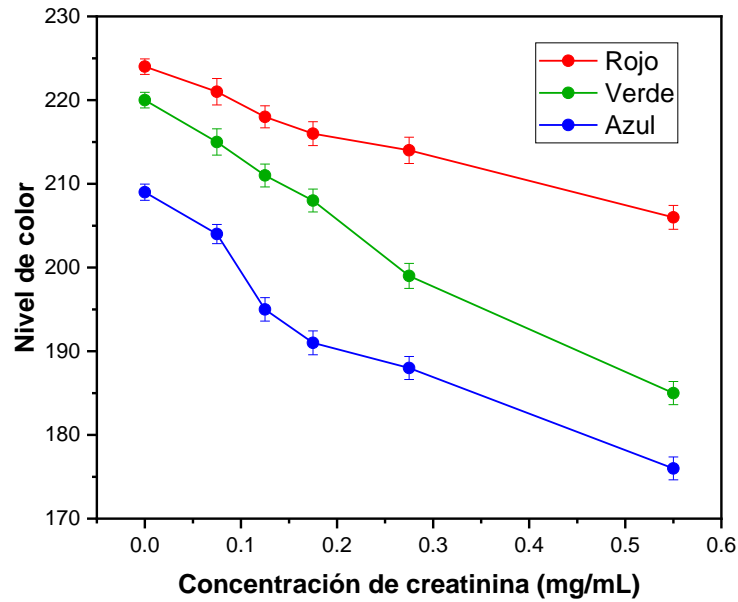
También se puede observar que el canal R de las pruebas colorimétricas es más alto debido al uso del colorante (o-Dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) que se empleó como sustrato de peroxidasa y el cual produce un producto final soluble de color rojo-anaranjado.



Y es así como se determina la concentración de creatinina al hacer una relación entre el valor RGB y la concentración con solo obtener el valor RGB de un pixel, por lo que se llega a la conclusión acorde a los resultados de que si se obtienen valores altos de RGB la concentración del analito es menor y viceversa.

Gracias a esta gráfica también es posible apreciar que existe una tendencia visible para cada grupo de componentes, es decir, en el caso de las componentes R, la tendencia es decreciente conforme también incrementa la concentración de la creatinina, confirmando así la presencia de los colores rojizos-rosados-anaranjados pertenecientes rango de R, y que coinciden con las intensidades y tonalidades obtenidas de las pruebas por muestras en cerámica con esos tonos más tendenciosos al color rojizo-naranja que se apreciaban al incrementar la concentración a simple vista; y en el caso de las componentes G y B, ambas también tienen una tendencia de disminuir pero con un ritmo diferente, perdiendo más notoriamente el nivel de color hasta alcanzar el mínimo valor para cada una.

Está gráfica permite visualizar y confirmar que para el caso de la evaluación de la creatinina, el color predominante es el de componentes R, por lo que incluso a simple vista esperaríamos ver colores con predominancia hacia los rojos, o derivados cercanos de este color, como en este caso está entre los colores anaranjados-rojizos.



**Fig. 44. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de creatinina (creatininasa).**

Otra forma de evaluar colorimétricamente es al simplificar los parámetros de color de manera estandarizada, y esto se logra al implementar un modelo de color cuyo propósito es calcular y arrojar donde se dan las coordenadas tridimensionales y el subespacio de este sistema, donde cada color está representando por un solo punto. Y para lograr lo anterior se hizo uso del método de la Distancia Euclidiana (DE) determinando así la diferencia de color computacionalmente lo cual se puede ver representado mediante la gráfica obtenida que se puede ver en la Figura 45.

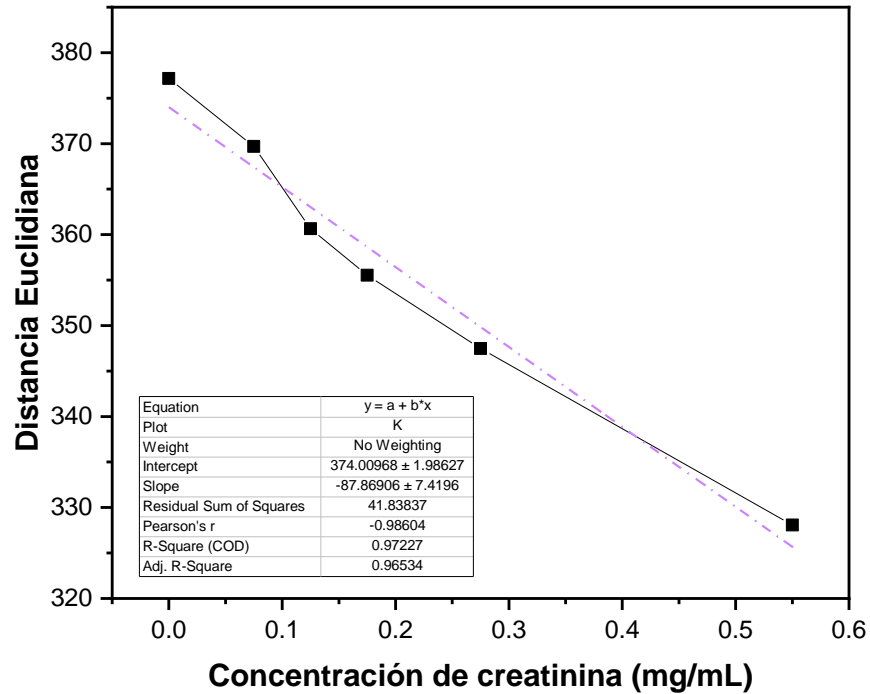
Y en base a los resultados obtenidos en la Figura 45, se pueden aplicar valores para la determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), donde  $\sigma$  es la desviación estándar y  $s$  es la pendiente de la ecuación, en este caso para la evaluación de

creatinina es:

$$LOD = 3 \left( \frac{\sigma}{S} \right) = 3 \left( \frac{1.98627}{87.86906} \right) = 0.06782 \text{ mg/mL}$$

$$LOQ = 10 \left( \frac{\sigma}{S} \right) = 10 \left( \frac{1.98627}{87.86906} \right) = 0.2260 \text{ mg/mL}$$

Además de lo anterior, con la Figura 45 que grafica la regresión lineal a partir de los datos colorimétricos, también se pudo encontrar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que a grandes rasgos, es el indicador de la relación lineal entre la distancia Euclidiana y la concentración del analito, que en este caso es la creatinina, el cual fue de un valor  $R^2$  ya ajustado de 0.97227, lo que nos sugiere que el modelo, o la relación entre DE y concentración de creatinina, es altamente predictivo. De igual manera, se obtuvo el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r$ ) con un valor de 0.98604, con el cual se puede confirmar y afirmar, ya no solo visualmente, que existe una fuerte y positiva relación lineal del cambio de color con las concentraciones del sustrato.



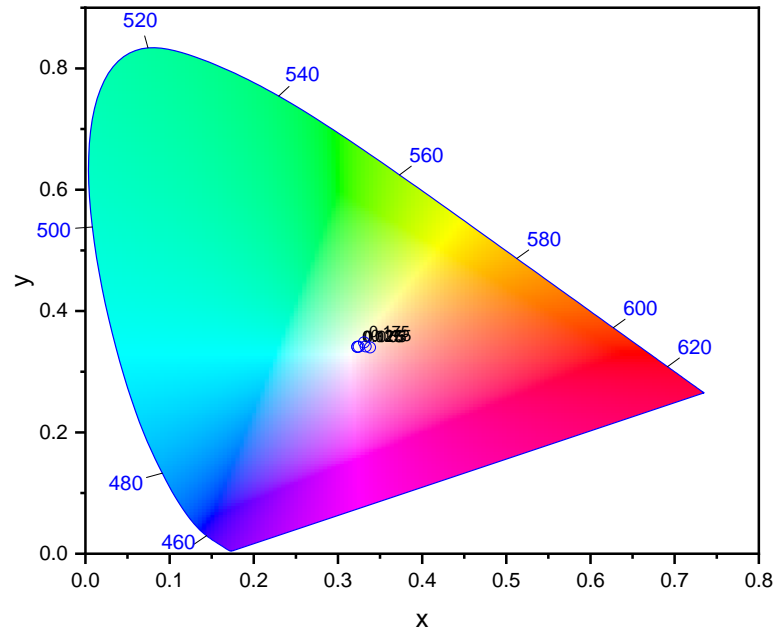
**Fig. 45. Curva de calibración de creatinina (creatininasa) a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas.**

Por último, pero no menos importante, otra forma de evaluar y comprobar el cambio colorimétrico del analito analizado, es mediante la aplicación del histograma acromático CIE que ya fue explicado anteriormente en el apartado 8.3.2.

Por ello en la Figura 46 se puede observar cómo se aplicó el diagrama CIE a los valores colorimétricos ya obtenidos y se puede apreciar con evidencia que las mediciones de creatinina realizadas en este trabajo se encuentran aproximadamente en la región naranja-amarillento y la región rosa-naranja, dándonos como resultado unos colores con más tendencia a las tonalidades rojizas-naranjas. Y gracias al mapeo de los colores confirmamos

de nueva cuenta que los resultados son también positivos y los esperados, debido a que como se vislumbraba, mientras más concentración de creatinina haya más oscuro o intenso se tornará el color de la muestra.

**CIE 1931**



**Fig. 46. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de creatinina (creatininasa).**

A continuación, la Tabla 5 recopila los límites de detección reportados en la bibliografía, comparado con el método desarrollado en este proyecto, el cual se considera que es aceptable ya que es está dentro del rango de la mayoría de los métodos discutidos en la bibliografía presentada en la tabla.

**Tabla 5. Tabla comparativa del límite de detección creatinina con respecto a otros trabajos.**

Analito sentido	Material/ sistema de reconocimiento	Material de soporte	Biofluido/ Muestra	Límite de detección	Nombre del artículo	Referencias
Creatinina	Sistema de L-cisteína estabilizada en CuNP	Nanopartículas de cobre	Suero artificial y muestras de orina	0.454 nM (0.0513 ng/mL)	Selective recognition of creatinine – Development of a colorimetric sensor	(Sivasankaran <i>et al.</i> , 2018)
Creatinina	Sistema ácido pícrico/ AgNPs	Nanopartículas de plata	Sangre humana y fluido cerebroespinal	8.4 nM (0.9502 ng/mL)	Picric acid capped silver nanoparticles as a probe for colorimetric sensing of creatinine in human blood and cerebrospinal fluid samples	(Parmar <i>et al.</i> , 2016)
Creatinina	Sistema de AuNP con adenosina/ Ag <sup>+</sup>	Nanopartículas de oro	Orina simulada y suero bovino	12.7 nM (1.4366 ng/mL)	Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Recognition of Creatinine with Good Selectivity and Sensitivity	(Du <i>et al.</i> , 2016)
Creatinina	Sistema de AuNP modificado con ácido úrico y Hg <sup>2+</sup>	Nanopartículas de oro	Suero bovino y orina	19.8-1.6 nM (2.2397-0.1809 ng/mL)	Colorimetric Detection of Creatinine Based on Plasmonic Nanoparticles via Synergistic Coordination Chemistry	(Du <i>et al.</i> , 2015)
Creatinina	AgNPs mono dispersas recubiertas de citrato + NaOH	Nanopartículas de plata	Orina	53.4 nM (6.0406 ng/mL)	Citrate-capped silver nanoparticles as a probe for sensitive and selective colorimetric and spectrophotometric sensing of creatinine in human urine	(Alula <i>et al.</i> , 2018)
<b>Creatinina</b>	<b>Creatininas/O-dianisidina</b>	<b>Nanopartículas de quitosano inmovilizadas con NE-Q/TTP</b>	<b>Suero sanguíneo</b>	<b>0.06782 mg/mL</b>	<b>Este trabajo</b>	<b>Este trabajo</b>
Creatinina	Compósito de membranas de polímero molecularmente impreso (MIP) con sitios receptores artificiales	Membranas de micro filtración de fluoruro de polivinilideno (PVDF)	Muestras acuosas	0.25 mM (28.28 mg/mL)	Colorimetric test-systems for creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes	(Sergeyeva <i>et al.</i> , 2013)
Creatinina	AuNP estabilizadas con citrato	Nanopartículas de oro	Orina humana	80 uM (0.0090 mg/mL)	Gold nanoparticles-based colorimetric and visual creatinine assay	(He <i>et al.</i> , 2015)

### ***8.6 Evaluación Enzimática de la creatina (creatinasa).***

Los resultados de las evaluaciones de actividad enzimática de la creatinina, creatina y sarcosina tanto para las pruebas de sustrato, como de temperatura y pH fueron realizadas y comprobadas en la tesis de López (2024) también del laboratorio de BIOSENS de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Aeropuerto, y dichos resultados se tomaron como referencia para confirmar que la actividad enzimática aumenta y es más estable con inmovilización de las nanopartículas de quitosano en comparación con las macroesferas de quitosano, ya que se obtuvieron los mismos resultados que con la evaluación de la enzima uricasa, en cada una de las modalidades, corroborando que la aplicación de la nanotecnología ofrece e implica mejoras significativas pues la elección del soporte y del tipo de enlace es muy importante para obtener una buena actividad posterior del biocatalizador.

### ***8.7 Determinación colorimétrica de la creatina (creatinasa).***

#### ***8.7.1 Determinación colorimétrica de creatina (creatinasa) por muestras.***

Se realizaron las pruebas colorimétricas en solución en cerámica, y en la Figura 47 se puede observar el cambio colorimétrico de la creatina y como va ocurriendo la reacción, en este caso, se analizó esta biomolécula porque es parte de la reacción en cadena necesaria para poder analizar la creatinina, que es el analito de interés en este trabajo, por lo que su estudio requiere de esa misma reacción en cadena característica de la creatinina con la producción y presencia de otro metabolito que es la sarcosina con todos sus componentes correspondientes y omitiendo la primera parte de la misma pues la reacción comenzaría, en este caso, desde su segunda etapa con la presencia de la creatina misma.

Como resultado se pudo dilucidar que a medida que aumenta la concentración del analito en las muestras, un color naranja (incluso concordante con el color naranja-rojizo representativo del colorante o-Dianisidina) se formaba y se volvía cada vez más intenso respecto al cambio de concentración. Esto se debe a que en esta reacción en cadena primero la creatina es oxidada

por el oxígeno disuelto en presencia de la enzima creatinasa, lo que produce sarcosina y urea; posteriormente, la sarcosina es oxidada por el oxígeno disuelto en presencia de la enzima sarcosina oxidasa, lo que produce formaldehído, glicina y peróxido ( $H_2O_2$ ); para que por último ese  $H_2O_2$  oxide el colorante o-Dianisidina por la presencia de peroxidasa de rábano picante, para que así, dependiendo de la cantidad de creatina reaccionada y la creciente cantidad de peróxido liberado al aumentar la concentración del mismo, se obtenga un cambio colorimétrico con tonos cada vez más intensos.

Mediante la experimentación se determinó que conforme pasa el tiempo, y después de agregar todos los componentes a las muestras (descritos anteriormente en la sección 7.12), estas se vuelven cada vez más oscuras hasta alcanzar un color homogéneo.



**Fig. 47. Muestras colorimétricas de creatina (creatinasa) en cerámica.**

### ***8.7.2 Determinación colorimétrica de creatina por RGB y distancias euclidianas.***

Primero se realizó un análisis de color RGB para poder distinguir la variación de color en las soluciones con respecto a la concentración, incluyendo el blanco, para ello se realizó la gráfica que se observa en la Figura 48, donde los valores RGB de las muestras van disminuyendo conforme aumenta la concentración de creatina, esto debido a que, en imágenes en color de 8 bits por canal, los valores de intensidad varían del color negro con valor de 0 hasta el color blanco con valor de 255 para cada uno de los componentes RGB (rojo, verde, azul), por lo tanto, al aumentar la concentración de creatina en la solución, el color se vuelve más intenso,



por lo que los valores tenderán al cero que representa el negro y entre menos concentración el tono es más claro, por lo que los valores del pixel en RGB son más altos.

De acuerdo a la gráfica, cuando la muestra no posee concentración de creatina, los valores de RGB son los mayores, con rojo en valor de 225, verde de 220 y azul en 210, y que conforme se va incrementando la concentración los valores van disminuyendo hasta alcanzar 210 en rojo, 188 en verde y 180 en azul.

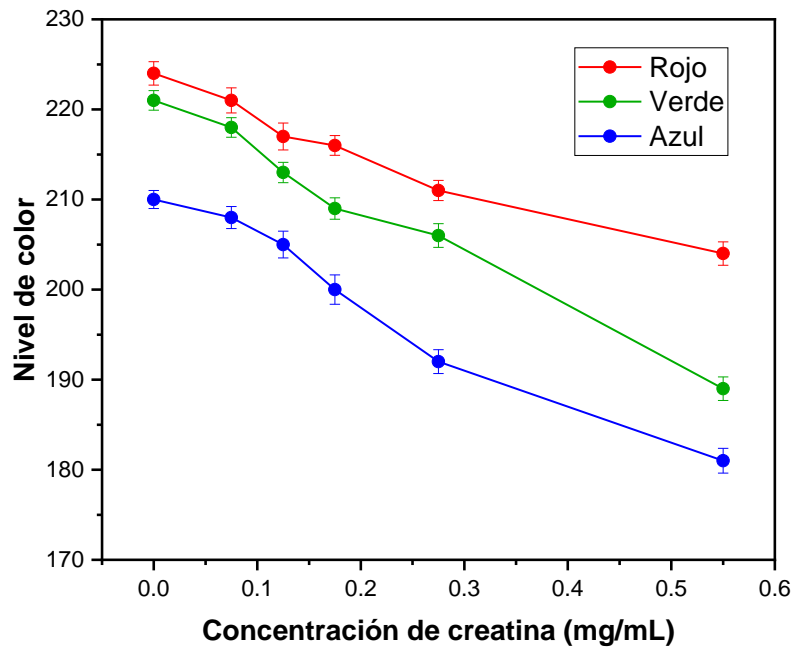
También se puede observar que el canal R de las pruebas colorimétricas es más alto debido al uso del colorante (o-Dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) que se empleó como sustrato de peroxidasa y el cual produce un producto final soluble de color rojo-anaranjado.

Y es así como se determina la concentración de creatina al hacer una relación entre el valor RGB y la concentración con solo obtener el valor RGB de un pixel, por lo que se llega a la conclusión acorde a los resultados de que si se obtienen valores altos de RGB la concentración del analito es menor y viceversa.

Gracias a esta gráfica también es posible apreciar que existe una tendencia visible para cada grupo de componentes, es decir, en el caso de las componentes R, la tendencia es decreciente conforme también incrementa la concentración de la creatina, confirmando así la presencia de los colores amarillos-anaranjados pertenecientes rango de R, y que coinciden con las intensidades y tonalidades obtenidas de las pruebas por muestras en cerámica con esos tonos más tendenciosos al color amarillo-naranja que se apreciaban al incrementar la concentración a simple vista; y en el caso de las componentes G y B, ambas también tienen una tendencia de disminuir pero con un ritmo diferente, perdiendo más notoriamente el nivel de color hasta alcanzar el mínimo valor para cada una.

Está gráfica permite visualizar y confirmar que para el caso de la evaluación de la creatina, el color predominante es el de componentes R, por lo que incluso a simple vista esperaríamos ver colores con predominancia hacia los naranjas, o derivados cercanos de este color, como

en este caso está entre los colores anaranjados-amarillentos.



**Fig. 48. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de creatina (creatinasa).**

Otra forma de evaluar colorimétricamente es al simplificar los parámetros de color de manera estandarizada, y esto se logra al implementar un modelo de color cuyo propósito es calcular y arrojar donde se dan las coordenadas tridimensionales y el subespacio de este sistema, donde cada color está representando por un solo punto. Y para lograr lo anterior se hizo uso del método de la Distancia Euclidiana (DE) determinando así la diferencia de color computacionalmente lo cual se puede ver representado mediante la gráfica obtenida que se

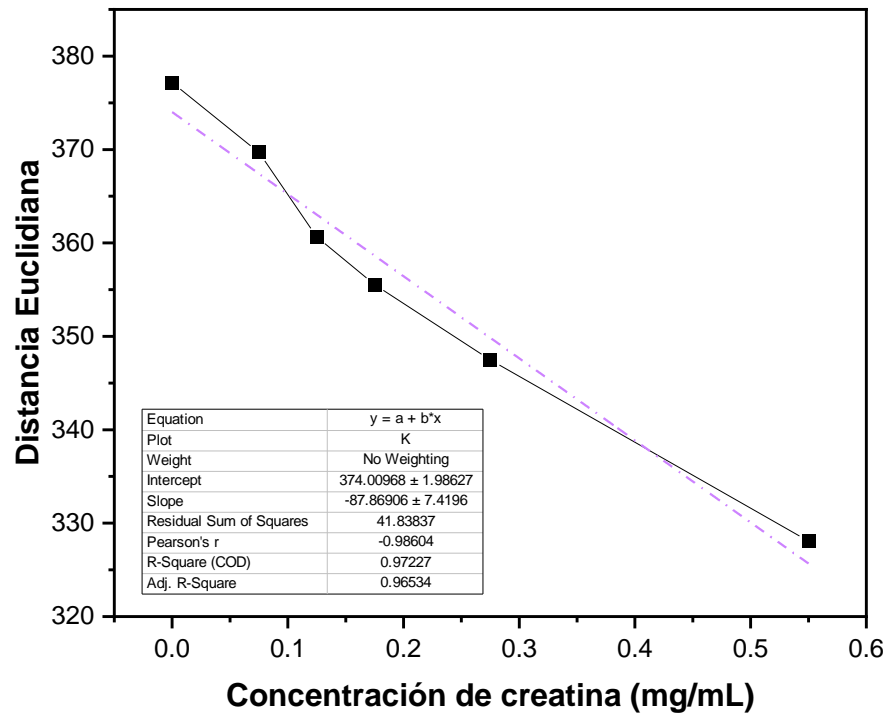
puede ver en la Figura 49.

Y en base a los resultados obtenidos en la Figura 49, se pueden aplicar valores para la determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), donde  $\sigma$  es la desviación estándar y  $s$  es la pendiente de la ecuación, en este caso para la evaluación de creatina es:

$$LOD = 3 \left( \frac{\sigma}{s} \right) = 3 \left( \frac{1.98}{87.86} \right) = 0.0676 \text{ mg/mL}$$

$$LOQ = 10 \left( \frac{\sigma}{s} \right) = 10 \left( \frac{1.98}{87.86} \right) = 0.2253 \text{ mg/mL}$$

Además de lo anterior, con la Figura 49 que grafica la regresión lineal a partir de los datos colorimétricos, también se pudo encontrar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que a grandes rasgos, es el indicador de la relación lineal entre la distancia Euclidiana y la concentración del analito, que en este caso es la creatina, el cual fue de un valor  $R^2$  ya ajustado de 0.97227, lo que nos sugiere que el modelo, o la relación entre DE y concentración de creatina, es altamente predictivo. De igual manera, se obtuvo el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r$ ) con un valor de 0.98604, con el cual se puede confirmar y afirmar, ya no solo visualmente, que existe una fuerte y positiva relación lineal del cambio de color con las concentraciones del sustrato.

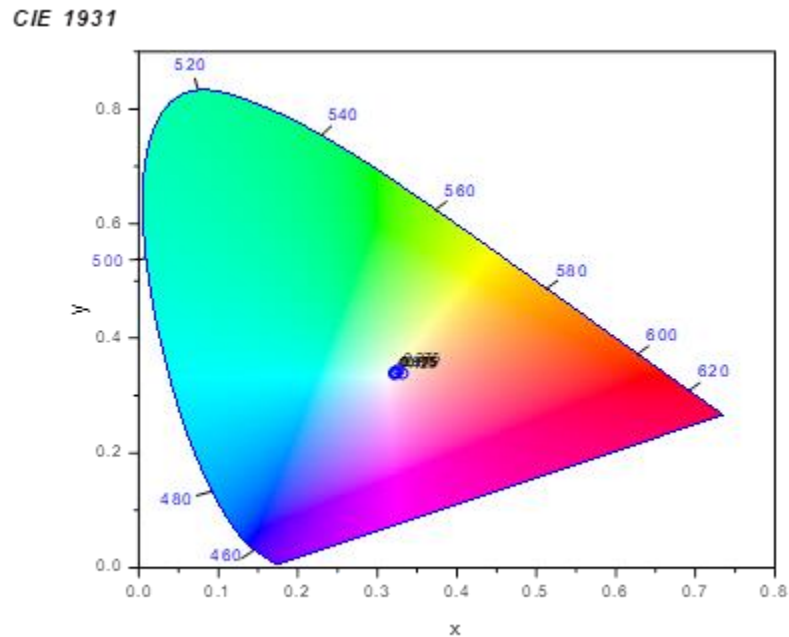


**Fig. 49. Curva de calibración de creatina (creatinasa) a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas.**

Por último, y no menos relevante, otra forma de evaluar y comprobar el cambio colorimétrico del analito analizado, es mediante la aplicación del histograma acromático CIE que ya fue explicado anteriormente en el apartado 8.3.2.

Por ello en la Figura 50 se puede observar cómo se aplicó el diagrama CIE a los valores colorimétricos ya obtenidos y se puede apreciar con evidencia que las mediciones de creatina realizadas en este trabajo se encuentran aproximadamente en la región naranja-amarillento y la región rosa-naranja, dándonos como resultado unos colores con más tendencia a las tonalidades amarillo-naranjas. Y gracias al mapeo de los colores confirmamos de nueva

cuenta que los resultados son también positivos y los esperados, debido a que como se vislumbraba, mientras más concentración de creatina haya más oscuro o intenso se tornará el color de la muestra.



**Fig. 50. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de creatina (creatinasa).**

A continuación, la Tabla 6 recopila los límites de detección reportados en la bibliografía, comparado con el método desarrollado en este proyecto, el cual se considera que es aceptable ya que está dentro del rango de la mayoría de los métodos discutidos en la bibliografía presentada en la tabla.

**Tabla 6. Tabla comparativa del límite de detección creatina con respecto a otros trabajos.**

Analito sentido	Material/sistema de reconocimiento	Material de soporte	Biofluido/Muestra	Límite de detección	Nombre del artículo	Referencias
Creatina	Nanomateriales porosos nano formulados de óxido metálico mixto de baja dimensión (CuO.Mn <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . NiO)	Electrodo de carbón vítreo con nafión como aglutinante conductor	Muestras biológicas como sangre, suero y orina	21.63 ± 0.05 pM (2.836 ± 0.006 pg/mL)	An Electrochemical Approach for the Selective Detection of Cancer Metabolic Creatine Biomarker with Porous Nano-Formulated CMNO Materials Decorated Glassy Carbon Electrode	(Rahman <i>et al.</i> , 2020)
Creatina	Nanopartículas de óxido de cadmio (CdO NPs)	Electrodo de carbón vítreo y nafión como el conductor enlazante	Suero humano, suero de conejo y orina	50.0 ± 0.1 pM (6.55 ± 0.013 pg/mL)	Ultrasensitive and label-free detection of creatine based on CdO nanoparticles: a real sample approach	(Rahman <i>et al.</i> , 2017)
Creatina	Compuestos de guanidina y ninhidrina en solución alcalina	No mencionado	Suero, sangre, y orina	1.0x10 <sup>-7</sup> M (13.113 ng/mL)	Fluorimetric Determination of Creatine	(Conn, 1960)
Creatina	Complejo sarcosina oxidasa y creatinasa	Electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Muestras comerciales de creatina en polvo	2.0x10 <sup>-7</sup> mol/L (26.226 ng/mL)	An Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparticles-based amperometric biosensor for creatine determination	(Kaçar <i>et al.</i> , 2013)
Creatina y I-arginina	Ureasa, creatinasa, y arginasa	Policloruro de vinilo carboxilado	Soluciones de creatina y I-arginina	>10 <sup>-5</sup> M (1.3113 µg/mL)	Bienzomatic potentiometric electrodes for creatine and I-arginine determination	(Koncki <i>et al.</i> , 1996)
Creatina	Ureasa, creatinasa, sarcosina oxidasa y albúmina de suero bovino	Electrodo de membrana de polivinilcloruro de amonio que contiene ácido palmítico y matriz de polivinilferroceno	Muestras comerciales de creatina en polvo	1x10 <sup>-5</sup> M (1.3113 µg/mL) para el pot., y 2x10 <sup>-5</sup> M (2.6226 µg/mL) para el ampero.	Determination of Creatine in Commercial Creatine Powder with New Potentiometric and Amperometric Biosensors	(Karakuş <i>et al.</i> , 2006)
<b>Creatina</b>	<b>Creatininasa/O-dianisidina</b>	<b>Nanopartículas de quitosano inmovilizadas con NE-Q/TTP</b>	<b>Suero sanguíneo</b>	<b>0. 0676 mg/MI</b>	<b>Este trabajo</b>	<b>Este trabajo</b>
Creatina	Sarcosina oxidasa y cretina amidino hidrolasa	Electrodo de varilla de carbono	Solución buffer	No mencionado	Amperometric biosensor for the determination of creatine	(Ramanavicius, 2007)

### ***8.8 Evaluación enzimática de la sarcosina (sarcosina oxidasa).***

Los resultados de las evaluaciones de actividad enzimática de la creatinina, creatina y sarcosina tanto para las pruebas de sustrato, como de temperatura y pH fueron realizadas y comprobadas en la tesis de López (2024) también del laboratorio de BIOSENS de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Aeropuerto, y dichos resultados se tomaron como referencia para confirmar que la actividad enzimática aumenta y es más estable con inmovilización de las nanopartículas de quitosano en comparación con las macroesferas de quitosano, ya que se obtuvieron los mismos resultados que con la evaluación de la enzima uricasa, en cada una de las modalidades, corroborando que la aplicación de la nanotecnología ofrece e implica mejoras significativas pues la elección del soporte y del tipo de enlace es muy importante para obtener una buena actividad posterior del biocatalizador.

### ***8.9 Determinación colorimétrica de la sarcosina (sarcosina oxidasa).***

#### ***8.9.1 Determinación colorimétrica de sarcosina por muestras.***

Se realizaron las pruebas colorimétricas en solución en cerámica, y en la Figura 51 se puede observar el cambio colorimétrico de la sarcosina y cómo va ocurriendo la reacción, en este caso, se analizó esta biomolécula porque es parte de la reacción en cadena necesaria para poder analizar la creatinina, que es el analito de interés en este trabajo, por lo que su estudio requiere de esa misma reacción en cadena característica de la creatinina.

Como resultado se pudo dilucidar que a medida que aumenta la concentración del analito en las muestras, un color naranja-rojizo (incluso concordante con el color representativo del colorante o-Dianisidina) se formaba y se volvía cada vez más intenso respecto al cambio de concentración. Esto se debe a que en esta última parte de la reacción en cadena primero la sarcosina es oxidada por el oxígeno disuelto en presencia de la enzima sarcosina oxidasa, lo que produce formaldehído, glicina y peróxido ( $H_2O_2$ ); para que por después ese  $H_2O_2$  oxide el colorante o-Dianisidina por la presencia de peroxidasa de rábano picante, para que así,

dependiendo de la cantidad de sarcosina reaccionada y la creciente cantidad de peróxido liberado al aumentar la concentración del mismo, se obtenga un cambio colorimétrico con tonos cada vez más intensos.

Mediante la experimentación se determinó que conforme pasa el tiempo, y después de agregar todos los componentes a las muestras (descritos anteriormente en la sección 7.12), estas se vuelven cada vez más oscuras hasta alcanzar un color homogéneo.



**Fig. 51. Muestras colorimétricas de sarcosina (sarcosina oxidasa) en cerámica.**

### ***8.9.2 Determinación colorimétrica de sarcosina por RGB y distancias euclidianas.***

Primero se realizó un análisis de color RGB para poder distinguir la variación de color en las soluciones con respecto a la concentración, incluyendo el blanco, para ello se realizó la gráfica que se observa en la Figura 52, donde los valores RGB de las muestras van disminuyendo conforme aumenta la concentración de sarcosina, esto debido a que, en imágenes en color de 8 bits por canal, los valores de intensidad varían del color negro con valor de 0 hasta el color blanco con valor de 255 para cada uno de los componentes RGB (rojo, verde, azul), por lo tanto, al aumentar la concentración de sarcosina en la solución, el color se vuelve más intenso, por lo que los valores tenderán al cero que representa el negro y entre menos concentración el tono es más claro, por lo que los valores del pixel en RGB son más altos.

De acuerdo a la gráfica, cuando la muestra no posee concentración de sarcosina, los valores



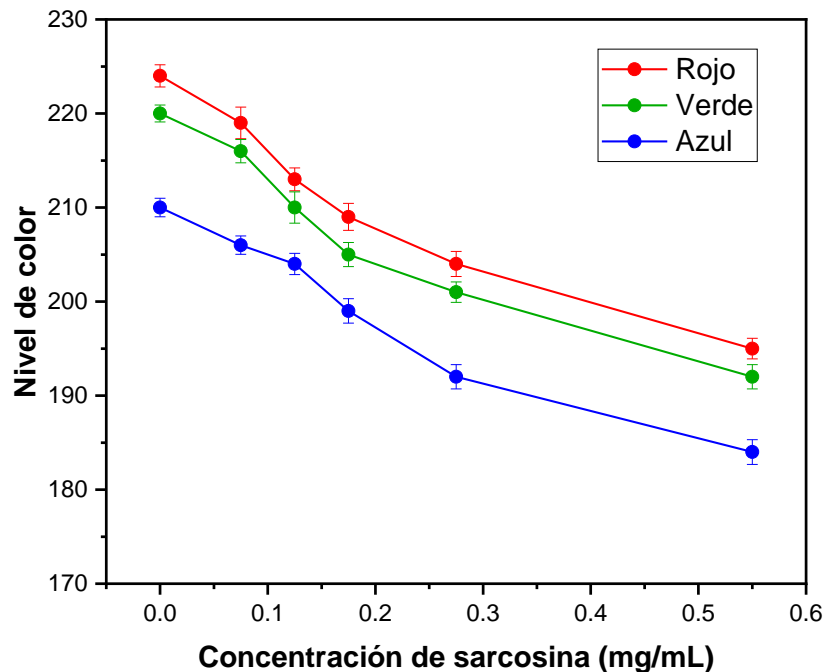
de RGB son los mayores, con rojo en valor de 225, verde de 220 y azul en 210, y que conforme se va incrementando la concentración los valores van disminuyendo hasta alcanzar 195 en rojo, 193 en verde y 183 en azul.

También se puede observar que el canal R de las pruebas colorimétricas es más alto debido al uso del colorante (o-Dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) que se empleó como sustrato de peroxidasa y el cual produce un producto final soluble de color rojo-anaranjado.

Y es así como se determina la concentración de sarcosina al hacer una relación entre el valor RGB y la concentración con solo obtener el valor RGB de un pixel, por lo que se llega a la conclusión acorde a los resultados de que si se obtienen valores altos de RGB la concentración del analito es menor y viceversa.

Gracias a esta gráfica también es posible apreciar que existe una tendencia visible para cada grupo de componentes, es decir, en el caso de las componentes R, la tendencia es decreciente conforme también incrementa la concentración de la sarcosina, confirmando así la presencia de los colores marrones-rojizos-anaranjados pertenecientes rango de R, y que coinciden con las intensidades y tonalidades obtenidas de las pruebas por muestras en cerámica con esos tonos más tendenciosos al color rojo-marrón-anaranjado que se apreciaban al incrementar la concentración a simple vista; y en el caso de las componentes G y B, ambas también tienen una tendencia de disminuir pero con un ritmo diferente, perdiendo más notoriamente el nivel de color hasta alcanzar el mínimo valor para cada una.

Está gráfica permite visualizar y confirmar que para el caso de la evaluación de la sarcosina, el color predominante es el de componentes R, por lo que incluso a simple vista esperaríamos ver colores con predominancia hacia los rojizos amarronados, o derivados cercanos de este color, como en este caso está entre los colores anaranjados-rojizos-amarronados.



**Fig. 52. Descomposición de los valores RGB obtenidos en las pruebas colorimétricas de sarcosina (sarcosina oxidasa).**

Otra forma de evaluar colorimétricamente es al simplificar los parámetros de color de manera estandarizada, y esto se logra al implementar un modelo de color cuyo propósito es calcular y arrojar donde se dan las coordenadas tridimensionales y el subespacio de este sistema, donde cada color está representando por un solo punto. Y para lograr lo anterior se hizo uso del método de la Distancia Euclidiana (DE) determinando así la diferencia de color computacionalmente lo cual se puede ver representado mediante la gráfica obtenida que se puede ver en la Figura 53.

Y en base a los resultados obtenidos en la Figura 53, se pueden aplicar valores para la

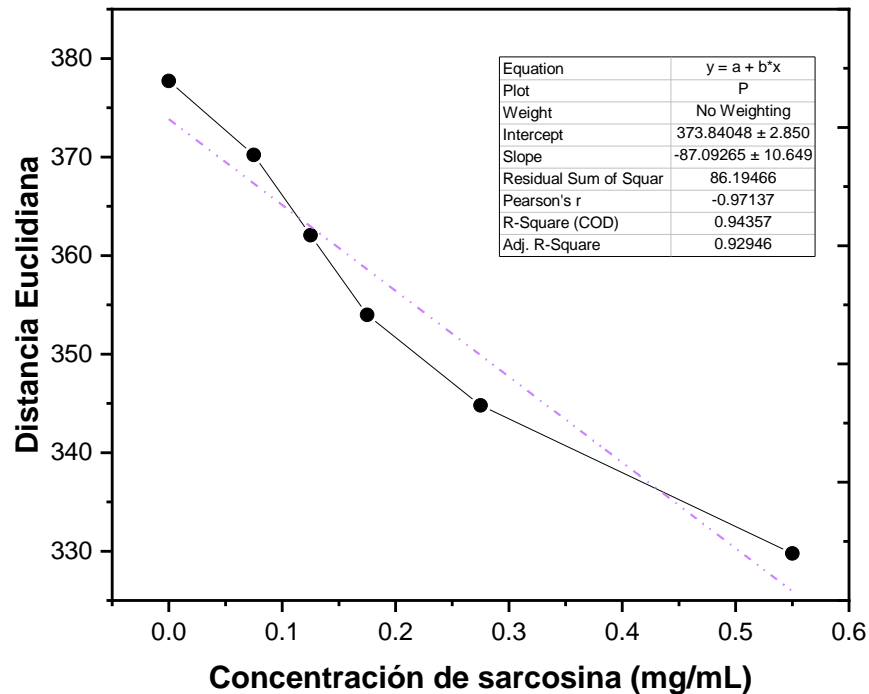


determinación del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), donde  $\sigma$  es la desviación estándar y  $s$  es la pendiente de la ecuación, en este caso para la evaluación de sarcosina es:

$$LOD = 3 \left( \frac{\sigma}{s} \right) = 3 \left( \frac{2.985}{87.09265} \right) = 0.1018 \text{ mg/mL}$$

$$LOQ = 10 \left( \frac{\sigma}{s} \right) = 10 \left( \frac{1.98627}{87.86906} \right) = 0.3394 \text{ mg/mL}$$

Además de lo anterior, con la Figura 53 que grafica la regresión lineal a partir de los datos colorimétricos, también se pudo encontrar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que a grandes rasgos, es el indicador de la relación lineal entre la distancia Euclidiana y la concentración del analito, que en este caso es la sarcosina, el cual fue de un valor  $R^2$  ya ajustado de 0.94357, lo que nos sugiere que el modelo, o la relación entre DE y concentración de sarcosina, aunque es predictivo es algo baja dentro de lo que se considera como el valor más aceptado del coeficiente de determinación perfecto que ronda los 0.998, aunque si cumple con una correlación fuerte del mismo. De igual manera, se obtuvo el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r$ ) con un valor de 0.97137, con el cual aún que sea más bajo que los obtenidos anteriormente en los otros analitos estudiados se puede confirmar y afirmar, ya no solo visualmente, que existe una muy buena y positiva relación lineal del cambio de color con las concentraciones del sustrato, su disminución de la relación del color y las concentraciones podría deberse a que es la sustancia que se contemplaba tuviera menor presencia en la reacción en cadena de la creatinina ya que se obtiene en el último paso de la misma.

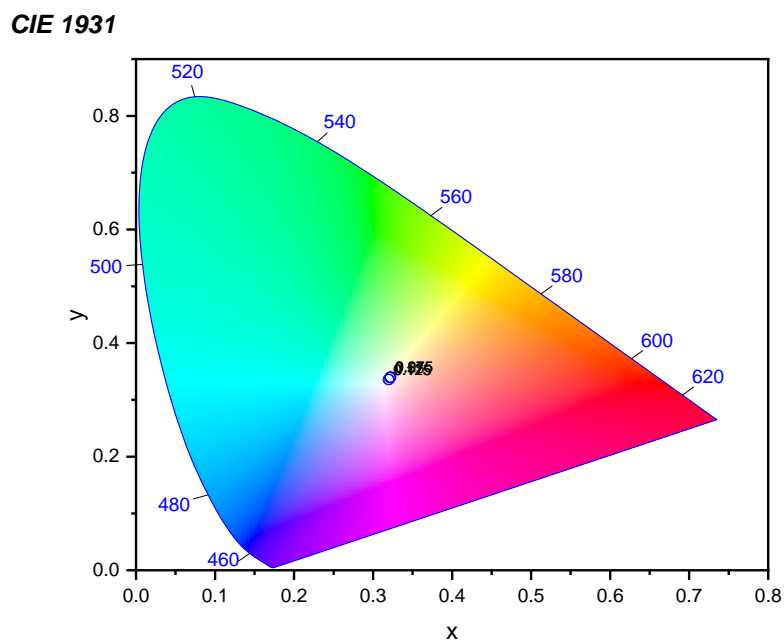


**Fig. 53. Curva de calibración de sarcosina (sarcosina oxidasa) a partir de valores RGB por el método de distancias Euclidianas.**

Por último, y no menos relevante, otra forma de evaluar y comprobar el cambio colorimétrico del analito analizado, es mediante la aplicación del histograma acromático CIE que ya fue explicado anteriormente en el apartado 8.3.2.

Por ello en la Figura 54 se puede observar cómo se aplicó el diagrama CIE a los valores colorimétricos ya obtenidos y se puede apreciar con evidencia que las mediciones de sarcosina realizadas en este trabajo se encuentran aproximadamente en la región naranja-amarillento y la región rosa-naranja, dándonos como resultado unos colores con más tendencia a las tonalidades marrón-naranja-rojiza. Y gracias al mapeo de los colores confirmamos de nueva

cuenta que los resultados son también positivos y los esperados, debido a que como se vislumbraba, mientras más concentración de sarcosina haya más oscuro o intenso se tornará el color de la muestra.



**Fig. 54. Distribución de colores obtenidos para el diagrama de cromaticidad CIE 1931 obtenido del algoritmo de lectura en mediciones de sarcosina (sarcosina oxidasa).**

A continuación, la Tabla 7 recopila los límites de detección reportados en la bibliografía, comparado con el método desarrollado en este proyecto, el cual se considera que es aceptable ya que está dentro del rango de la mayoría de los métodos discutidos en la bibliografía presentada en la tabla.

**Tabla 7. Tabla comparativa del límite de detección sarcosina con respecto a otros trabajos.**

Analito sentido	Material/sistema de reconocimiento	Material de soporte	Biofluido/Muestra	Límite de detección	Nombre del artículo	Referencias
Sarcosina	Nanopartículas de paladio	PdNPs/TMB	Orina	5.0 nM (0.4452 ng/mL)	Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles	(Lan <i>et al.</i> , 2014)
Sarcosina	Sarcosina oxidasa	CQDs-AuNRs-SOx	Orina	0.011 $\mu\text{mol/L}$ (0.9795 ng/mL)	Colorimetric determination of sarcosine in human urine with enzyme-like reaction mediated Au nanorods etching	(Zhong <i>et al.</i> , 2021)
Sarcosina	Riboflavina	Electrodo de carbón vítreo modificado con compósito de grafeno-quitosano modificado con nanopartículas bimetalicas de Au-Pt/Polipirrol	Orina contaminada	0.68 $\mu\text{M}$ (0.0605 $\mu\text{g/mL}$ )	An electrochemical sarcosine sensor based on biomimetic recognition	(Liu <i>et al.</i> , 2019)
Sarcosina	Sarcosina oxidasa-Peroxidasa del rábano picante	SOx-HRP	Orina	0.7 $\mu\text{M}$ (0.0623 $\mu\text{g/mL}$ )	Development of sarcosine quantification in urine based on enzyme-coupled colorimetric method for prostate cancer diagnosis	(Yamkamon <i>et al.</i> , 2018)
Sarcosina	Sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico	Óxido de grafeno	Medio alcalino	0.73 $\mu\text{M}$ (0.0650 $\mu\text{g/mL}$ )	An organic indicator functionalized graphene oxide nanocomposite-based colorimetric assay for the detection of sarcosine	(Xue <i>et al.</i> , 2016)
Sarcosina	Clorhidrato de poli(alilamina)	Clorhidrato de poli(alilamina)	Orina artificial	2.5 $\mu\text{M}$ (0.2226 $\mu\text{g/mL}$ )	Colorimetric paper-based sarcosine assay with improved sensitivity	(Masumoto <i>et al.</i> , 2022)

Sarcosina	Cavitando de tetrafosfonato supramolecular	Micro perlas magnéticas	Orina	30 $\mu$ M (2.6714 $\mu$ g/mL)	An electrochemiluminescence-supramolecular approach to sarcosine detection for early diagnosis of prostate cancer	(Valenti <i>et al.</i> , 2015)
<b>Sarcosina</b>	<b>Sarcosina oxidasa/O-dianisidina</b>	<b>Nanopartículas de quitosano inmovilizadas con NE-Q/TTP</b>	<b>Suero sanguíneo</b>	<b>0.1018 mg/mL</b>	<b>Este trabajo</b>	<b>Este trabajo</b>

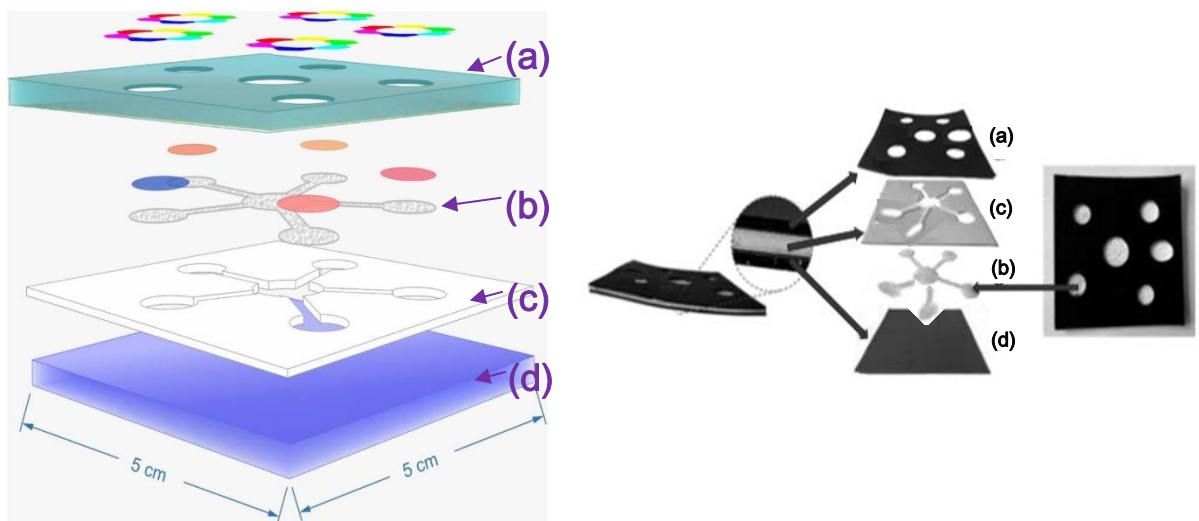
### 8.10 *Diseño del prototipo del biosensor colorimétrico.*

Se decidió por un diseño, creación y fabricación de un biosensor portátil, rápido, reproducible, accesible económicamente hablando, no invasivo, eficiente, específico y sensible a biomarcadores de creatinina (reacción enzimática en cadena (creatininasa, creatinasa y sarcosina oxidasa)), ácido úrico y pH para la detección de preeclampsia.

Se optó por una estructura cuadrada con dimensiones de 5 cm de largo que contiene unos canales microfluídicos en forma y dirección de “estrella”, ya que facilita el flujo de la muestra de suero sanguíneo que se compartimentará a los diversos caminos de cada pico para reaccionar en cada pozo con el microfluido correspondiente para cada analito en las áreas de reconocimiento y así conseguir respuestas individuales y compartimentados para cada bioensayo, todo este sistema se pensó y optimizó para que realizara un análisis colorimétrico completo, ulteriormente con el objetivo final y futuro de poderse adaptar a un dispositivo móvil inteligente por medio de la captación de la señal de la reacción colorimétrica sustraída de una captura de imagen, mejorando y perfeccionando así el diagnóstico, la lectura e interpretación de datos de una forma más fácil y

rápida, innovadora y adaptable a la vida actual tecnológica.

El diseño en estrella facilito el flujo uniforme de múltiples micro fluidos a las áreas de reconocimiento y así lograr obtener respuestas individuales para cada bioensayo.



**Fig. 55. Prototipo del dispositivo microfluídico basado en papel que cuantifica 4 analitos simultáneamente: (a) Capa hidrofóbica superior, (b) Capa fluidica de papel de celulosa, (c) Polímero que forman los microcanales y (d) Capa hidrofóbica inferior**

En la Figura 55 se muestra ejemplificado el diseño del prototipo del biosensor microfluídico, propuesto, primero modelado en 3D (imagen de la izquierda), y después realizado en papel (imagen de la derecha) en el cual se integran tintas cromogénicas, las cuales cuantifican los 4 analitos anteriormente mencionados de forma simultánea. El dispositivo cuenta con un diseño estructural 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 (a, b y d) creado por medio de una técnica que utiliza una cuchilla dirigida por un software de



computadora y un plotter de corte en lugar de tinta.

### ***9. Trabajo futuro.***

Desde mi perspectiva, el primer aspecto a perfeccionar sería poder optimizar las aplicaciones para disminuir los posibles sesgos de error dentro de los dispositivos posibles para que no haya variación de valores obtenidos entre ellos, considerando también si es posible los factores involucrados con la toma de lecturas, ya sea las condiciones de espacio, iluminación, color y/o condiciones ambientales.

Así como también se podrían mejorar aún más los límites de detección, puesto que, aunque si consiguen ser competitivos, aún hay espacio para optimizarlos. Y por último, también otro factor que podría ser mejorable sería la incorporación de dispositivos inteligentes, como celulares o tabletas, para que las lectura y el análisis de resultados se realice a través de los mismos de una forma aún más rápida y al alcance, junto con una fácil manipulación e implementación, para que se logre adaptar al vivir cotidiano en base a las necesidades tecnológicas y sociales actuales, prospectando así que el uso de estos dispositivos sea cada vez mayor, incrementando así su capacidad y alcance logrando así un mejoramiento en la portabilidad y eficiencia, además de conseguir concientizar sobre la prevención y cuidado de la enfermedad de la preeclampsia, además de que la misma metodología se podría aplicar y efectuar con un amplio potencial de aplicación en esta área de diagnóstico de enfermedades a muchas de ellas simplemente considerando los componentes enzimáticos relacionados a una biomolécula a detectar.

### ***10. Conclusiones.***

La importancia del enfoque y realización de este trabajo de tesis radica en que como se abordó anteriormente, con la preeclampsia a nivel global, reporta que cada 3 minutos muere una mujer a causa de la misma, y cerca de 50,000 mujeres mueren anualmente, afectando así entre el 3 y 10%



de los embarazos, logrando ser así la principal causa de muerte materna en el mundo; en México de igual forma es la primera causa de muerte materna y la primera causa obstétrica de ingreso a unidades de cuidados intensivos (American College of Obstetricians and Gynecologists ACOG, 2013), sin embargo, según las investigaciones recientes, se cree que hay una posibilidad de que hasta el 60% de dichas defunciones puedan ser evitables al realizar y garantizar un diagnóstico oportuno, ya que hasta hoy aún no existe un tratamiento definido (solo con preeclampsia con alto grado de severidad se procede a inducir el nacimiento del bebe lo más pronto posible) (Secretaria de Salud, 2017) (WHO World Health Organization, 2011).

Y a pesar de que la prevención de esta enfermedad es difícil porque no hay un método definido ni de diagnóstico ni de tratamiento, catalogándose así como una enfermedad silenciosa, proviniendo de ahí su nivel de riesgo e impacto negativo, en este trabajo de investigación se propuso y se desarrolló un biosensor microfluídico colorimétrico para que con la identificación de biomarcadores tempranos en el embarazo, como lo son la creatinina y el ácido úrico, se evalué la función renal y hepática, ya que en niveles altos de los mismos se determina si existe daño renal y hepático y se confirma la presencia de la preeclampsia, logrando así un control, monitoreo y diagnóstico a tiempo para evadir las complicaciones durante la gestación y de esta enfermedad, y así lograr evitar nacimientos prematuros y maximizar la supervivencia infantil y materna.

El biosensor propuesto confiere ventajas considerables con respecto a los métodos de diagnóstico existentes para dicho padecimiento, como que tiene un buen límite de detección y tiempo de respuesta, es de comprobación física y visible de forma clara ya que el resultado se muestra con una respuesta colorimétrica, que es de manipulación y operación sencilla y no invasiva, el ser un dispositivo portátil que permite realizar el examen desde cualquier lugar brindando comodidad y satisfaciendo urgencias, además de que posibilita el uso de volúmenes bajos y sin previa preparación de las muestras.

Respecto a la nanotecnología, se concluye que las nanopartículas de quitosano se pueden considerar como un material idóneo para la inmovilización de enzimas, gracias a que el grupo



funcional amino del quitosano permite realizar la inmovilización enzimática (Ghadi *et al.* 2015), otorgando características que brinda al ser un nanomaterial, tales como: que ayuda a poder tener un buen rendimiento de inmovilización de las enzimas, lo que conlleva a tener una mayor estabilidad y sensibilidad, junto con una mayor capacidad de detección, en este caso de los biomarcadores de preeclampsia; así como su bajo costo de producción, una catálisis amigable al medio ambiente, la propiedad de separación de producto, la posibilidad de recuperar y reutilizar las enzimas, el aumento de la estabilidad de la enzima frente a variaciones de pH y temperatura, su uso en aplicaciones sencillas de procesos enzimáticos continuos, una operación del reactor más sencilla (Arroyo, 1998 y Arabaci *et al.*, 2020), además de que cuando se habla en conjunto con nanomateriales se puede llegar a tener la capacidad de incrementar la relación de área de superficie a volumen, lo que incrementa la estabilidad de la enzima inmovilizada e incrementa el desempeño enzimático (Fatima *et al.*, 2021).

En términos de obtención de resultados, la inmovilización de la enzima uricasa sobre las nanoesferas (nanopartículas) de quitosano confirió el aumento de la actividad enzimática tanto con respecto a la concentración como al efecto de las diferentes temperaturas y pH, pues la tendencia de aumento de la actividad se mantuvo en comparación a las inmovilizadas con macroesferas de quitosano, y con valores muy similares a con la enzima en estado libre, exhibiendo que la estabilidad máxima es en una concentración de 1.675 mg/mL, un pH de 7.5 y una temperatura a partir de los 35 °C manteniéndose constante y estable, y con mayor actividad en el resto de los valores. En cuanto al acoplamiento enzimático, se obtuvo que cerca del 70% de la enzima se inmovilizó pasados los primeros 25 minutos, sin cambios significativos en el tiempo posterior en las nanoesferas de quitosano, lo que es muy buen resultado, ya que asigna una acoplamiento e índice de respuesta rápido y mejor en comparativa con solo el 45% de enzima inmovilizada con las macroesferas de quitosano en el mismo tiempo. Con ello, se consuma que la inmovilización a nivel nanométrico en el soporte elegido representa mayores beneficios para el dispositivo en general, ya que muestra estabilidad enzimática similar e incluso mejor en ciertos rangos, añadiendo como ventaja que la producción y síntesis que tanto el material de soporte como el método de inmovilización, es económico.



Con respecto a la precisión de las pruebas colorimétricas es posible afirmar que en general es bastante preciso, ya que todas las enzimas evaluadas (4, uricasa, creatinasa, creatinasa y sarcosina oxidasa), arrojaron a partir de las curvas de calibración un valor  $R^2$  mayor a 0.9, o lo que es, una precisión mayor del 90%, que para fines prácticos es un valor de sumamente aceptable, ya que representa que el biosensor posee una buena sensibilidad, rendimiento, estabilidad y capacidad de detección permitiéndolo ser una opción eficiente para aplicarse para el desarrollo de biosensores enzimáticos para la detección de preeclampsia. También, es importante mencionar que, a pesar de que los límites de detección para cada analito no son los reportados con valores más bajos en comparación a los marcados en la literatura, se puede afirmar que son bastante competitivos y entran dentro del mercado, además de que estos tienen la posibilidad de ser mejorados perfeccionando la medición añadiendo más rangos de evaluación de concentraciones.

En suma, el desarrollo de este proyecto de tesis permitió (gracias a los materiales, síntesis sencilla y métodos de evaluación aplicados) obtener diversos resultados con los cuales es posible sostener que el prototipo de biosensor colorimétrico demuestra una excelente alternativa confiable, accesible, económica, sencilla y eficiente para aplicarse para la detección, análisis, control y monitoreo de la preeclampsia.

## ***11. Referencias.***

Ache, G. (2018). Nanosportes de sílica biomimética para la inmovilización de enzimas. Universidad ORT Uruguay.

<https://dspace.ort.edu.uy/bitstream/handle/20.500.11968/3874/Material%20completo.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

Afshari E., Amini-Bayat Z., Hosseinkhani S., Bakhtiari N. (2017). Clonación, expresión y purificación de *Pseudomonas putida* ATCC12633 creatinasa. Revista Avicena de Biotecnología Médica. 9(4):169-175. PMID: 29090065; IDPM: PMC5650733.

- Alula, M. T., Karamchand, L., Hendricks, N. R., & Blackburn, J. M. (2018). Citrate-capped silver nanoparticles as a probe for sensitive and selective colorimetric and spectrophotometric sensing of creatinine in human urine. *Analytica Chimica Acta*, 1007, 40-49.
- American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). (2013). *Hypertension in Pregnancy*. Washington, DC. ISBN 978-1-934984-28-4. 9-89.  
<http://www.spog.org.pe/web/phocadownloadpap/HypertensioninPregnancy.pdf>
- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology advances*, 30(3), 512–523.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>
- Arabacı, N., Karaytuğ, T., Demirbas, A., Ocsoy, I., & Katı, A. (2020). Nanomaterials for Enzyme Immobilization. *Green Synthesis of Nanomaterials for Bioenergy Applications*, 1653190. doi:10.1002/9781119576785.ch7
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23339. <https://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>
- Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. 1998. 39 (2): 23-39.
- Asif, H. M., Zafar, F., Ahmad, K., Iqbal, A., Shaheen, G., Ansari, K. A., Rana, S., Zahid, R., & Ghaffar, S. (2023). Synthesis, characterization and evaluation of anti-arthritic and anti-inflammatory potential of curcumin loaded chitosan nanoparticles. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37152-7>
- Ayikpoe, R., Salazar, J., Majestic, B., & Latham, J. A. (2018). Mycofactocin Biosynthesis Proceeds through 3-Amino-5-[(p-hydroxyphenyl)methyl]-4,4-dimethyl-2-pyrrolidinone (AHDP); Direct Observation of MftE Specificity toward MftA. *Biochemistry*, 57(37), 5379–5383. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00816>

- Bainbridge, S. A., & Roberts, J. M. (2008). Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta*, 29 Suppl A (Suppl A), S67–S72. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.11.001>
- Battaner Arias, E. (2014). *Compendio de enzimología (1)*. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca.
- 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>
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004. 57: 19-34.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Beuth, B., Niefind, K., & Schomburg, D. (2003). 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)
- 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. 1240-6.
- Bloch K, Schoenheimer R. Studies in protein metabolism XI. The metabolic relation of creatine and creatinine studied with isotopic nitrogen. *J Biol Chem* 1939; 131(1): 111-119.
- Boix Cayuela, M. (2016). *Biosensores enzimáticos electroquímicos en la industria alimentaria*. Universidad Complutense. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARTA%20BOIX%20CAYUELA.pdf>

- Bravo, A. (2014). Hipertensión en el embarazo. México: Mc Graw Hill.
- Burgos, J. (2015). Evidencia actual sobre la prevención de la preeclampsia y su profilaxis. *Revista de Universidad del País Vasco*, 1(1), 20.
- Burton C., Gamagedara S., Ma Y., A novel enzymatic technique for determination of sarcosine in urine samples, *Anal Methods* 4 (2012), 141-146, <http://dx.doi.org/10.1039/c1ay05541k>.
- Busto, V., & Herrero, C. (2015). Pruebas de función hepática: B, AST, ALT, FA y GGT. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107(10), 648. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1130-01082015001000017&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082015001000017&lng=es&tlng=es).
- C. Macdonald-Wallis, R.J. Silverwood, B.L. de Stavola, H. Inskip, C. Cooper, K.M. Godfrey, *et al.* Antenatal blood pressure for prediction of pre-eclampsia, preterm birth, and small for gestational age babies: Development and validation in 2 general population cohorts. *BMJ*, 351. (2015). pp. h5948.
- C. Olson-Chen, N.S. Seligman. Hypertensive emergencies in pregnancy. *Crit Care Clin.* 32 (2016), pp. 29-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2015.08.006>
- C. Zhang, S. Luo, W. Chen, (2013), *Talanta*, 113, 142.
- Calvo, P., Remuñán, C., Vila J.L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 63: 125-132
- Cancer sharpshooters rely on DNA test for a better aim. *Science* (2004):305, 1222.
- Caparrós, S. (2013). Hipertensión arterial durante el embarazo y el puerperio. *ELSEVIER*, 17(7).
- Caro, F. J., López, L. M., Lizardi, J., Argüelles, W., Goycoolea, F. M., Carvajal, E., & López, Y. L. (2019). Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: una revisión. *Biotecnia*,

21(3), 13–25. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i3.1007>

Carvajal JA, Ralph C. Manual de ginecología y obstetricia. 8th ed. Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile; 2017.

Cascales, M., Gómez-Lechon, M.J. O'Connor, J.E. (Eds), (2005): Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabólica. Modernas Tecnologías Para el Desarrollo de Fármacos. Monografía XVII, Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia.

Chen, Y., Zhou, W., Ma, J., Ruan, F., Qi, X., & Cai, Y. (2020). Potential of a sensitive uric acid biosensor fabricated using hydroxyapatite nanowire/reduced graphene oxide/gold nanoparticle. *Microsc. Res. Tech.* 83 (3) 268–275, <https://doi.org/10.1002/JEMT.23410>.

Choi, J., Bhandodkar, A. J., Reeder, J. T., Ray, T. R., Turnquist, A., Kim, S. B., Nyberg, N., Hourlier-Fargette, A., Model, J. B., Aranyosi, A. J., Xu, S., Ghaffari, R., & Rogers, J. A. (2019). Soft, Skin-Integrated Multifunctional Microfluidic Systems for Accurate Colorimetric Analysis of Sweat Biomarkers and Temperature. *ACS sensors*, 4(2), 379–388. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01218>

Christensson, A., Ekberg, J., Grubb, A., Ekberg, H., Lindström, V., & Lilja, H. (2003). Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. *Nephron. Physiology*, 94(2), p19–p27. <https://doi.org/10.1159/000071287>

Ciero, M., Rodríguez, D., & Fernández, F. (2014). Hipertensión arterial: riesgos para la madre y el bebé. *Pharmacy Practice*, 1(3), 18.

Clark, L.C. Jnr. (1956): Monitor and control of blood and tissue O<sub>2</sub> tensions. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 2, 41-48.

Clinique (2011). A multicentric evaluation of IDMS-traceable creatinine enzymatic assays. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412(23-24), 2070–2075.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.012>

Coll M *et al.* (1990), *J Mol Biol*, 214, 597-610. Mecanismo enzimático de la creatina amidinohidrolasa como se deduce de las estructuras cristalinas. DOI: 10.1016/0022-2836(90)90201-v . PMID: 1696320 .

Conn Jr, RB (1960). Determinación fluorimétrica de creatina. *Química clínica*, 6 (6), 537-548.

Correa, Daniel & Tayalia, Prakriti & Cosendey, Gatien & Santos, Dilson & Aroca, Ricardo & Mazur, Eric & Mendonca, Cleber. (2009). Two-Photon Polymerization for Fabricating Structures Containing the Biopolymer Chitosan. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 9. 5845-9. 10.1166/jnn.2009.1292.

Cortón, Eduardo. (2000). Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3221\\_Corton.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3221_Corton.pdf)

Cunningham G., McDonald P., Gant N., 20ª edición. *Obstetricia de Williams “Trastornos hipertensivos durante el embarazo”*, Mc Graw Hill, España. 1999.

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental chemistry letters*, 16(1), 101-112.

Dosanjh, N.; Kaur, J. Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus sp.* *Biotechnology and applied biochemistry*. 2002. 36: 7-12.

Du, H., Chen, R., Du, J., Fan, J., & Peng, X. (2016). Gold nanoparticle-based colorimetric recognition of creatinine with good selectivity and sensitivity. *Industrial & Engineering*

- Chemistry Research, 55(48), 12334-12340.
- Du, J., Zhu, B., Leow, W. R., Chen, S., Sum, T. C., Peng, X., & Chen, X. (2015). Colorimetric Detection of Creatinine Based on Plasmonic Nanoparticles via Synergistic Coordination Chemistry. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 11(33), 4104-4110.
- Dunee. (2012). Difference Between Colorimeter and Spectrophotometer. <https://www.differencebetween.com/difference-between-colorimeter-and-vs-spectrophotometer/>
- Edachana, R. P., Kumaresan, A., Balasubramanian, V. *et al.* (2019). Paper-based device for the colorimetric assay of bilirubin based on in-situ formation of gold nanoparticles. *Microchim Acta* 187, 60. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-4051-z>
- Edwards, H. (2005). *Modern Raman spectroscopy—a practical approach*. Ewen Smith and Geoffrey Dent. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2005. Pp. 210. ISBN 0 471 49668 5 (cloth, hb); 0 471 49794 0 (pbk). *Journal of Raman Spectroscopy - J RAMAN SPECTROSC.* 36. 835-835. 10.1002/jrs.1320.
- Ehlers, M. (2005): *Drug Discovery & Development*. Aug vol. 8 Issue 8, p.12.
- Fan Y., Li J., Guo Y., Xie L., Zhang G. (2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review, *Measurement*, Volume 171.
- Fatima, Zarish, & Quazi, Sameer. (2021). Use of nanomaterials for the immobilization of industrially important enzymes. *European Journal of Biological Research*, 11(3), 3813 391. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5148938>
- Fennema, O. R.; Powrie, W. D.; Marth, E. H., *Low temperature preservation of foods and living matter*. Marcel Dekker: New York, 1973.
- Filippova, I. Y.; Bacheva, A. V.; Baivak, O. B.; Plieva, F. M.; Lysogorskaya, E. N.; Oksenoit., E. S.; Lozinsky, V. *Proteinases immobilized on poly(vinil alcohol) cryogel: a novel*

- biocatalysts for peptide synthesis in organic media. *Russian Chemical Bulletin*. 2001. 50: 1986.
- Flores Loayza E, Rojas López F, Valencia Cuevas DE, Correa López L. Preeclampsia y sus principales factores de riesgo. Perú: Universidad Ricardo Palma; 2017. <http://v-beta.urp.edu.pe/pdf/id/9183/n/preeclampsia-y-sus-principales-factores-de-riesgo.pdf>
- Friedman, T. B., Polanco, G. E., Appold, J. C. & Mayle, J. E. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* B 81, 653-659.
- Furukawa, S.-y.; Ono, T.; Ijima, H.; Kawakami, K. Enhancement of activity of sol-gel immobilized lipase in organic media by pretreatment with substrate analogues. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2001. 15 (1-3): 65-70.
- García, A.A., & Rojas, J.S. (1985). Determinación de proteínas en hojas de Citrus. I. Métodos e interferencias. <https://revistas.um.es/analesumciencias/article/view/100481/95851>
- Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Roshan, F.T., Alavije, R.S. (2015) Fabrication and characterization of core-shell magnetic chitosan nanoparticles as a novel carrier for immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase. *Journal of Oleo Science* 64(4):423–430
- Giraldo, JD, Campos-Requena, VH y Rivas, BL (2018). Grano de quitosano-tripolifosfato: las interacciones que gobiernan su formación. *Boletín de polímeros*, 1-25.
- Gota. (2014). *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 57(4), 58-60. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422014000400058&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422014000400058&lng=es&tlng=es)
- Gutiérrez Santana D, Balderas Pedrero M. Preeclampsia y eclampsia. [Tesis]. Morelia, Michoacán: UNAM; 2017. pp. 1-3, 19-38. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/preeclampsia-y-eclampsia->

433334?c=4MEeZ4&d=false&q=\*&i=1&v=1&t=search\_0&as=2

- Habibi, B. & Pournaghi M. (2010). Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by use of a MWCNT modified carbon-ceramic electrode and differential pulse voltammetry. *Electrochim. Acta* 55 (19) 5492–5498. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2010.04.052>.
- Handbook GEb. (2006). *Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography: Principles and Methods*. GE Healthcare. Uppsala Sweden Mary Ann Wagner, Marilyn Schuman Jorns (1997), *Folate Utilization by Monomeric versus Heterotetrameric Sarcosine Oxidases*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 342, Issue 1. Pages 176-181, ISSN 0003-9861, <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0106>.
- He, Y., Zhang, X., & Yu, H. (2015). Gold nanoparticles-based colorimetric and visual creatinine assay. *Microchimica acta*, 182, 2037-2043.
- Hemalatha, T., UmaMaheswari, T., Krithiga, G., Sankaranarayanan, P., & Puvanakrishnan, R. (2013). Enzymes in clinical medicine: an overview. *Indian journal of experimental biology*, 51(10), 777–788. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/21446>
- Hernández Restrepo, F., Perilla Hernández, N., Martínez Sánchez, L. M., & Ruiz Mejía, C. (2017). Biomarcadores moleculares: una nueva herramienta en el diagnóstico de la preeclampsia. *Clinica e Investigación en Ginecología y Obstetricia*, 44(2), 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.gine.2016.04.001>
- Hernández, K. (2021). Espectroscopia Raman para caracterizar e identificar biomarcadores [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/8018>
- Herrera Sánchez K. Preeclampsia. Medigraphic.com; 2018. <https://www.medigraphic.com/pdfs/sinergia/rms-2018/rms183b.pdf>

- Hoeffken HW, Knof SH, Bartlett PA, Huber R, Moellering H, Schumacher G. Crystal structure determination, refinement and molecular model of creatine amidinohydrolase from *Pseudomonas putida*. *J Mol Biol* 1988; 204(2):417-433.
- Hsu, A. F.; Foglia, T. A.; Shen, S. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase in a phyllosilicate sol-gel matrix: effectiveness as a biocatalyst. *Biotechnol Appl Biochem*. 2000. 31: 179-83.
- J. Botero, A. Júbiz, G. Henao. *Obstetricia y Ginecología*. 8.ª ed., CIB, (2008).
- J.M. Pauli, J.T. Repke. Preeclampsia: Short-term and long-term implications. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, 42 (2015), pp. 299-313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ogc.2015.01.007>
- Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., Sijiao, L. (2004): Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology Advances* 22, 505-518.
- Jiménez C, C., & León P, D. E. (2009). Biosensores: Aplicaciones y Perspectivas en el Control y Calidad de Procesos y Productos Alimenticios. *Vitae*, 16(1), 144-154.
- Jun Kong, Zijie Li, Huijie Zhang, Xiao-Dong Gao & Hideki Nakanishi (2017) Producción de creatinasa encapsulada usando esporas de levadura, *Bioingeniería*, 8:4, 411-419, DOI: 10.1080/21655979.2016.1241926
- Kaçar, C., Erden, P. E., Pekyardimci, Ş., & Kiliç, E. (2013). An Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-nanoparticles-based amperometric biosensor for creatine determination. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41(1), 2-7.
- Kahdestani, S. A., Shahriari, M. H., & Abdouss, M. (2020). Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles containing teicoplanin using SoL-gel. *Polymer Bulletin*, 78(2), 1133-1148. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03134-2>
- Kamat, V., Bodas, D., & Paknikar, K. M. (2016). Chitosan nanoparticles synthesis caught in

action using microdroplet reactions. *Scientific Reports*, 6(1).  
<https://doi.org/10.1038/srep22260>

Kanagasabai S. (2010). Biochemical Markers in the prediction of pre-eclampsia, Are We There Yet? *Journal of Gynecology and Obstetrics*; 14(1): 1-10. Disponible en: <http://ispub.com/IJGO/14/1/4750>.

Kar M. Role of Biomarkers in Early Detection of Preeclampsia. *J Clin Diagn Res*; 2014; 8(4):1-4. Acceso 21 de agosto 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064886/>

Karakuş, E., Erden, P. E., & Pekyardımcı, Ş. (2006). Determination of creatine in commercial creatine powder with new potentiometric and amperometric biosensors. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, 34(3), 337-347.

Khare, S. K.; Nakajima, M. Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. *Food Chemistry*. 2000. 68 (2): 153-157.

Killard, Anthony & Smyth, Malcolm. (2000). Creatinine biosensors: Principles and designs. *Trends in Biotechnology*. 18. 433-437. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01491-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01491-8)

Kim, J., Imani, S., de Araujo, W., Warchall, J., Valdés, G., Paixão, T., Mercier, P., & Wang, J. (2015). Wearable salivary uric acid mouthguard biosensor with integrated wireless electronics. *Biosens Bioelectron*; 74:1061-8. doi: 10.1016/j.bios.2015.07.039. PMID: 26276541; PMCID: PMC4718709.

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., Balooch, G., & Rogers, J. A. (2016). A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat. *Science translational medicine*, 8(366), 366ra165. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2593>

- Koncki, R., Wałcerz, I., Ruckruh, F., & Głab, S. (1996). Bienzymatic potentiometric electrodes for creatine and L-arginine determination. *Analytica chimica acta*, 333(3), 215-222.
- Lad, U., Khokhar, S., & Kale, G. M. (2008). Electrochemical creatinine biosensors. *Analytical chemistry*, 80(21), 7910–7917. <https://doi.org/10.1021/ac801500t>
- Lad, U., Khokhar, S., & Kale, G. M. (2008). Electrochemical Creatinine Biosensors. *Analytical Chemistry*, 80(21), 791037917. <https://doi.org/10.1021/ac801500t>
- Lan, J., Xu, W., Wan, Q., Zhang, X., Lin, J., Chen, J., y Chen, J. (2014). Determinación colorimétrica de sarcosina en muestras de orina de carcinoma prostático mediante nanopartículas de paladio que imitan la enzima. *Analytica chimica acta*, 825, 63-68.
- Lapidus Sahe A, Lopez Sahe N, Malamud Rosario J, Nores Fierro Córdoba J, Papa Mendoza S. Estados hipertensivos y embarazo. Córdoba, Argentina: FASGO; 2017. [http://www.fasgo.org.ar/archivos/consensos/Consenso\\_Fasgo\\_2017\\_Hipertension\\_y\\_embarazo.pdf](http://www.fasgo.org.ar/archivos/consensos/Consenso_Fasgo_2017_Hipertension_y_embarazo.pdf)
- Leiro Escribano, P. (2022). Nanopartículas de quitosano y fosvitina, caracterización y aplicaciones en la industria alimentaria. Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria. pp 27-29. <http://hdl.handle.net/10651/64131>
- Liu, T., Fu, B., Chen, J., & Li, K. (2019). An electrochemical sarcosine sensor based on biomimetic recognition. *Microchimica acta*, 186, 1-8.
- López, E., Also, E., & Vilaseca, M. (2014). Hipercolesterolemia materna durante el embarazo. *ELSEVIER*, 121(9), 1.
- López, J. (2024). Cinta para Detección Colorimétrica Multi-Sensora para Marcadores de Daño Renal [Tesis de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/10918/1/IGLIN-280921%20%28PDF-A%29.pdf>

- Lopez-Leon T, Carvalho ELS, Seijo B, Ortega-Vinuesa JL, BastosGonzalez D (2005) Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J Colloid Interface Sci* 283(2):344–351.
- Malhotra, B. D., & Ali, M. A. (2018). Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. *Nanomaterials for Biosensors*, 1374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7>
- Martínez Ruiz, A. (2013). Marcadores Bioquímicos Predictores de Preeclampsia Dra. Ana. AEFA Facultativo Especialista en Análisis Clínicos. [https://www.aefa.es/wp-content/uploads/2014/08/Trabajo\\_completo.pdf](https://www.aefa.es/wp-content/uploads/2014/08/Trabajo_completo.pdf)
- Masumoto, M., Ohta, S., Nakagawa, M., Hiruta, Y., & Citterio, D. (2022). Colorimetric paper-based sarcosine assay with improved sensitivity. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1-11.
- Mehta, R. L., Kellum, J. A., Shah, S. V., Molitoris, B. A., Ronco, C., Warnock, D. G., Levin, A., & Acute Kidney Injury Network. (2007). Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical care (London, England)*, 11(2), R31. <https://doi.org/10.1186/cc5713>
- Mustafa, R., Ahmed, S., Gupta, A., & Venuto, R. C. (2012). A comprehensive review of hypertension in pregnancy. *Journal of pregnancy*, 2012, 105918. <https://doi.org/10.1155/2012/105918>
- Narayanan S, Appleton HD. Creatinine: a review. *Clin Chem* 1980; 26(8):1119-1126.
- Nicolle, L., Journot, C. M. A., & Gerber-Lemaire, S. (2021). Chitosan Functionalization: Covalent and Non-Covalent Interactions and Their Characterization. *Polymers*, 13(23), 4118. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/polym13234118>
- Nieh, C. H., Tsujimura, S., Shirai, O., & Kano, K. (2013). Amperometric biosensor based on

- reductive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection using pentacyanoferrate-bound polymer for creatinine determination. *Analytica chimica acta*, 767, 128–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.052>
- Nieves, A., Bárcena, J., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Toribio, F., & Túnez, I. (2017). 8. Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. [https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf)
- Nirmala, R. & Il, Baek & Navamathavan, R. & El-Newehy, Mohamed & Kim, Hak. (2011). Preparation and characterizations of anisotropic chitosan nanofibers via electrospinning. *Macromolecular Research - MACROMOL RES.* 19. 345-350. 10.1007/s13233-011-0402-2.
- Nirmala, R., Il, B. W., Navamathavan, R., El-Newehy, M. H., & Kim, H. Y. (2011). Preparation and characterizations of anisotropic chitosan nanofibers via electrospinning. *Macromolecular Research*, 19(4), 345–350. doi:10.1007/s13233-011-0402-2
- Nishan, U., Ullah, W., Muhammad, N., Asad, M., Afridi, S., Khan, M., Shah, M., Khan, N., and Rahim, A. (2022). Development of a Nonenzymatic Colorimetric Sensor for the Detection of Uric Acid Based on Ionic Liquid-Mediated Nickel Nanostructures. *ACS Omega*. 7 (30), 26983-26991. DOI: 10.1021/acsomega.2c04070
- Noroña Calvachi, Carlos Danilo. (2014). Preeclampsia: la Era de los Marcadores Bioquímicos. *Revista Científica Ciencia Médica*, 17(2), 32-38. Recuperado en 14 de marzo de 2023, de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1817-74332014000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332014000200008&lng=es&tlng=es).
- Nur, E., Noor, I., Jaafar, A., Mohammad, A., Hamidah, S., Samsulida, A., Nurhayati, A., & Nor, A. (2015). A simple and sensitive fluorescence based biosensor for the determination of uric acid using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive quantum dots/dual enzymes, *Biosensors*

and Bioelectronics, Volume 67. Pages 129-133, ISSN 0956-5663,  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.056>.

Orrego, C. E.; Valencia, J. S. Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2009. 32 (2): 197-206.

Orrego, C. E.; Valencia, J. S.; Zapata, C. Candida rugosa Lipase Supported on High Crystallinity Chitosan as Biocatalyst for the Synthesis of 1-Butyl Oleate Catalysis Letters. 2009. 129 (3/4): 312-322.

Ortega Ortiz de Apodaca, F. (2006). *Biosensores y Biochips: Herramientas para el Diagnóstico y la Terapéutica*. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia.  
<https://www.ranf.com/wp-content/uploads/academicos/discursos/numero/fidel.pdf>

Othman, Abdelmageed M, González-Domínguez, Elena, Sanromán, Ángeles, Correa-Duarte, Miguel, Moldes, Diego (2016). *Immobilization of laccase on functionalized multiwalled carbon nanotube membranes and application for dye decolorization*. RSC Advances, The Royal Society of Chemistry. doi: 10.1039/C6RA18283F

P. Wu, C. van den Berg, Z. Alfircic, S. O'Brien, M. Röthlisberger, P.N. Baker, *et al.* Early pregnancy biomarkers in preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.*, 16 (2015), pp. 23035-23056. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160923035>

Pacheco, J. (2018). Nuevas consideraciones sobre las enfermedades hipertensivas del embarazo Carga de las enfermedades no transmisibles en la mujer posmenopáusicas. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, [S.l.], v. 64, n. 3, 321-329. ISSN 2304-5132.  
<https://doi.org/10.31403/rpgo.v64i2092>

Padmanabhan B, Paehler A, Horikoshi M. Structure of creatine amidinohydrolase from *Actinobacillus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002; 58(Pt 8):1322-1328.

- Parmar, A. K., Valand, N. N., Solanki, K. B., & Menon, S. K. (2016). Picric acid capped silver nanoparticles as a probe for colorimetric sensing of creatinine in human blood and cerebrospinal fluid samples. *Analyst*, 141(4), 1488-1498.
- Peppas NA, Huang Y (2004) Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(11):1675–1687
- Pereira, E. B.; Zanin, G. M.; Castro, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2003. 20: 343 - 355.
- Perera U, Rajapakse N. (2013). Chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and applications. In: Kim SK (ed.) *Seafood processing by-products: trends and applications*. Springer, Nueva York, pp 371–387
- Phuadraksa, T., Chittrakanwong, J., Tullayaprayouch, K., Onsirisakul, N., Wichit, S., & Yainoy, S. (2020). Engineering of Bifunctional Enzymes with Uricase and Peroxidase Activities for Simple and Rapid Quantification of Uric Acid in Biological Samples. *Catalysts*, 10(4), 428. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/catal10040428>
- Piéroni, L., Delanaye, P., Boutten, A., Bargnoux, A. S., Rozet, E., Delatour, V., Carlier, M. C., Hanser, A. M., Cavalier, E., Froissart, M., Cristol, J. P., & Société Française de Biologie
- Pitts, O. M. & Fish, W. W. (1974) *Biochemistry* 13, 888-892.
- Potter, J., & Nestel, P. (2014). *Lahiperlipidemia del embarazo en condiciones normales y embarazos complicados*. New Jersey, USA: Revista Obstétrica y Ginecológica.
- Powers, R. W., Bodnar, L. M., Ness, R. B., Cooper, K. M., Gallaher, M. J., Frank, M. P., Daftary, A. R., & Roberts, J. M. (2006). Uric acid concentrations in early pregnancy among preeclamptic women with gestational hyperuricemia at delivery. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.066>

- Putzbach, W., & Ronkainen, N.J. (2013). Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* (Basel, Switzerland), 13, 4811 - 4840.
- Q. Zhu, L. Zhang, X. Chen, J. Zhou, J. Liu, J. Chen. Association between zinc level and the risk of preeclampsia: A meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.*, 293 (2016), pp. 377-382. <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-015-3883-y>
- R. Pluta, M. Ułamek-Kozioł, W. Furmaga Jabłońska, S.J. Czuczwar. Preeclampsia in the 21st century: Unresolved questions concerning etiology. *Nutrition*; 31 (2015), pp. 1179-1181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2015.04.016>
- R. Shekher, S. Sehgal, M. Kamthania, A. Kumar. (2011), *Enzyme* (Res., Article ID 217861
- Rahman, M. M., Alam, M. M., Asiri, A. M., & Opo, F. A. (2020). An electrochemical approach for the selective detection of cancer metabolic creatine biomarker with porous nano-formulated CMNO materials decorated glassy carbon electrode. *Sensors*, 20(24), 7060.
- Rahman, M. M., Hussain, M. M., & Asiri, A. M. (2017). Ultrasensitive and label-free detection of creatine based on CdO nanoparticles: a real sample approach. *New Journal of Chemistry*, 41(14), 6667-6677.
- Ramanavicius, A. (2007). Amperometric biosensor for the determination of creatine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387, 1899-1906.
- Rangel, S. X., García, J., & Orrego, C. E. (2011). Inmovilización de Lipasa de Candida Antarctica Sobre Soportes de Quitosano-Gelatina. *Revista Colombiana de Química*, 40(2), 149-163.
- Ren, X. D., Liu, Q. S., Feng, H., & Yin, X. Y. (2014). The Characterization of Chitosan Nanoparticles by Raman Spectroscopy. *Applied Mechanics and Materials*, 665, 367–370. [doi:10.4028/www.scientific.net/amm.665.367](http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.665.367)

- Reyes, J. & Quiroa, W. (2012). RACTICA No.2: Ley de Beer-Lambert II. Curvas de Calibración y Método Estadístico de Mínimos Cuadrados. <https://sisoyyomismo.wordpress.com/wp-content/uploads/2012/02/practica-2-instrumental-qb.pdf>
- Ribeiro EF, de Barros-Alexandrino TT, Assis OBG, et al. (2020). Chitosan and crosslinked chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and their role as Pickering emulsifiers. *Carbohydrate Polymers*. 250:116878. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116878. PMID: 33049877.
- Rieder, M.J., Reiner, A.P., Gage, B.F., Nickerson, D.A., Eby, C.S., Mcleod, H.L., Blough, D.K., Thummel, K.E., Veenstra, D.L., Rettie, A.E. (2005): Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Eng. J. Med.* 352, 2285-2293.
- Ryan O; Smyth M.R.; Fagain C.O.; *Essays Biochem.* 28 (1994) 129
- S. Boncel, A. Zniszczoł, K. Szymańska, J. Mrowiec-Białoń, A. Jarzębski, K.Z. Walczak.(2013) *Enzyme Microb. Technol.*, 53.
- Salazar, J. A., Lizardi, J., Ramírez, J. C., García, G., Ezquerra, J. M., Valenzuela, E. M., Carvalho, M. G., Lugo, M. E., & Pacheco, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(1), 129-150. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382014000100011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382014000100011&lng=es&tlng=es).
- Sánchez Amador, S. (2020). Marcadores bioquímicos. <https://muysalud.com/bioquimica/marcadores-bioquimicos/>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>

Secretaría de Salud. (2017). Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la preeclampsia en el segundo y tercer nivel de atención. México. Guía de Práctica Clínica. Disponible en: <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/S-020-08/ER.pdf>

Sergeyeva, T. A., Gorbach, L. A., Piletska, E. V., Piletsky, S. A., Brovko, O. O., Honcharova, L. A., ... & El'skaya, A. V. (2013). Colorimetric test-systems for creatinine detection based on composite molecularly imprinted polymer membranes. *Analytica chimica acta*, 770, 161-168.

Service, R.F. (2005): Pharmacogenomics: Going from genome to pill. *Science* 308, 1858-1860.

Sigma Aldrich. (1994). SIGMA QUALITY CONTROL TEST PROCEDURE Enzymatic Assay of XANTHINE OXIDASE (EC 1.1.3.22). <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/184/938/x2252enz.pdf>

Sigma Aldrich. (2004). Protein Determination Modified Lowry Method <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-quantitation/protein-determination>

Singer T. P. *Biological Oxidations*. Editor. Interscience Publishers, New York. (1968).

Singh, A., Mittal, A., & Benjakul, S. (2021). Chitosan nanoparticles: Preparation, food applications and health benefits. *Science Asia*, 47, 1-10.

Sivasankaran, U., Jos, T. C., & Kumar, K. G. (2018). Selective recognition of creatinine—development of a colorimetric sensor. *Analytical biochemistry*, 544, 1-6.

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

Stevens, H., Wide-Swensson, D., Torffvit, O., & Grubb, A. (2013). Cistatina sérica C para evaluación de la tasa de filtración glomerular en mujeres embarazadas y no embarazadas.

New Jersey, USA: Revista Gineco Obstétrica.

Suh, J. K. F.; Matthew, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000. 21: 2589-2598.

Suzuki, M. (1981) *J. Biochemistry* 89, 599-607.

Timberlake, K. (2013). *Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida*. México: Pearson Educación.

Tsuru D, Oka I, Yoshimoto T. Creatinine decomposing enzymes in *Pseudomonas putida*. *Agric Biol Chem* 1976; 40(5):1011-1018.

Turner AP, Newman JD. An introduction to biosensor. En: *Biosensor for Food Analysis*, T. W. Gateshead, Ed. London, U.K.: Athaenaeum; 1998. p. 13–27. 2.

Turner, A.P.F., Karube, I., & Wilson, G.S. (1987): *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford. 770p.

Valenti, G., Rampazzo, E., Biavardi, E., Villani, E., Fracasso, G., Marcaccio, M., & Prodi, L. (2015). An electrochemiluminescence-supramolecular approach to sarcosine detection for early diagnosis of prostate cancer. *Faraday discussions*, 185, 299-309.

Vásquez, J., & Rico, E. (2015). Papel del ácido úrico en la preeclampsia-eclampsia. *Revista Ginecología Obstetricia Mexicana*, 79(5), 1-6.

Vázquez, J. G., & Isla, M. X. (2018). Correlación entre ácido úrico y creatinina sérica en pacientes embarazadas con preeclampsia severa. *Ginecol Obstet Mex*. 86(9):567-574. <https://doi.org/10.24245/gom.v86i9.1229>

Vázquez, J. G., & Rico, E. I. (2016). Complicaciones maternas en pacientes con preeclampsia e hiperuricemia tratadas en la unidad de cuidados intensivos. *Ginecol Obstet Mex*. 84(3):143-149. <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2016/gom163d.pdf>

- Vázquez, J. G., & Rico, E. I. (2016). Papel del ácido úrico en la preeclampsia-eclampsia. *Ginecol Obstet Mex.* 2011; 79(05):292-297. <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2011/gom115f.pdf>
- Velásquez, E., Han, J., Choi, J., Yang, K., & Nava, A. (2013). Bloqueantes del receptor de angiotensina II en el embarazo. New Jersey, USA: EPUB.
- Velumani, Varsha, Durán Cárdenas, Cassandra, & Hernández Gutiérrez, Laura Silvia. (2021). Preeclampsia: una mirada a una enfermedad mortal. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 64(5), 7-18. Epub 03 de febrero de 2022. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2021.64.5.02>
- Voto, L. (2015). Hipertensión en el embarazo. Buenos Aires: CORPUS
- WHO World Health Organization. (2011). Who recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. 1-5. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548335\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548335_eng.pdf?ua=1)
- Wu, X. W., Lee, C. C., Muzny, D. M., & Caskey, C. T. (1989). Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9412–9416. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9412>
- Xue, Z., Yin, B., Wang, H., Li, M., Rao, H., Liu, X., ... & Lu, X. (2016). An organic indicator functionalized graphene oxide nanocomposite-based colorimetric assay for the detection of sarcosine. *Nanoscale*, 8(10), 5488-5496.
- Yadav, S., Devi, R., Kumar, A., & Pundir, C. S. (2011). Tri-enzyme functionalized ZnO-NPs/CHIT/c-MWCNT/PANI composite film for amperometric determination of creatinine. *Biosensors & bioelectronics*, 28(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.06.044>
- Yainoy, S., Phuadraksa, T., Wichit, S., Sompoppokakul, M., Songtawee, N., Prachayasittikul, V., & Isarankura-Na-Ayudhya, C. (2019). Production and Characterization of Recombinant

Wild Type Uricase from Indonesian Coelacanth (*L. menadoensis*) and Improvement of Its Thermostability by In Silico Rational Design and Disulphide Bridges Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1269. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20061269>

Yamkamon, V., Phakdee, B., Yainoy, S., Suksrichawalit, T., Tatanandana, T., Sangkum, P., & Eiamphungporn, W. (2018). Development of sarcosine quantification in urine based on enzyme-coupled colorimetric method for prostate cancer diagnosis. *EXCLI journal*, 17, 467-478. doi:10.17179/excli2018-145

Yamkamon, V., Phakdee, B., Yainoy, S., Suksrichawalit, T., Tatanandana, T., Sangkum, P., & Eiamphungporn, W. (2018). Development of sarcosine quantification in urine based on enzyme-coupled colorimetric method for prostate cancer diagnosis. *EXCLI journal*, 17, 467.

Yan, Z., Guangming, W., Yehong Z., Shaomin, S., Chuan, D., Martin, M., & Choi, F. (2007). Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 22, Issue 8, Pages 1791-1797, ISSN 0956-5663. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.038>.

Zerna Bravo, C., & Alvares Reyes, S., & Limones, M., & Macias Gaytan, A. (2020). Metanálisis de los factores para detección precoz de hipertensión inducida por el embarazo y protocolos en hipertensión previa. *Centro Sur*, 4(1). ISSN. <http://portal.amelica.org/ameli/journal/384/3841574002/>

Zhao, C., Wan, L., Wang, Q., Liu, S., Jiao, K. (2009). Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on direct electron transfer of Hemoglobin-encapsulated chitosan-modified glassy carbon electrode. *Anal. Sci.* 25 (8) 1013–1017, <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.25.1013>.

Zhong, Q., Qin, X., Yuan, C., Shi, R., & Wang, Y. (2021). Colorimetric determination of



sarcosine in human urine with enzyme-like reaction mediated Au nanorods etching.  
Microchemical Journal, 165, 106120.