



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali

**Facultad de Ingeniería
y Ciencias**

Ingeniería Biomédica

INFORME Final de TRABAJO de GRADO

Biosensor electroquímico para la detección del antígeno NS1 del virus del dengue en saliva artificial

Santiago Pantoja Bastidas
Angel Humberto Ducuara Díaz

Director

Dr. Andres Jaramillo Botero

Codirector

Dr. Pedro Miguel Hernández Acosta

14 de junio de 2026

Agrsdecimientos

0.0.1. Agradecimientos de Angel

En primer lugar, agradezco a Dios por brindarme la fortaleza, la sabiduría y la perseverancia necesarias para superar los desafíos encontrados a lo largo de este camino y permitirme alcanzar esta meta.

Asimismo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia, quienes han sido el pilar fundamental durante todo mi proceso académico. En especial, a mi tía Katty Díaz, a mi madre Margelis Díaz y a mi padre Audi Ducuara, por su apoyo incondicional, su confianza constante y por estar siempre presentes a lo largo de este recorrido. Su acompañamiento ha sido esencial para culminar con éxito este trabajo y alcanzar este importante logro personal y profesional. De igual manera, agradezco profundamente a mi compañero de tesis y amigo Santiago Pantoja, por su compromiso, dedicación y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

Además, extiendo mi agradecimiento al director de tesis, el doctor Andrés Jaramillo, y al co-director, el doctor Pedro Hernández, por su orientación, acompañamiento académico y valiosas observaciones, las cuales fueron fundamentales para el desarrollo y culminación de este trabajo. De igual manera, expreso mi agradecimiento al Instituto Omicas por el apoyo brindado mediante la facilitación de materiales, insumos y recursos necesarios para la realización de este proyecto, así como a sus colaboradores, por su disposición, colaboración y apoyo durante las actividades experimentales, lo cual fue clave para el desarrollo de este trabajo.

0.0.2. Agradecimientos de Santiago

Agradezco profundamente a Dios, por ser mi guía constante, por darme fortaleza en los momentos de dificultad y por permitirme culminar este proceso académico.

A mi madre, por su amor incondicional, su apoyo constante y por ser el principal motor de mi vida. Todo lo que soy y lo que he logrado es gracias a su esfuerzo y dedicación.

A mi abuela, por su cariño y por siempre tenerme en sus oraciones.

A mi padrino, por su apoyo, a su esposa, mi tía y sus hijos, por su acompañamiento, su afecto y por brindarme un apoyo incondicional.

A mi compañero de tesis, Ángel, por su compromiso, colaboración constante y por compartir este proceso académico, haciendo posible el desarrollo conjunto de este trabajo.

A todos mis familiares, por su apoyo, comprensión y por ser parte esencial de mi vida, brindándome siempre motivación para seguir adelante.

A mi director y codirector de tesis, el Dr. Andrés y el Dr. Pedro, por orientarnos con sabiduría y paciencia en este arduo proceso, al instituto iOmicas y sus colaboradores por permitirnos realizar nuestro proyecto de grado en sus instalaciones y su amabilidad.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento por acompañarme en este proceso y por ser una fuente constante de inspiración y fuerza.

Glossrio

Símbolos

ΔR_{ct}	Se emplea para denotar el cambio en la resistencia de transferencia de carga [Ω]
R_{ct}	Se emplea para denotar la resistencia de transferencia de carga [Ω]
R_s	Se emplea para denotar la resistencia de solución [Ω]
C	Se emplea para denotar la concentración del analito [ng/mL]
A	Se emplea para denotar el área electroactiva del electrodo [cm^2]
i_p	Se emplea para denotar la corriente pico anódica [A]
v	Se emplea para denotar la velocidad de barrido [V/s]
ΔE_p	Se emplea para denotar la separación entre potenciales pico [mV]
R^2	Se emplea para denotar el coeficiente de determinación
σ	Se emplea para denotar la desviación estándar

Acrónimos y Abreviaturas

<i>DENV</i>	Dengue Virus
<i>NSI</i>	Non-Structural Protein 1
<i>LIG</i>	Laser-Induced Graphene
<i>EIS</i>	Electrochemical Impedance Spectroscopy
<i>CV</i>	Cyclic Voltammetry
<i>DPV</i>	Differential Pulse Voltammetry
<i>PBS</i>	Phosphate Buffered Saline
<i>BSA</i>	Bovine Serum Albumin
<i>EDC</i>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide
<i>NHS</i>	N-Hydroxysuccinimide
<i>CPE</i>	Constant Phase Element
<i>LOD</i>	Limit of Detection
<i>LOQ</i>	Limit of Quantification

Términos

Biosensor Dispositivo analítico que combina un elemento de reconocimiento biológico con un transductor capaz de generar una señal medible.

Inmunosensor Tipo de biosensor basado en la interacción específica entre un antígeno y un anticuerpo.

Grafeno inducido por láser Material carbonoso obtenido mediante irradiación láser sobre polímeros, caracterizado por su alta conductividad y elevada área superficial.

Área electroactiva Superficie real del electrodo disponible para participar en procesos de transferencia electrónica.

Funcionalización superficial Modificación química de una superficie para permitir la inmovilización estable de biomoléculas.

Saliva artificial Matriz sintética diseñada para simular la composición fisicoquímica de la saliva humana bajo condiciones controladas.

Recovery Parámetro analítico que expresa el porcentaje de recuperación entre la concentración medida y la concentración nominal.

Resumen

El dengue constituye un importante problema de salud pública debido a su alta incidencia y a la necesidad de métodos de diagnóstico temprano accesibles y rápidos. En este trabajo se desarrolló un biosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue serotipo 2 utilizando saliva artificial como matriz de análisis. El sistema fue fabricado mediante electrodos de grafeno inducido por láser funcionalizados con un anticuerpo monoclonal recombinante anti-NS1. La caracterización estructural realizada mediante espectroscopía Raman confirmó la formación de una estructura gráfica multicapa con defectos moderados, adecuada para aplicaciones electroquímicas. Posteriormente, la respuesta del biosensor fue evaluada mediante espectroscopía de impedancia electroquímica utilizando ferri/ferrocianuro como sistema redox.

Los resultados mostraron una respuesta lineal en el rango de 1 a 200 ng/mL de proteína NS1, con un coeficiente de determinación de 0.9866, un límite de detección de 5.511 ng/mL y un límite de cuantificación de 18.370 ng/mL. Asimismo, los ensayos de reactividad cruzada frente a proteínas heterólogas asociadas a otras enfermedades virales evidenciaron baja interferencia dentro del conjunto limitado de interferentes evaluados. Finalmente, la prueba de concepto realizada en saliva artificial fortificada mostró porcentajes de recuperación dentro del rango aceptable (80–120 %) en 10 de los 12 sensores evaluados, demostrando la factibilidad del sistema como una prueba de concepto electroquímica para la detección de NS1 en matrices simuladas. No obstante, serán necesarios estudios adicionales orientados a la selectividad con respecto a flavivirus, a la validación en matrices biológicas reales y posteriormente en muestras clínicas para determinar su desempeño diagnóstico.

Palabras clave: dengue, proteína NS1, biosensor electroquímico, inmunosensor, grafeno inducido por láser, espectroscopía de impedancia electroquímica, saliva artificial, diagnóstico no invasivo

Abstract

Dengue represents a major public health problem due to its high incidence and the need for accessible and rapid early diagnostic methods. In this work, an electrochemical biosensor based on laser-induced graphene was developed for the detection of the NS1 protein of dengue virus serotype 2, using artificial saliva as the analysis matrix. The system was fabricated using laser-induced graphene electrodes functionalized with a recombinant monoclonal anti-NS1 antibody. Structural characterization performed by Raman spectroscopy confirmed the formation of a multilayer graphitic structure with moderate defects, suitable for electrochemical applications. Subsequently, the biosensor response was evaluated using electrochemical impedance spectroscopy, employing ferri/ferrocyanide as a redox probe system.

The results showed a linear response in the range of 1 to 200 ng/mL of NS1 protein, with a coefficient of determination of 0.9866, a limit of detection of 5.511 ng/mL, and a limit of quantification of 18.370 ng/mL. Likewise, cross-reactivity assays against heterologous proteins associated with other viral diseases showed low interference within the limited set of evaluated interferents. Finally, the proof-of-concept test performed in spiked artificial saliva showed recovery percentages within the acceptable range (80–120 %) in 10 of the 12 evaluated sensors, demonstrating the feasibility of the system as an electrochemical proof of concept for NS1 detection in simulated matrices. However, further studies focused on validation in real biological matrices and subsequently in clinical samples will be necessary to determine its diagnostic performance.

Keywords: dengue, NS1 protein, electrochemical biosensor, immunosensor, laser-induced graphene, electrochemical impedance spectroscopy, artificial saliva, non-invasive diagnosis.

Índice general

0.0.1. Agradecimientos de Angel	7
0.0.2. Agradecimientos de Santiago	7
1. Introducción	1
2. Planteamiento del Problema	3
2.1. Planteamiento del problema	3
2.1.1. Formulación	4
2.1.2. Sistematización	4
3. Justificación	5
3.1. Justificación	5
4. Objetivos	7
4.1. Objetivo General	7
4.2. Objetivos Específicos	7
5. Marco de Referencia	9
5.1. Áreas Temáticas	9
5.2. Marco Teórico	9
5.2.1. Virus del dengue	9
5.2.2. Serotipos del virus del dengue y conservación antigénica	9
5.2.3. Proteína NS1: Estructura y relevancia diagnóstica	10
5.2.4. Justificación del serotipo de referencia para validación experimental	10
5.2.5. Grafeno	10
5.2.6. Grafeno inducido por láser (LIG)	10
5.2.7. Celda electroquímica de tres electrodos	10
5.2.8. Sensores para la detección de NS1	11
5.2.9. Espectroscopía Raman	12
5.2.10. Funcionalización de electrodos LIG	12
5.2.11. Elementos de reconocimiento: anticuerpos y aptámeros	12
5.2.12. Pruebas analíticas con proteína recombinante	13
5.2.13. Normatividad y su aplicación en el proyecto	13
5.2.14. Saliva artificial como matriz experimental	14
5.2.15. Proteínas recombinantes utilizadas en el estudio	14
5.3. Trabajos Relacionados	14

6. Materiales y Métodos	23
6.0.1. Base metodológica del desarrollo experimental	23
6.0.2. Criterios de diseño	23
6.0.3. Herramientas y equipos	24
6.0.4. Materiales y reactivos.....	25
6.0.5. Preparación del sustrato de poliimida.....	25
6.0.6. Fabricación de los sensores.....	26
6.0.7. Metodología para la estimación del área electroactiva	27
6.0.8. Metodología de caracterización mediante espectroscopía Raman	27
6.0.9. Evaluación del método de funcionalización.....	28
6.0.10. Funcionalización de los electodos LIG.....	28
6.0.11. Construcción de la curva de calibración.....	33
6.0.12. Determinación del límite de detección y límite de cuantificación	35
6.0.13. Evaluación de selectividad	35
6.0.14. Preparación de saliva artificial.....	36
6.0.15. Prueba de concepto en matriz de saliva artificial	36
7. Resultados y Discusión	39
7.0.1. Selección del método de funcionalización.....	39
7.0.2. Caracterización estructural por espectroscopía Raman	41
7.0.3. Área electroactiva del electrodo LIG	41
7.0.4. Consideraciones sobre la caracterización superficial del LIG.....	42
7.0.5. Validación del modelo electroquímico y calidad del ajuste.....	42
7.0.6. Curva de calibración.....	44
7.0.7. Determinación del límite de detección y cuantificación.....	46
7.0.8. Comparación del desempeño analítico con tecnologías reportadas.....	47
7.0.9. Evaluación y análisis de selectividad.....	48
7.0.10. Prueba de concepto en saliva artificial.....	50
8. Conclusiones	53
9. Trabajos futuros y recomendaciones	55
10. Estimación de costos del desarrollo	57
Bibliografía	59

Índice de figuras

6.1. Diseño del sensor y sus dimensiones	26
6.2. Voltametría cíclica realizada en solución de NaOH 0.1 M	29
6.3. Depósito de solución de BSA sobre el electrodo de trabajo durante la etapa de bloqueo de superficie.....	31
6.4. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) del sistema en estado basal tras la modificación superficial con BSA, evidenciando el comportamiento interfacial del electrodo de grafeno inducido por láser (LIG).	32
6.5. Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) del sensor tras la interacción con la proteína NS1, evidenciando el incremento en la resistencia de transferencia de carga asociado a la formación del complejo antígeno–anticuerpo.	33
6.6. Ajuste de los espectros de impedancia electroquímica mediante un circuito equivalente de Randles modificado(CPE), mostrando la diferencia entre los valores de R_{ct} inicial y final utilizados para el cálculo de ΔR_{ct}	34
7.1. Diagramas de Nyquist representativos de los sensores funcionalizados mediante PBA y NaOH durante las diferentes etapas de la funcionalización	40
7.2. Espectro Raman representativo del electrodo de grafeno inducido por láser (LIG), donde se observan las bandas D, G y 2D características del material.....	41
7.3. Ejemplo representativo del ajuste de los espectros de impedancia electroquímica mediante un circuito equivalente de Randles modificado con elemento de fase constante (CPE), mostrando la concordancia entre los datos experimentales y el modelo ajustado.	43
7.4. Curva de Calibración.....	45
7.5. Reactividad cruzada frente a proteínas interferentes en comparación con las señales equivalentes al límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	49
7.6. Prueba de concepto	51

Índice de tsblss

5.1. Características de sensores para detección de flavivirus.....	19
6.1. Parámetros de fabricación del LIG mediante irradiación láser.....	26
6.2. Parámetros de voltametría cíclica para activación electroquímica del LIG.....	29
6.3. Parámetros de EIS utilizados durante la caracterización electroquímica.....	32
6.4. Composición de la saliva artificial utilizada durante pruebas experimentales.....	36
7.1. Comparación estadística de los valores de R_{ct} para los métodos evaluados ($n = 3$ sensores por grupo).	39
7.2. Parámetros estadísticos del ajuste del circuito equivalente de Randles modificado con CPE para los espectros de impedancia empleados en la construcción de la curva de calibración ($n = 30$ ajustes).	43
7.3. Promedio de la respuesta electroquímica del biosensor para cada concentración de proteína NS1, junto con la desviación estándar y el coeficiente de variación intersensor.	44
7.4. Valores promedio del blanco experimental (BSA).	46
7.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del biosensor.....	46
7.6. Comparación del desempeño analítico del biosensor desarrollado frente a tecnologías reportadas para la detección de dengue.....	47
7.7. Resultados de reactividad cruzada del biosensor frente a proteínas interferentes.....	48
7.8. Resultados obtenidos durante la prueba de concepto en saliva artificial.	50
10.1. Materiales y reactivos utilizados en el desarrollo del biosensor	57
10.2. Equipos utilizados en el desarrollo del biosensor.....	58

Introducción

El dengue se ha consolidado como un problema de salud pública en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en países como Colombia, donde se presentan brotes recurrentes y circulación endémica del virus [1]. La detección temprana de la enfermedad es fundamental para reducir complicaciones clínicas y fortalecer las estrategias de vigilancia epidemiológica; sin embargo, los métodos diagnósticos convencionales dependen principalmente de muestras de sangre o suero y de infraestructura de laboratorio especializada, lo que limita su implementación en zonas rurales o con recursos restringidos [2].

Durante las primeras etapas de la infección, el virus libera la proteína no estructural 1 (NS1), un biomarcador ampliamente utilizado para el diagnóstico temprano del dengue debido a que puede detectarse antes de la aparición de anticuerpos [3]. Aunque la mayoría de pruebas comerciales emplean muestras de sangre, diversos estudios han reportado la presencia de NS1 en saliva, evidenciando el potencial de esta matriz biológica como alternativa no invasiva para aplicaciones diagnósticas [4, 5]. No obstante, la detección de NS1 en saliva representa un reto debido a las bajas concentraciones del biomarcador en esta matriz biológica, por lo que los sensores electroquímicos basados en materiales avanzados han demostrado potencial para el desarrollo de sistemas diagnósticos sensibles y portátiles [4]. En particular, el grafeno inducido por láser (LIG) presenta propiedades favorables para aplicaciones electroquímicas debido a su alta conductividad, área superficial y facilidad de funcionalización [6, 7].

En este contexto, el presente trabajo propone el desarrollo de un biosensor electroquímico basado en electrodos de grafeno inducido por láser para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue en saliva artificial fortificada. El sistema emplea un mecanismo de reconocimiento inmunológico basado en la interacción específica antígeno–anticuerpo, por lo que, desde el punto de vista funcional, corresponde a un inmunosensor, entendido como una subcategoría de biosensores que utiliza biomoléculas de reconocimiento para la detección selectiva de analitos objetivo [8]. El sistema fue evaluado mediante pruebas analíticas con proteína recombinante, considerando parámetros como sensibilidad, selectividad, límite de detección y límite de cuantificación, como aproximación preliminar para el desarrollo de futuras plataformas diagnósticas no invasivas para dengue.

Plantesmiento del Problems

2.1. Planteamiento del problema

El dengue es una enfermedad viral transmitida principalmente por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*. Aunque muchas personas pueden presentar síntomas leves o incluso no manifestarlos, la infección puede desencadenar desde fiebre alta y dolores musculares hasta complicaciones más serias que afectan órganos vitales. Esta enfermedad tiende a seguir un patrón estacional relacionado con las condiciones climáticas, presentándose en momentos del año con mayor temperatura y lluvias, lo que favorece la proliferación del mosquito transmisor. Entender estas características es fundamental para mejorar las estrategias de prevención y control en las comunidades afectadas [9].

A lo largo del curso del dengue, los pacientes atraviesan diferentes etapas, desde la fase inicial con fiebre y malestar general, hasta momentos críticos en los que puede haber problemas serios como pérdida de líquidos o hemorragias. La evolución clínica puede variar mucho entre individuos, y la detección temprana de signos que indiquen un posible empeoramiento es clave para evitar complicaciones graves [9]. Actualmente, el diagnóstico de dengue agudo se realiza principalmente mediante pruebas de laboratorio que detectan el virus o sus componentes (como la proteína no estructural 1, NS1, mediante ELISA) o la respuesta inmunológica del paciente (anticuerpos IgM) a través de pruebas que amplifican el ácido nucleico viral (NAAT). Es importante destacar que estos métodos diagnósticos requieren la obtención de muestras de sangre, lo que los convierte en procedimientos invasivos [3]. Por ende, tener herramientas que ayuden a detectar el virus de manera rápida y fácil puede ser una gran ventaja para los sistemas de salud y los pacientes. Esto es cierto si estas se basan en marcadores biológicos como la proteína NS1 encontrada en saliva, ofreciendo así un camino accesible y simple para el diagnóstico. Así, esta investigación se centra en el desarrollo y evaluación analítica de un biosensor basado en un anticuerpo monoclonal, anclado sobre el electrodo de trabajo de un sensor electroquímico fabricado en grafeno inducido por láser, orientado a la detección electroquímica de la proteína NS1 del virus del dengue en matriz de saliva artificial, como prueba de concepto para futuras aplicaciones de diagnóstico no invasivo.

El dengue constituye un apremiante problema de salud pública en Colombia, como lo revela la situación epidemiológica reciente, con un acumulado de 35 405 casos y una preocupante proporción de casos que evolucionan a dengue con signos de alarma o grave, concentrados significativamente en regiones como Meta, Cesar, Santander y la región Caribe. La persistencia de esta elevada carga de morbilidad se ve exacerbada por una compleja interacción de factores socioeconómicos, ambientales y la extensa distribución del vector *Aedes aegypti* en el territorio nacional, así como por la circulación de diferentes serotipos virales, entre los cuales el DENV-2 ha sido reportado como uno de los de

mayor relevancia epidemiológica y clínica. Esta situación incrementa el riesgo de brotes y de formas graves la enfermedad [1, 10].

Actualmente, el diagnóstico de dengue agudo se basa en pruebas de laboratorio que requieren muestras sanguíneas para la detección directa de componentes virales (proteína NS1 mediante ELISA o ARN viral por RT-PCR) o indirectamente la respuesta inmune (anticuerpos IgM). Si bien esenciales, estas metodologías presentan limitaciones significativas. Las pruebas serológicas, aunque accesibles, tienen una ventana diagnóstica tardía (4-6 días) y no distinguen serotipos. Las pruebas moleculares como la RT-PCR son más sensibles y específicas en etapas tempranas y tipifican el virus, pero su alto costo y requerimiento de equipos especializados y personal capacitado limitan su uso, especialmente en áreas con recursos escasos [11]. Estas desventajas de los métodos convencionales logran evidenciar la necesidad de desarrollar nuevas estrategias diagnósticas, por lo que, esta investigación plantea la siguiente pregunta problema:

2.1.1. Formulación

¿Cómo se puede desarrollar un biosensor basado en anticuerpos monoclonales, anclados sobre el electrodo de trabajo de un sensor electroquímico fabricado en grafeno inducido por láser, para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue mediante muestras de saliva artificial, como prueba de concepto para futuras aplicaciones de detección no invasiva?

2.1.2. Sistematización

- ¿Cuáles son las características estructurales, inmunológicas y diagnósticas más relevantes del virus del dengue, particularmente de la proteína NS1, que justifican su uso como biomarcador en un sensor salival?
- ¿Qué anticuerpo monoclonal anti-NS1 disponible comercialmente ofrece mejores propiedades de afinidad, especificidad y estabilidad para ser inmovilizado sobre un electrodo de trabajo de un sensor electroquímico fabricado de grafeno inducido por láser?
- ¿Qué métodos de funcionalización y diseño electroquímico permiten construir una plataforma estable y reproducible para la inmovilización del anticuerpo anti-NS1 sobre un electrodo de trabajo de un sensor electroquímico fabricado de grafeno inducido por láser?
- ¿Qué nivel de sensibilidad y selectividad presenta el sensor desarrollado al detectar NS1 en muestras de saliva artificial, y cómo se compara frente a métodos de diagnóstico actuales?

Justificación

3.1. Justificación

El dengue continúa siendo un problema de salud pública en Colombia, con comportamiento endémico y brotes recurrentes. Según datos de Sivigila, a la semana epidemiológica 16 de 2026 se han notificado 35 405 casos, de los cuales el 39,0 % presentan signos de alarma y el 1,1 % corresponden a dengue grave. La mayoría de los casos se concentra en regiones como Meta, Cesar, Santander y la región Caribe, evidenciando una distribución focalizada en zonas endémicas. En este contexto, estudios recientes han reportado que el serotipo DENV-2 es uno de los más prevalentes y con mayor circulación en el país, particularmente asociado a dinámicas de transmisión sostenida y brotes recientes [1, 10].

Frente a esta situación, la detección temprana de la infección es fundamental para reducir complicaciones clínicas, optimizar la atención médica y contener la transmisión del virus. No obstante, las pruebas diagnósticas actuales se basan en su mayoría en muestras de suero, cuya recolección implica procedimientos invasivos, infraestructura clínica y personal entrenado, lo que limita su aplicación en zonas rurales, comunidades vulnerables o en situaciones de emergencia. La Organización Mundial de la Salud ha señalado que, si bien el diagnóstico puede involucrar la detección de virus, ARN, antígenos o anticuerpos, la obtención de muestras de suero o plasma en contextos con recursos limitados representa una barrera importante para la confirmación oportuna de la enfermedad [2].

En este contexto, la saliva ha emergido como una muestra no invasiva viable para el diagnóstico del dengue. Estudios han demostrado que tanto el ARN viral como el antígeno NS1 del virus pueden ser detectados en saliva mediante métodos ya existentes, lo cual sugiere que esta muestra puede complementar e incluso mostrar aproximación a fluidos corporales. Además, su facilidad de recolección y transporte permite su uso en entornos de difícil acceso, así como en poblaciones pediátricas o con restricciones clínicas [5].

Por todo lo anterior, se hace evidente la necesidad de avanzar en el desarrollo de herramientas diagnósticas alternativas que permitan la detección del antígeno NS1 del virus del dengue mediante muestras no invasivas. En este contexto, el presente trabajo propone y evalúa un biosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser y espectroscopía de impedancia electroquímica para la detección inmunológica de NS1 en saliva. Los resultados obtenidos buscan aportar evidencia preliminar sobre la viabilidad analítica de este enfoque como prueba de concepto para futuras aplicaciones en diagnóstico temprano y monitoreo epidemiológico.

4.1. Objetivo General

Desarrollar un biosensor electroquímico para la detección del antígeno NS1 del virus del dengue en muestras de saliva artificial mediante la selección del anticuerpo específico, la fabricación de un sensor electroquímico con electrodos de grafeno inducido por láser y la realización de pruebas analíticas con muestras recombinantes, evaluado a través de la determinación de parámetros analíticos como sensibilidad, selectividad, límite de detección y de cuantificación.

4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar la estructura y características del virus del dengue, bajo revisión bibliográfica exhaustiva, utilizando bases de datos científicas y literatura especializada, con el propósito de justificar la elección del antígeno NS1 como *target* (objetivo) diagnóstico.
2. Seleccionar el anticuerpo específico anti-NS1, bajo evaluación comparativa de anticuerpos comerciales, utilizando fichas técnicas, reportes de afinidad y especificidad, con el propósito de identificar el más adecuado para la inmovilización en el sensor.
3. Diseñar el sensor electroquímico, bajo condiciones de laboratorio controladas, utilizando técnicas de funcionalización de superficies e inmovilización de anticuerpos, con el propósito de obtener una plataforma estable y reproducible para la detección del antígeno NS1.
4. Evaluar el desempeño analítico del sensor, mediante pruebas con proteína NS1 recombinante en buffer de PBS y en muestra de saliva artificial, utilizando análisis estadísticos y curvas de calibración, con el propósito de determinar la sensibilidad y especificidad del dispositivo.

Marco de Referencias

5.1. Áreas Temáticas

- Bioengineering - Biomedical engineering - Biosensors - Electrochemical biosensors
- Components, circuits, devices and systems - Sensors - Chemical and biological sensors - Immunosenors
- Engineering profession - Nanotechnology - Nanomaterials - Graphene-based materials
- Engineering profession - Nanotechnology - Nanofabrication - Laser-based fabrication
- Components, circuits, devices and systems - Instrumentation - Measurement techniques - Electrochemical impedance spectroscopy
- Engineering profession - Engineering in medicine and biology - Biomedical sensing - Infectious disease biomarkers

5.2. Marco Teórico

5.2.1. Virus del dengue

El virus del dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, con un genoma de aproximadamente 11 kb que codifica una poliproteína procesada en tres proteínas estructurales (C, prM/M y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) [12]. DENV se clasifica en cuatro serotipos distintos (DENV-1 al DENV-4), y la infección por uno de ellos no confiere inmunidad cruzada completa frente a los otros, lo que puede llevar a infecciones secundarias más severas[12].

5.2.2. Serotipos del virus del dengue y conservación antigénica

El virus del dengue se clasifica en cuatro serotipos antigénicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Con el fin de evaluar la conservación y variabilidad de la proteína NS1 entre serotipos, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas utilizando herramientas bioinformáticas basadas en Biopython. El análisis incluyó 380 posiciones aminoacídicas, identificándose 32 posiciones completamente conservadas y una conservación promedio global de 62.57 %.

5.2.3. Proteína NS1: Estructura y relevancia diagnóstica

La proteína no estructural 1 (NS1) es una glicoproteína de aproximadamente 46–55 kDa, presente en todos los serotipos de DENV. Se secreta activamente durante la fase aguda de la infección y puede detectarse en diversos fluidos corporales, incluyendo sangre, orina y saliva [5]. Estructuralmente, NS1 contiene tres dominios funcionales: el *-roll* (1–29 aa), implicado en la dimerización; el */wing* (38–151 aa), involucrado en la interacción con membranas celulares; y el *-ladder* (181–352 aa), que proporciona estabilidad estructural y es clave en la respuesta inmune [13].

La concentración de NS1 en saliva ha sido objeto de estudio en investigaciones recientes. Se ha reportado que las concentraciones promedio de NS1 en saliva oscilan entre 0.5 ng/mL y 41.5 ng/mL, con una media de aproximadamente 3.8 ng/mL [4]. Estas concentraciones, aunque más bajas que en suero, son detectables y relevantes para el diagnóstico temprano del dengue.

5.2.4. Justificación del serotipo de referencia para validación experimental

Aunque inicialmente se contempló un enfoque multiserotipo para el desarrollo del biosensor, la fase experimental del presente trabajo se delimitó al serotipo DENV-2. Esta selección se realizó considerando su relevancia epidemiológica y circulación reportada en regiones endémicas de Colombia, así como la disponibilidad de reactivos especializados para la validación experimental [1, 10].

Adicionalmente, el análisis de conservación de la proteína NS1 permitió identificar regiones conservadas y variables entre serotipos, respaldando su selección como biomarcador diagnóstico para el desarrollo de la prueba de concepto.

5.2.5. Grafeno

El grafeno es un nanomaterial bidimensional formado por una sola capa de átomos de carbono dispuestos en una red hexagonal tipo panal, unidos mediante enlaces covalentes sp^2 . Se caracteriza por su alta conductividad eléctrica y térmica, elevada resistencia mecánica y amplia área superficial, lo que lo convierte en un material de interés en aplicaciones electrónicas, energéticas y biomédicas [14, 15].

5.2.6. Grafeno inducido por láser (LIG)

El grafeno inducido por láser (LIG) es un material obtenido mediante la irradiación láser de polímeros, proceso que induce su carbonización y grafitización, formando estructuras multicapa de grafeno. Presenta alta porosidad, buena conductividad eléctrica y abundancia de defectos y grupos funcionales superficiales, características que favorecen su desempeño electroquímico [6, 7].

5.2.7. Celda electroquímica de tres electrodos

Las mediciones electroquímicas empleadas en biosensores suelen realizarse mediante una celda electroquímica de tres electrodos, conformada por un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y un contraelectrodo [16]. El electrodo de trabajo corresponde a la superficie donde ocurre

el reconocimiento biológico y la transferencia de carga asociada a la detección electroquímica. Por su parte, el electrodo de referencia proporciona un potencial estable durante la medición, mientras que el contraelectrodo permite el flujo de corriente dentro del sistema sin afectar la estabilidad del potencial aplicado.

5.2.7.1. Sensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos detectan cambios eléctricos generados por la interacción entre el analito y el bioreceptor, como anticuerpos o aptámeros. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran:

- **Voltametría cíclica (VC):** técnica electroanalítica basada en el barrido de potencial aplicado al electrodo de trabajo mientras se registra la corriente resultante. Se emplea ampliamente en la caracterización y activación de electrodos en biosensores [17].
- **Voltametría de pulso diferencial (DPV):** técnica sensible que mide variaciones de corriente asociadas a pulsos de potencial, permitiendo la detección de NS1 en concentraciones del orden de nanogramos por mililitro [18].
- **Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS):** evalúa la interfaz electrodo–solución mediante una perturbación de potencial alterno de pequeña amplitud. Permite detectar eventos de biorreconocimiento a partir de cambios en la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}), cuyo análisis se realiza comúnmente mediante el circuito equivalente de Randles [19, 20].

En estos sistemas, el grafeno inducido por láser (LIG) actúa como plataforma electroquímica debido a su alta conductividad y facilidad de funcionalización superficial, favoreciendo la inmovilización de biomoléculas [6, 14].

5.2.8. Sensores para la detección de NS1

Los biosensores combinan un elemento de reconocimiento biológico con un transductor físico-químico capaz de convertir una interacción molecular en una señal medible. Para la detección de NS1, los sistemas más utilizados son los sensores electroquímicos y los colorimétricos.

Los inmunosensores emplean anticuerpos o antígenos como bioreceptores, permitiendo transformar la interacción antígeno–anticuerpo en una señal cuantificable mediante un transductor físico, químico o electroquímico [21].

5.2.8.1. Sensores colorimétricos

Los sensores colorimétricos permiten detectar NS1 mediante cambios de color visibles originados por reacciones químicas o físico-químicas. Entre los principales mecanismos se encuentran:

- **Reacciones enzimáticas:** catalizadas por HRP (*horseradish peroxidase*), enzima que oxida el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), produciendo un cambio de color azul utilizado en ensayos tipo ELISA [22].

- **Agregación de nanopartículas de oro (AuNPs):** la interacción con NS1 modifica la distancia entre nanopartículas, produciendo cambios de color de rojo a azul [23].
- **Dispositivos analíticos en papel (μ PADs):** plataformas con canales hidrofóbicos que permiten realizar ensayos tipo ELISA mediante flujo capilar, sin requerir equipos complejos [24].

5.2.9. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de materiales basados en carbono, como el grafeno inducido por láser (LIG). Permite evaluar la estructura y el grado de defectos mediante el análisis de bandas características, como la banda D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$), asociada a defectos estructurales, y la banda G ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$), relacionada con la estructura gráfica del carbono. Asimismo, la banda 2D ($\sim 2700\text{ cm}^{-1}$) proporciona información sobre el número de capas y el orden estructural del material [25].

5.2.10. Funcionalización de electrodos LIG

La voltametría cíclica en medio alcalino (NaOH) ha sido reportada como un método de pretratamiento electroquímico de electrodos de carbono, el cual induce modificaciones superficiales asociadas al aumento de grupos funcionales oxigenados[26].

El sistema EDC/NHS se emplea para activar grupos carboxilo presentes en superficies de carbono, permitiendo la formación de enlaces amida con biomoléculas que contienen grupos amina [27, 28, 29, 30]. La combinación EDC/sulfo-NHS mejora la eficiencia de conjugación y el desempeño del sensor, favoreciendo la inmovilización covalente de anticuerpos sobre grafeno inducido por láser y aumentando la estabilidad del bioreconocimiento [28, 29].

Posteriormente, la albúmina sérica bovina (BSA) se utiliza como agente bloqueador para reducir la unión inespecífica y mejorar la selectividad del sistema [28, 31]. Estas etapas permiten obtener una funcionalización estable y reproducible de la superficie de LIG, mejorando la sensibilidad y especificidad del biosensor.

5.2.11. Elementos de reconocimiento: anticuerpos y aptámeros

5.2.11.1. Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas del sistema inmune que reconocen y neutralizan antígenos como virus, bacterias o toxinas, generando una respuesta específica que puede persistir para protección futura [32]. Los anticuerpos recombinantes son moléculas generadas mediante técnicas de ADN recombinante que permiten alta especificidad y reproducibilidad, y se utilizan ampliamente en biosensores. En este trabajo se emplean como bioreceptores para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue, formando complejos antígeno-anticuerpo que generan una señal electroquímica medible [33].

5.2.11.2. Aptámeros

Los aptámeros son secuencias cortas de ADN o ARN que adoptan estructuras tridimensionales capaces de unirse con alta afinidad a moléculas blanco. Se consideran una alternativa a los anticuerpos debido a su mayor estabilidad térmica y química, menor costo de producción y posibilidad de modificación química. Se han reportado aptámeros específicos contra NS1 con buen desempeño en sensores ópticos y electroquímicos [34].

5.2.12. Pruebas analíticas con proteína recombinante

Durante el desarrollo y validación de biosensores, se emplea la proteína NS1 recombinante en lugar de muestras clínicas, lo que permite un control preciso de la concentración, garantiza la seguridad biológica y facilita la repetibilidad experimental.

Estas condiciones experimentales permiten evaluar parámetros analíticos clave del desempeño del sensor, entre ellos el límite de detección (LOD), definido como la concentración mínima detectable con fiabilidad; el límite de cuantificación (LOQ), correspondiente a la menor concentración cuantificable con precisión aceptable; la linealidad, entendida como la relación proporcional entre concentración y señal; y la especificidad y repetibilidad, evaluadas mediante controles negativos y réplicas experimentales [35].

Sonda redox

Una sonda redox es un dispositivo electroquímico utilizado para medir el potencial de oxidación-reducción (ORP) de una solución, que refleja la capacidad del medio para aceptar o ceder electrones en reacciones redox [36]. La medición se realiza mediante un electrodo indicador, generalmente de platino o material noble, y un electrodo de referencia [36]. En estudios electroquímicos, es común emplear una sonda redox con el sistema estándar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a una concentración de 5 mM en solución tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato), debido a su estabilidad y reproducibilidad para calibrar y evaluar procesos redox con precisión [36, 37].

5.2.13. Normatividad y su aplicación en el proyecto

- **NTC-ISO-TR 13121:2018 (Nanotecnología. Evaluación del riesgo de los nanomateriales):** Esta norma es relevante para identificar y controlar los posibles riesgos asociados al uso de materiales a nanoescala. Aunque el presente proyecto no utiliza nanopartículas, el grafeno inducido por láser (LIG) presenta una estructura nanométrica que requiere ser evaluada para garantizar su seguridad durante la fabricación, manipulación y uso del inmunosensor, minimizando riesgos toxicológicos y ambientales [38].
- **NTC-ISO 10993-1:2020 (Evaluación biológica de los dispositivos médicos):** Dado que el inmunosensor está diseñado para el análisis de muestras biológicas como la saliva, esta norma orienta la evaluación de la biocompatibilidad de los materiales empleados. Específicamente, permite validar que el grafeno inducido por láser y los anticuerpos monoclonales

anclados no generen efectos adversos en el usuario, siendo clave para su implementación segura en entornos clínicos o domiciliarios [39].

- **GTC-ISO 13014:2016 (Nanotecnología. Guía para la caracterización físico-química de materiales a nanoescala):** Esta guía se aplica para caracterizar adecuadamente el grafeno inducido por láser, que constituye la superficie activa del electrodo de trabajo. La norma permite asegurar que sus propiedades físico-químicas —como área superficial, funcionalización, estructura y conductividad— sean consistentes con los requisitos del diseño del inmunosensor, favoreciendo la inmovilización eficiente de los anticuerpos y una señal electroquímica estable y reproducible [40].

5.2.14. Saliva artificial como matriz experimental

La saliva constituye una matriz biológica de interés para aplicaciones diagnósticas debido a su fácil obtención y capacidad de reflejar el estado fisiológico del organismo. No obstante, su composición puede variar por múltiples factores, afectando los resultados experimentales *in vitro* e *in vivo*. Por esta razón, se han desarrollado diferentes formulaciones de saliva artificial para simular las condiciones de la cavidad oral bajo parámetros controlados, dependiendo del tipo de aplicación biológica o analítica requerida [41].

La saliva artificial utilizada en este trabajo presentó un pH de 7.2 y fue preparada utilizando agua tipo I como solvente. La formulación incluyó KCl (17.98 mM), NaCl (4.29 mM), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (~1.95 mM), Na_2HPO_4 (~1.95 mM), NaHCO_3 (3.27 mM), CaCl_2 (1.10 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.08 mM), urea (~3.33 mM) y H_2SO_4 (0.50 mM) [42, 43]. El sistema fosfato empleado es consistente con formulaciones de saliva artificial reportadas previamente para condiciones cercanas a pH neutro, principalmente en forma de dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-) e hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), [44].

5.2.15. Proteínas recombinantes utilizadas en el estudio

Las proteínas recombinantes son polipéptidos obtenidos mediante ingeniería genética a partir de la expresión de un gen de interés en organismos huésped como *Escherichia coli*, levaduras o células de mamífero. Este proceso permite su producción controlada y escalable, facilitando su uso en biomedicina debido a su alta especificidad y reproducibilidad [45, 46].

En este trabajo, la proteína objetivo es la proteína no estructural 1 (NS1) del virus del dengue (DENV), un marcador temprano de infección asociado a la patogénesis de la enfermedad, especialmente en casos graves con fuga vascular [47]. Como proteínas de referencia se emplean la proteína Spike del SARS-CoV-2, la proteína L1 del VPH y la glicoproteína gp350 del EBV, utilizadas para controles de reactividad cruzada en ensayos de interacción antígeno-anticuerpo [48, 49, 50].

5.3. Trabajos Relacionados

En este estado del arte se exploran los diversos métodos de detección del dengue desarrollados en los últimos años, abarcando desde técnicas serológicas como **ELISA**, **inmunocromatografía** y

microarreglos, que permiten identificar anticuerpos y antígenos en distintas fases de la infección [51, 52, 53, 54] hasta métodos moleculares como **RT-PCR** y **amplificación isotérmica**, que brindan mayor sensibilidad y especificidad aunque requieren equipamiento especializado [55, 56, 57]. También se revisan avances en biosensores electroquímicos y ópticos que prometen diagnósticos rápidos, portátiles y accesibles para zonas con recursos limitados [58, 59, 60]. Se destaca la importancia de seleccionar la técnica diagnóstica según la etapa clínica, tipo de muestra y contexto epidemiológico [61, 62, 63]. Aunque cada método tiene limitaciones en tiempo, costo o complejidad, la combinación de pruebas serológicas y moleculares incrementa la precisión diagnóstica, especialmente en áreas endémicas con infraestructura limitada [51, 56, 58, 64] mientras que la implementación de biosensores y dispositivos portátiles representa una innovación clave para mejorar el manejo clínico y epidemiológico del dengue [59, 60, 61, 63].

En biosensores electroquímicos se ha demostrado una alta sensibilidad en la detección de biomarcadores virales mediante la inmovilización de anticuerpos sobre superficies conductoras, alcanzando límites de detección en el orden de fg/mL mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), lo que evidencia su potencial para aplicaciones diagnósticas sensibles y portátiles [65, 66].

Detección de flavivirus con inmunosensor electroquímico

El artículo aborda la creciente amenaza del dengue, una enfermedad viral transmitida por mosquitos *Aedes*, que ha aumentado su incidencia global y representa un serio problema de salud pública, especialmente en países como México. Dada la complejidad del diagnóstico y la limitada eficacia de las estrategias actuales, se destaca la urgencia de contar con métodos diagnósticos más rápidos y precisos. En respuesta, se propone el diseño de un **inmunosensor voltamperométrico**, un dispositivo electroquímico que detecta el virus del dengue mediante la interacción antígeno-anticuerpo, ofreciendo resultados rápidos y adecuados para su uso en centros de atención primaria o en campo [51].

Sensor electroquímico de polianilina para dengue

En respuesta a la necesidad urgente de métodos más accesibles, rápidos y confiables para el diagnóstico del dengue, se ha explorado el uso de biosensores como una alternativa prometedora frente a las técnicas tradicionales, que suelen ser costosas, complejas y lentas. Dentro de este contexto, los **inmunosensores electroquímicos sin marcadores** han ganado especial atención debido a su capacidad para detectar biomarcadores virales con alta sensibilidad y en tiempos reducidos. Entre los diversos biomarcadores del dengue, la **proteína NS1** destaca por su presencia temprana en el torrente sanguíneo durante la fase aguda de la infección. En este trabajo, se presenta un enfoque novedoso que combina la conductividad de la **polianilina** con **electrodos de carbono vítreo** para desarrollar un inmunosensor eficiente, orientado a la detección sin marcadores de NS1 en suero humano, con el objetivo de contribuir al diagnóstico clínico temprano y mejorar el manejo de esta enfermedad infecciosa en expansión global [52].

Sensor electroquímico de péptidos para la detección del biomarcador NS1 del dengue

La propuesta de este estudio se enfoca en el desarrollo de un biosensor electroquímico innovador para la detección rápida y precisa del biomarcador NS1 del virus del dengue. Aprovechando la tecnología de *phage-display*, se identificaron **péptidos de alta afinidad** capaces de unirse específicamente a la proteína NS1, lo que permite la creación de un biosensor más accesible y económico que los métodos tradicionales basados en anticuerpos. Al utilizar técnicas de detección como la **voltamperometría cíclica (CV)** y la **espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)**, este enfoque busca proporcionar una herramienta de diagnóstico más rápida, eficiente y confiable, con el potencial de revolucionar el manejo clínico del dengue al reducir significativamente el tiempo de diagnóstico y mejorar el tratamiento de los pacientes [53].

Selección racional de epítomos para sensor electroquímico de NS1 del dengue

El diagnóstico temprano y preciso de las infecciones por Dengue y Zika es crucial, pero los métodos actuales presentan limitaciones debido a la reactividad cruzada entre los virus. Este estudio propone el desarrollo de un **sensor electroquímico** basado en la **impresión molecular de epítomos internos de la proteína NS1**, lo que permite una diferenciación específica y sensible entre Dengue y Zika, superando las limitaciones de los métodos tradicionales y mejorando el diagnóstico diferencial [64].

Biosensor electroquímico ultrasensible de carbono poroso para detección temprana del dengue

Este estudio propone un biosensor electroquímico altamente sensible para la detección temprana de la **proteína NS1 del virus del dengue**, utilizando **carbono poroso** derivado de biomasa con alta área superficial. El biosensor, desarrollado sobre un electrodo de carbono vítreo (GCE), emplea anticuerpos específicos para NS1 y muestra una alta sensibilidad, selectividad y un amplio rango lineal de detección. El método es rentable, fácil de fabricar y optimizado para garantizar precisión, lo que lo convierte en una herramienta prometedora para el diagnóstico temprano del dengue y mejora los resultados clínicos al permitir una intervención más rápida [54].

Detección electroquímica de infecciones por Zika y Dengue utilizando un solo chip

El artículo describe el desarrollo de un **biosensor electroquímico multiplex** para la detección simultánea de infecciones por los virus Zika y Dengue, utilizando proteínas NS1 específicas de cada virus como biomarcadores. Ambos virus, transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti*, presentan síntomas similares, lo que dificulta su diagnóstico sin herramientas adecuadas. Los métodos tradicionales, como la RT-PCR y ELISA, son costosos y lentos, lo que limita su aplicación en situaciones de emergencia. El biosensor propuesto emplea electrodos de oro modificados con anticuerpos y utiliza **espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)** para detectar los virus de manera

rápida y específica. Este dispositivo permite una detección eficiente en menos de 10 minutos, sin interferencia con otros virus como el del COVID-19, ofreciendo una solución portátil y de bajo costo para la detección temprana en contextos epidémicos [55].

Sensor impedimétrico basado en MIP para la detección del biomarcador de la fiebre del dengue

Se desarrolló un **sensor impedimétrico** basado en **polímeros moleculares impresos (MIP)** para detectar infecciones por dengue en etapas tempranas. Se modificó un **electrodo de carbono impreso (SPCE)** con **nanofibras de polisulfona (PS)** electrohiladas, recubriéndolo con dopamina, usando la proteína NS1 como plantilla durante la polimerización. Esto generó sitios de impresión específicos para la detección de NS1. Las propiedades electroquímicas del sensor se analizaron mediante **voltametría cíclica (CV)** y **espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)**. El sensor mostró una respuesta lineal en el rango de 1 a 200 ng/mL, con detección selectiva de NS1 a partir de 0.3 ng/mL. Además, se aplicó exitosamente para determinar NS1 en suero humano real, con recuperaciones de 95 a 97.14 % y desviaciones estándar menores al 5 % [56].

Nanosensor electroquímico multiplexado en papel para detección de serotipos de dengue y predicción de DHF/DSS

Este estudio desarrolló un dispositivo analítico multiplexado basado en papel (**ePAD**) con **nanocompuestos de óxido de grafeno–dióxido de silicio (GO-SiO₂)** para detectar los serotipos específicos del virus del dengue (DENV 1, DENV 2, DENV 3 y DENV 4). El sensor mostró alta especificidad y sensibilidad, detectando ADN del dengue en un rango de 100 pM a 100 μM, con una respuesta amplificada gracias a la conductividad del GO-SiO₂. Además, este genosensor basado en papel ofrece ventajas como fácil preparación, bajo costo, y necesidad de poca muestra, siendo el primero en predecir la prevalencia de la fiebre hemorrágica del dengue o el síndrome de shock del dengue [57].

Biosensor electroquímico ultrasensible basado en péptidos para el diagnóstico universal del dengue

Se desarrolló un biosensor electroquímico económico para detectar rápidamente anticuerpos IgG específicos del dengue en suero humano. Utiliza un **péptido sintético (DENV/18)**, específico para los cuatro serotipos del virus del dengue, inmovilizado sobre un electrodo de oro impreso. La formación del inmunocomplejo con IgG fue medida mediante voltametría cíclica y de pulso diferencial, logrando detectar concentraciones tan bajas como 0.43 ng/mL. El biosensor permitió diferenciar muestras infectadas y no infectadas con volúmenes mínimos de suero, y mostró resultados consistentes con pruebas moleculares, con potencial para adaptarse a otros patógenos [58].

Detección rápida de ADN del dengue y otros virus usando un solo sensor electroquímico

Se desarrolló una plataforma innovadora para detectar dos secuencias de ADN diferentes utilizando un único **sensor electroquímico**. Este sensor emplea una sonda universal en forma de lazo unida a una superficie sólida, junto con dos cadenas adaptadoras específicas para cada analito. Estas cadenas se hibridan con el ácido nucleico objetivo, proporcionando un reconocimiento altamente específico y una alta afinidad de unión. La sonda universal puede regenerarse rápidamente con un simple enjuague de urea y agua. Como prueba de concepto, se diferenciaron secuencias largas de los virus Zika (141 nt) y Dengue (114 nt), que contienen estructuras secundarias. Esta plataforma ofrece una solución rápida y económica para la detección de cualquier secuencia de ADN o ARN utilizando un solo sensor electroquímico [67].

Nuevo método para la detección del virus del dengue y cribado de anticuerpos con un biosensor electroquímico basado en grafeno-polímero

Este estudio presenta una técnica de detección temprana del virus del dengue (DENV) utilizando **espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)**. Se observó que la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) en un electrodo de oro recubierto con **óxido de grafeno-polímero** varía según el tipo y cantidad de DENV en la superficie. La técnica permite detectar concentraciones de DENV entre 1 y 2×10^3 pfu/mL, con un límite de detección de 0.12 pfu/mL [59].

Aptasensor electroquímico para la detección del virus del dengue en suero humano

Este estudio presenta la fabricación de un **aptasensor electroquímico** altamente sensible para la detección efectiva del antígeno del virus del dengue. El aptasensor utiliza electrodos comerciales (C-SPEs) y autolaminados (SF-SPEs), ambos recubiertos con **nanomaterial de ZnO**, lo que mejora el transporte de electrones. Se emplea un **aptámero específico** contra el antígeno DENV para aumentar la selectividad. Los resultados de la detección del antígeno DENV se confirmaron mediante análisis electroquímicos, y se verificó la reactividad cruzada con el virus chikungunya (CHIKV). El sistema SF-SPEs mostró mayor sensibilidad y es prometedor para la detección de DENV a bajo costo, además de ser aplicable en diagnósticos de otros analitos [60].

Desarrollo de nanobiosensor electroquímico para detección del virus del dengue

Este estudio describe el desarrollo de un **nanobiosensor electroquímico** basado en membranas para detectar el virus del dengue tipo 2 (DENV-2) utilizando un electrodo de platino modificado con **alúmina nanoporosa**. El sensor mide la respuesta de corriente faradéica frente a una sonda redox, el ferrocenometanol, que detecta la formación de complejos inmunitarios en los nano-canales. Utilizando un anticuerpo monoclonal anti-DENV-2 como elemento de reconocimiento, el sensor tiene un límite de detección de 1 pfu/mL y un rango lineal de 1 a 10^3 pfu/mL. Es altamente selectivo

para DENV-2 y no presenta reacciones cruzadas con otros virus. Además, permite la cuantificación directa de DENV-2 en mosquitos [61].

Inmunosensor electroquímico sin etiquetas para detectar proteína E del dengue en suero

Se desarrolló un **inmunosensor electroquímico sin etiquetas** para detectar la **proteína E del virus del dengue (DENV-E)**, utilizando **nanopartículas de oro (AuNPs)** y **grafeno reducido dopado con heteroátomos (AuNPs/NSG)**, con L-cisteína como agente reductor y estabilizador. Este diseño facilita la inmovilización de anticuerpos y mejora la detección de DENV-E, alcanzando un rango lineal de 0.01–100 ng/mL y un límite de detección de 1.6 pg/mL. El sensor mostró alta selectividad para DENV-E, sin interferencias de virus relacionados. Los resultados obtenidos en muestras de suero se compararon con un ensayo inmunoenzimático, destacando su potencial para aplicaciones clínicas [62].

Aptasensor electroquímico con configuraciones de dos y tres electrodos para detección del virus del dengue

Este estudio presenta una plataforma electroquímica basada en papel para la detección del virus del dengue, utilizando dos configuraciones de electrodos: **dos electrodos** y **tres electrodos**. Ambos sistemas lograron una detección con un límite de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, pero el sistema de tres electrodos mostró un rango de corriente significativamente mayor (55.53 μA a 322.21 μA) en comparación con el sistema de dos electrodos (0.85 μA a 4.54 μA). El sistema de tres electrodos, con una amplificación de corriente 50 veces mayor, demostró ser más sensible y adecuado para la detección de dengue y otros diagnósticos [63].

A continuación se hace una comparación entre los diferentes tipos de sensores vistos anteriormente para la detección del virus del dengue

Cuadro 5.1: Características de sensores para detección de flavivirus

Parámetro	Descripción
Sensor: Detección de flavivirus con inmunosensor electroquímico	
Límite de detección	El sensor detectó diluciones bajas de DENV1 y DENV2 (1:5, 1:10, 1:50), buena sensibilidad, aunque sin concentración exacta.
Rango lineal	No se menciona.
Sensibilidad	La disminución de corriente al unirse el antígeno indica buena sensibilidad.
Selectividad	Solo respondió a muestras con dengue, sin señal con Chikungunya ni sanos.
Sensor: Sensor electroquímico de polianilina para dengue	
Límite de detección	Detectó 0.33 ng/mL de NS1.

Parámetro	Descripción
Rango lineal	Se infiere entre 1–100 ng/mL.
Sensibilidad	13.8 % de reducción de corriente/ng/mL de NS1.
Selectividad	Menos del 7 % de interferencia con BSA, cisteína y glucosa.
Sensor: Sensor electroquímico de péptidos para NS1	
Límite de detección	1.5 $\mu\text{g/mL}$.
Rango lineal	No se menciona.
Sensibilidad	Lineal de 0.025 a 3.5 $\mu\text{g/mL}$, alta afinidad ($K_d \sim 3.9 \text{ nM}$).
Selectividad	Baja interferencia.
Sensor: Selección racional de epítos para NS1	
Límite de detección	29.3 $\mu\text{g/L}$.
Rango lineal	88.7 $\mu\text{g/L}$.
Sensibilidad	No se menciona.
Selectividad	Diferencia NS1 de dengue frente a Zika, IgG y albúmina.
Sensor: Biosensor ultrasensible de carbono poroso	
Límite de detección	0.665 pg/mL.
Rango lineal	No se menciona.
Sensibilidad	Sensibilidad de -3.95 en escala log.
Selectividad	Alta selectividad frente a sustancias similares.
Sensor: Sensor para Zika y Dengue en un solo chip	
Límite de detección	1.17 ng/mL (Dengue), 0.54 ng/mL (Zika).
Rango lineal	No especificado.
Sensibilidad	68.50 (Dengue), 137.07 (Zika) por cada aumento log.
Selectividad	Diferencia NS1DV/NS1ZV y proteínas virales.
Sensor: Sensor impedimétrico basado en MIP	
Límite de detección	0.3 ng/mL.
Rango lineal	No especificado.
Sensibilidad	Relación lineal de impedancia con NS1.
Selectividad	Selectividad frente a lisozima y FBS.
Sensor: Nanosensor multiplexado en papel	
Límite de detección	100 pM.
Rango lineal	No especificado.
Sensibilidad	GO-SiO ₂ mejora detección de ADN viral.
Selectividad	Alta especificidad por serotipos DENV.
Sensor: Biosensor ultrasensible basado en péptidos	
Límite de detección	1.21 ng/mL (CV), 0.43 ng/mL (DPV).
Rango lineal	No se menciona.
Sensibilidad	$2.62 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (CV), $2.42 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (DPV).
Selectividad	Reconoce epítipo DENV/18.
Sensor: Sensor para ADN de dengue y Zika	

Parámetro	Descripción
Límite de detección	0.98 nM (Zika), 1.04 nM (Dengue).
Rango lineal	No especificado.
Sensibilidad	Relación lineal, sin valor numérico.
Selectividad	Alta, sin reacción cruzada.
Sensor: Sensor basado en grafeno-polímero	
Límite de detección	0.12 pfu/mL.
Rango lineal	No se menciona.
Sensibilidad	Respuesta lineal, sin cuantificación exacta.
Selectividad	Reconoce diferentes virus, sin datos exactos.
Sensor: Aptasensor para dengue en suero	
Límite de detección	0.1 $\mu\text{g/mL}$.
Rango lineal	No especificado.
Sensibilidad	Relación lineal entre antígeno y señal.
Selectividad	No reacciona con Chikungunya.
Sensor: Nanobiosensor para dengue tipo 2	
Límite de detección	1 pfu/mL.
Rango lineal	Lineal entre 1–1000 pfu/mL.
Sensibilidad	Sensible a virus, sin número exacto.
Selectividad	Solo reacciona con DENV-2.
Sensor: Inmunosensor para proteína E del dengue	
Límite de detección	1.6 $\mu\text{g/mL}$.
Rango lineal	Lineal de 0.01–100 ng/mL .
Sensibilidad	Disminución de 18 μA por cada aumento de 10x en proteína.
Selectividad	Alta especificidad.
Sensor: Aptasensor con dos/tres electrodos	
Límite de detección	0.1 $\mu\text{g/mL}$.
Rango lineal	No especificado.
Sensibilidad	Señal 50x mayor con tres electrodos.
Selectividad	No se menciona si distingue otras proteínas.

Fuentes: [51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64]

Msterisles y Métodos

6.0.1. Base metodológica del desarrollo experimental

El desarrollo experimental del presente trabajo se realizó tomando como referencia metodologías previamente implementadas por el grupo de investigación iÓMICAS para la fabricación y caracterización de biosensores electroquímicos basados en inmovilización de anticuerpos y detección mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) [65, 66, 68].

Particularmente, se adoptaron procedimientos relacionados con la configuración electroquímica de la celda de medición, el análisis electroquímico mediante EIS y etapas de inmovilización biomolecular utilizando química EDC/NHS. No obstante, debido a las características específicas del biomarcador objetivo y del material conductor empleado en este trabajo, se realizaron modificaciones experimentales orientadas a la detección del antígeno NS1 del virus del dengue serotipo 2.

Entre las principales adaptaciones implementadas se encuentran el uso de grafeno inducido por láser (LIG) sobre sustrato de polimida como plataforma electroquímica, la evaluación comparativa de estrategias de activación superficial del electrodo y la incorporación de pruebas analíticas utilizando saliva artificial como matriz de evaluación preliminar.

Asimismo, a diferencia de estrategias previamente reportadas basadas en funcionalización mediante ligandos de ácido pireno butírico (PBA). En este trabajo se realizó una limpieza electroquímica del LIG mediante voltametría cíclica en solución de NaOH, sin el uso de ligandos, la cual podría inducir modificaciones superficiales asociadas al incremento de grupos funcionales oxigenados en el material, seleccionándose finalmente esta estrategia debido a su mayor estabilidad electroquímica y reproducibilidad experimental.

6.0.2. Criterios de diseño

El diseño del biosensor se desarrolló considerando criterios de sensibilidad analítica, estabilidad electroquímica, facilidad de fabricación y compatibilidad con técnicas de detección inmunológica. Para ello, se implementó una celda electroquímica basada en una configuración de tres electrodos, conformada por electrodo de trabajo, electrodo auxiliar y electrodo de referencia, debido a la estabilidad y reproducibilidad que este tipo de arquitectura ofrece en mediciones electroquímicas interfaciales [16].

Como plataforma conductora se empleó grafeno inducido por láser (Laser-Induced Graphene, LIG) sobre sustrato de polimida, seleccionado por sus propiedades electroquímicas, elevada área superficial, conductividad y facilidad de fabricación mediante procesos de bajo costo y rápida prototipación [7]. Adicionalmente, el LIG permite la incorporación de grupos funcionales superficiales que favorecen procesos posteriores de funcionalización química e inmovilización biomolecular [28].

La técnica de transducción seleccionada fue la espectroscopía de impedancia electroquímica (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS), debido a su capacidad para detectar modificaciones en la resistencia de transferencia de carga asociadas a eventos de reconocimiento antígeno-anticuerpo sobre la superficie del electrodo [19]. Asimismo, la EIS permite realizar detecciones tipo label-free, evitando el uso de marcadores adicionales y reduciendo la complejidad experimental [19].

Inicialmente, el desarrollo del sistema contempló una arquitectura multielectrodo orientada a la detección diferencial de los cuatro serotipos del virus del dengue. Sin embargo, con el fin de priorizar la validación analítica del biosensor, reducir la complejidad asociada a la funcionalización simultánea de múltiples bioreceptores y considerando la disponibilidad experimental de reactivos específicos para la validación individual de cada serotipo, el diseño final se enfocó exclusivamente en la detección del serotipo DENV-2. Esta decisión se sustentó además en la relevancia epidemiológica y circulación reportada de dicho serotipo en Colombia [10, 1].

Como biomarcador de detección se seleccionó la proteína NS1 del virus del dengue debido a su presencia durante las etapas tempranas de la infección y a su utilidad diagnóstica ampliamente reportada en la literatura [5]. Finalmente, el sistema fue concebido como una prueba de concepto orientada a evaluar la viabilidad analítica de un biosensor electroquímico para detección de NS1 en muestra de saliva artificial.

6.0.3. Herramientas y equipos

Durante el desarrollo experimental del biosensor electroquímico se emplearon diferentes equipos de laboratorio para los procesos de fabricación, caracterización, funcionalización y medición electroquímica.

Para la limpieza de materiales se utilizó un baño ultrasónico Elmasonic EASY 60 H [69]. Los procesos de secado y curado se realizaron mediante una estufa universal MEMMERT UN110 [70].

La fabricación de los electrodos de grafeno inducido por láser (LIG) sobre sustrato de poliimida se realizó utilizando un sistema de grabado láser VLS2.30 DT (Universal Laser Systems) equipado con un láser de CO₂ de 9,3 μm , empleado para la carbonización localizada de la superficie de poliimida y la generación de la estructura grafitica conductora [71].

La inspección visual y verificación de la geometría de los electrodos se efectuó utilizando un estereomicroscopio SMZ-171 (Motic, China) [72]. La caracterización estructural del grafeno inducido por láser se realizó mediante espectroscopia Raman utilizando un microscopio Raman DXR3 [73].

Las mediciones electroquímicas y los experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se llevaron a cabo utilizando un potenciostato/galvanostato PalmSens4 [74], controlado mediante el software PSTrace desarrollado por PalmSens BV [75]. Posteriormente, los espectros de impedancia obtenidos fueron analizados mediante la aplicación *A&M EIS Studio*, empleada para el ajuste de circuitos equivalentes y la extracción de parámetros electroquímicos, incluyendo la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}).

Para la preparación de soluciones y manipulación de reactivos se emplearon micropipetas Finn-pipette F2 [76], una balanza analítica RADWAG AS 220.R2 PLUS [77], microcentrifugas portátiles D1008 marca DLAB [78] y un agitador tipo vortex DLAB MX-S [79].

El control de pH de las soluciones utilizadas durante los procesos de funcionalización y preparación de muestras se realizó mediante un pH-metro HANNA edge pH [80].

6.0.4. Materiales y reactivos

6.0.4.1. Materiales estructurales

Se empleó una película de poliimida de $125\ \mu\text{m}$ de espesor como sustrato para la generación del grafeno inducido por láser (LIG). (Shijiazhuang Dadao Packaging Material Co., Ltd., Hebei, China). Asimismo, se utilizó tinta conductora Metalon Silver Ink JS-A211 para la elaboración de conexiones eléctricas [81] y tinta de plata/cloruro de plata Ag/AgCl (60/40) de Sigma-Aldrich para la modificación del electrodo de referencia [82]. Adicionalmente, se empleó cinta de máscara durante los procesos de fabricación y delimitación de las áreas activas del sensor.

6.0.4.2. Reactivos químicos

Durante los procesos de funcionalización química y caracterización electroquímica se utilizaron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), solución tampón fosfato salino (PBS), ferricianuro/ferrocianuro de potasio como sonda redox, hidróxido de sodio (NaOH), albúmina sérica bovina (BSA) y ácido clorhídrico para regular pH (HCl).

6.0.4.3. Reactivos biológicos

Como biomarcador objetivo se utilizó la proteína recombinante NS1 del virus del dengue serotipo 2 (DENV-2, cepa New Guinea C, His Tag) de Sino Biological [83]. Para el reconocimiento inmunológico se utilizó un anticuerpo monoclonal murino anti-NS1 del virus del dengue serotipo 2 [84].

Como proteínas interferentes para los ensayos de selectividad se emplearon la proteína recombinante nucleocápside de SARS-CoV-2 (2019) [85], la proteína recombinante RBV GP350 [86] y la proteína recombinante HPV18-L1 (ab119881) de Abcam, Ltd. (Cambridge, Reino Unido) [87].

6.0.5. Preparación del sustrato de poliimida

La película de poliimida Kapton fue cortada de acuerdo con las dimensiones requeridas para la fabricación de los sensores electroquímicos. Posteriormente, el sustrato fue sometido a un proceso de curado térmico en una estufa MEMMERT UN110 a $150\ ^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, con el fin de mejorar la estabilidad mecánica del sustrato durante el proceso de irradiación láser. Estudios recientes han reportado que la generación de LIG mediante irradiación láser puede inducir tensiones internas y efectos térmicos localizados sobre materiales basados en poliimida [88].

Posteriormente, las láminas de poliimida fueron sometidas a limpieza ultrasónica en un baño Elmasonic EASY 60 H utilizando alcohol isopropílico de grado analítico ($\geq 99\%$) durante 10 minutos a $60\ ^\circ\text{C}$. Este procedimiento se realizó con el propósito de remover contaminantes superficiales, residuos orgánicos y partículas presentes sobre el sustrato.[89]

6.0.6. Fabricación de los sensores

6.0.6.1. Diseño del sensor

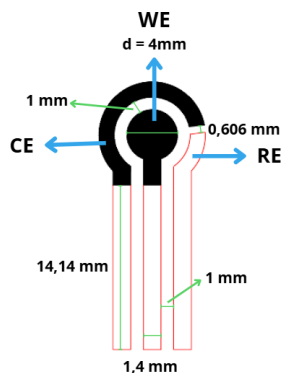


Figura 6.1: Diseño del sensor y sus dimensiones .
[90]

La Figura 6.1 presenta el diseño geométrico del sensor electroquímico desarrollado para la detección del antígeno NS1 del virus del dengue. El dispositivo fue diseñado bajo una configuración planar de tres electrodos, compuesta por un electrodo de trabajo (WE), un contraelectrodo (CE) y un pseudo-electrodo de referencia (RE), integrados sobre un sustrato de poliimida de $125 \mu\text{m}$ de espesor. La geometría del sistema fue definida con el propósito de garantizar una distribución homogénea de la muestra sobre la zona activa, una adecuada separación entre electrodos y estabilidad electroquímica durante las mediciones. El área geométrica del electrodo de trabajo fue de $0,126 \text{ cm}^2$, utilizada posteriormente como referencia para la comparación con el área electroactiva obtenida experimentalmente.

6.0.6.2. Adecuación de contactos y referencia electroquímica

Una vez definido el diseño geométrico del sensor, la fabricación de los electrodos de grafeno inducido por láser (LIG) se realizó sobre sustratos de poliimida de $125 \mu\text{m}$ de espesor mediante irradiación láser de CO_2 . El proceso de carbonización se llevó a cabo empleando dos etapas secuenciales: una etapa de rasterizado para la formación de las áreas activas de LIG y una etapa vectorial para la definición de contornos y conexiones eléctricas. Los parámetros de fabricación utilizados se resumen en la Tabla 6.1.

Cuadro 6.1: Parámetros de fabricación del LIG mediante irradiación láser.

Color	Modo	Potencia (%)	Velocidad (%)	PPI	Eje Z
Negro	Raster	11.0	14	250	+1
Rojo	Vector	17.0	100	1000	+1

Posteriormente, los terminales eléctricos de cada sensor fueron metalizados manualmente utilizando tinta conductora de plata previamente descrita en la sección de materiales. Para esta etapa se empleó un estereomicroscopio SMZ-171 y un microaplicador tipo pincel fino, con el fin de asegurar una deposición controlada del material conductor sobre las zonas de contacto. Una vez aplicada la tinta de plata, los sensores fueron sometidos a un proceso de curado térmico a 220 °C durante 30 minutos.

A continuación, el pseudo-electrodo de referencia fue modificado mediante la aplicación manual de tinta de cloruro de plata (Ag/AgCl), seguido de un proceso de curado a 60 °C durante 30 minutos. Finalmente, se incorporó una cinta de enmascaramiento sobre la superficie del dispositivo para delimitar el área electroquímica activa y garantizar una distribución controlada de la muestra durante las mediciones electroquímicas.

6.0.7. Metodología para la estimación del área electroactiva

La caracterización electroquímica del electrodo LIG se realizó mediante voltametría cíclica empleando una solución redox de ferri/ferrocianuro en PBS, realizando mediciones a diferentes velocidades de barrido en el rango de 0.05 a 0.30 V/s. Para cada velocidad de barrido se registraron múltiples ciclos voltamétricos, con el fin de obtener respuestas reproducibles de la corriente pico anódica y asegurar la consistencia del comportamiento electroquímico del sistema [91].

El área electroactiva se determinó aplicando la ecuación de Randles–Sevcik, la cual establece una relación lineal entre la corriente pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido bajo condiciones de transporte de masa controlado por difusión:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2} C v^{1/2} [91] \quad (6.1)$$

donde i_p corresponde a la corriente pico anódica, n es el número de electrones transferidos, A el área electroactiva, D el coeficiente de difusión, C la concentración de la sonda redox y v la velocidad de barrido. A partir de la pendiente obtenida de la gráfica i_p vs $v^{1/2}$, y utilizando los parámetros electroquímicos conocidos del sistema (número de electrones, coeficiente de difusión y concentración de la especie redox), se despejó el área electroactiva del electrodo. Este procedimiento permite estimar la superficie electroquímicamente activa real a partir del comportamiento voltamétrico del sistema [92, 93].

6.0.8. Metodología de caracterización mediante espectroscopía Raman

La caracterización estructural de los electrodos de grafeno inducido por láser (LIG) se realizó mediante espectroscopía Raman utilizando un microscopio Raman DRX 3. El equipo fue operado con un láser de 5 mW, realizando previamente el proceso de encendido, alineación óptica y calibración mediante un estándar de poliestireno, verificando la correcta posición del pico de referencia (1001.5 cm^{-1}) antes de la adquisición de los espectros.

Se trabajó con tres biosensores electroquímicos. Para el análisis del electrodo de trabajo se obtuvieron en total 15 espectros Raman de grafeno inducido por láser, correspondientes a cinco me-

diciones independientes por cada biosensor. En conjunto, estas mediciones permiten una evaluación representativa de la reproducibilidad estructural del material.

Las muestras fueron fijadas sobre portaobjetos de vidrio con cinta doble faz y enfocadas con objetivo de 10x bajo iluminación de luz blanca. Los espectros Raman se adquirieron configurando tiempos de exposición de 1 s con múltiples acumulaciones y corrección de fluorescencia mediante ajuste polinomial, con el fin de optimizar la relación señal-ruido. Finalmente, los espectros obtenidos permitieron la identificación de las bandas características D, G y 2D del material y su posterior análisis estructural [68].

6.0.9. Evaluación del método de funcionalización

Para cada estrategia de funcionalización se fabricaron y evaluaron tres sensores independientes ($n = 3$). La caracterización electroquímica de los sensores se realizó mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) durante las diferentes etapas de modificación superficial: superficie funcionalizada, inmovilización del anticuerpo y bloqueo con BSA. A partir de los diagramas de Nyquist obtenidos, se determinaron los valores de resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) mediante ajuste al circuito equivalente correspondiente.

Se evaluaron dos estrategias de modificación superficial del LIG: (i) una funcionalización mediante incorporación de ácido pireno butírico (PBA) y (ii) una modificación superficial basada únicamente en tratamiento electroquímico con NaOH, sin uso de ligando. En ambos métodos, la inmovilización covalente del anticuerpo se realizó mediante química de acoplamiento EDC/NHS.

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico descriptivo de los valores de R_{ct} , calculando el promedio, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) para cada etapa de funcionalización. Estos parámetros fueron utilizados para evaluar la estabilidad electroquímica y reproducibilidad intersensor de cada estrategia evaluada.

6.0.10. Funcionalización de los electrodos LIG

La funcionalización de los electrodos de grafeno inducido por láser (LIG) se realizó mediante activación electroquímica y modificación química superficial para permitir la inmovilización covalente del anticuerpo monoclonal anti-NS1 del virus del dengue.

6.0.10.1. Limpieza y modificación superficial del LIG

Reactivos

- Solución de NaOH 0.1 M
- Agua tipo I

Procedimiento

Se depositaron 75 μL de NaOH 0.1 M sobre la zona activa del sensor delimitada por la máscara dieléctrica. Posteriormente, se realizó una voltametría cíclica utilizando los parámetros mostrados en la Tabla 6.2.

Cuadro 6.2: Parámetros de voltametría cíclica para activación electroquímica del LIG

Parámetro	Valor
Tiempo de equilibrio	3 s
Potencial inicial	0.6 V
Potencial vértice 1	-0.6 V
Potencial vértice 2	0.6 V
Paso de potencial	0.01 V
Velocidad de barrido	0.05 V/s
Número de ciclos	15

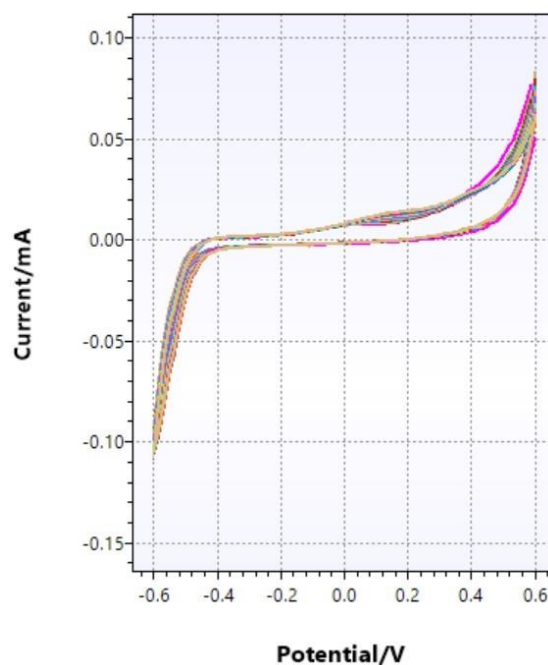


Figura 6.2: Voltametría cíclica realizada en solución de NaOH 0.1 M .

Finalizada la prueba, la solución fue retirada y los electrodos se lavaron cuidadosamente con agua tipo I.

6.0.10.2. Activación química mediante EDC/NHS

Preparación de soluciones

- EDC 0.1 M: disolución de 19.17 mg de EDC en 1 mL de buffer MES 0.5 M (pH 6.0).
- NHS 0.1 M: disolución de 11.51 mg de NHS en 1 mL de buffer MES 0.5 M (pH 6.0).

Posteriormente, ambas soluciones fueron mezcladas en proporción 1:1 para obtener una solución final de EDC 0.05 M y NHS 0.05 M.

Procedimiento

Se depositaron 8 μL de la solución EDC/NHS sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en un recipiente cubierto y protegido de la luz. Posteriormente, el exceso de solución fue retirado cuidadosamente con micropipeta.

6.0.10.3. Inmovilización del anticuerpo anti-NS1

Reactivos

- Anticuerpo monoclonal anti-NS1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

- PBS

Procedimiento

Se depositaron 6 μL de anticuerpo monoclonal anti-NS1 sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante 3 horas a 4 °C en un recipiente cerrado con humedad controlada para evitar evaporación. Posteriormente, los electrodos fueron lavados cuidadosamente con PBS utilizando micropipeta, evitando el contacto directo del chorro sobre la superficie funcionalizada.

6.0.10.4. Bloqueo con BSA

Reactivos

- BSA al 1 % en PBS

Procedimiento

Se depositó solución de BSA al 1 % sobre el electrodo de trabajo y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, los electrodos fueron lavados cuidadosamente con PBS.



Figura 6.3: Depósito de solución de BSA sobre el electrodo de trabajo durante la etapa de bloqueo de superficie.

6.0.10.5. Caracterización electroquímica basal

Con el fin de verificar la reproducibilidad electroquímica de los sensores funcionalizados, se realizaron mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) utilizando una solución redox de ferri/ferrocianuro.

Reactivos

- Solución de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 2 mM preparada en PBS

Procedimiento

Se depositaron 75 μ L de la solución redox cubriendo completamente la celda electroquímica. Las mediciones EIS se realizaron utilizando los parámetros mostrados en la Tabla 6.3.

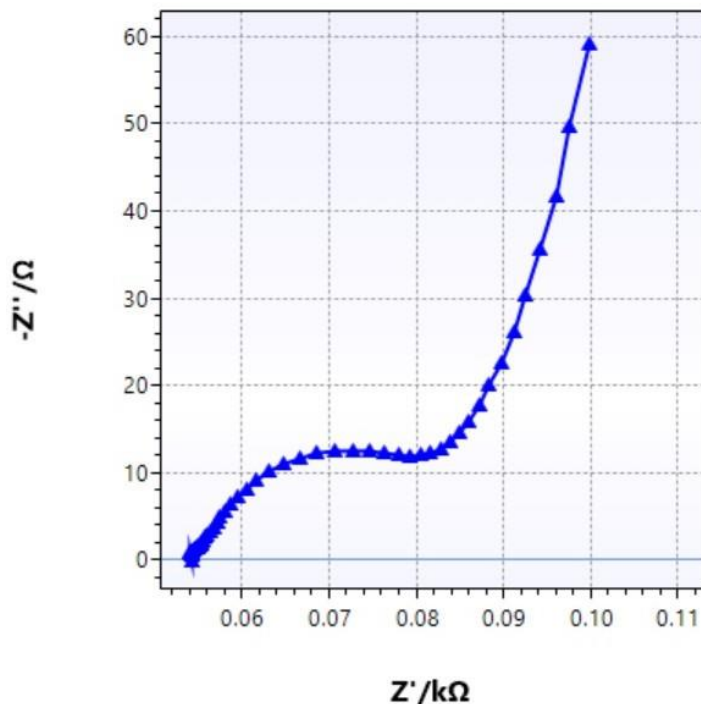


Figura 6.4: Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) del sistema en estado basal tras la modificación superficial con BSA, evidenciando el comportamiento interfacial del electrodo de grafeno inducido por láser (LIG).

Cuadro 6.3: Parámetros de EIS utilizados durante la caracterización electroquímica

Parámetro	Valor
Tiempo de equilibrio	10 s
Potencial DC	0.0 V
Amplitud AC	0.01 V
Rango de frecuencia	150 kHz – 2 Hz
Número de frecuencias	54
Medición vs OCP	Activada

6.0.10.6. Interacción con la proteína NS1 y medición electroquímica final

Se depositaron 6 μL de solución de proteína NS1 recombinante a la concentración correspondiente sobre el electrodo de trabajo. Posteriormente, se incubó durante 1.5 horas a 4 °C en un recipiente húmedo. Finalizada la incubación, los electrodos fueron lavados cuidadosamente con PBS para eliminar especies no unidas de forma específica.

Luego de la etapa de incubación, se añadieron nuevamente 75 μL de solución ferri/ferrocianuro

2 mM y se realizaron mediciones de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) bajo las mismas condiciones experimentales previamente descritas.

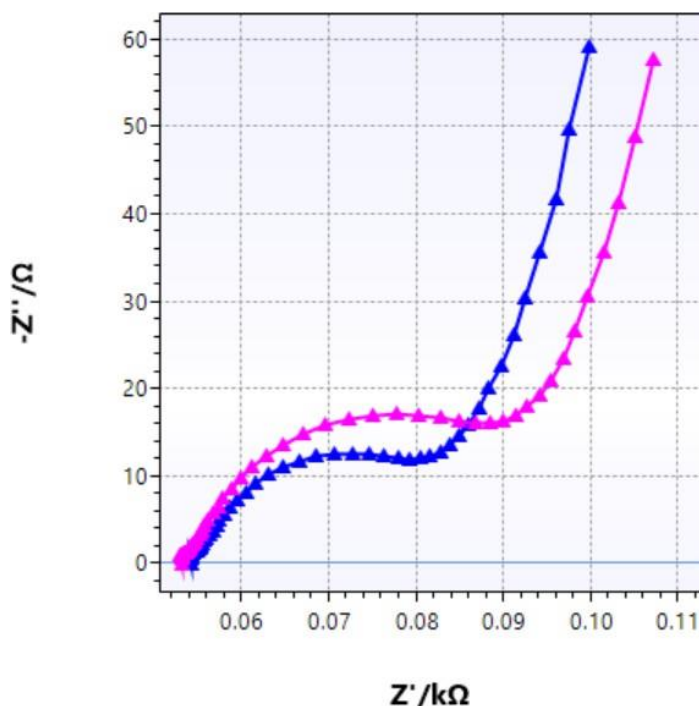


Figura 6.5: Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) del sensor tras la interacción con la proteína NS1, evidenciando el incremento en la resistencia de transferencia de carga asociado a la formación del complejo antígeno–anticuerpo.

La interacción antígeno–anticuerpo fue evaluada mediante el análisis del incremento en la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}), el cual refleja la modificación de la interfase electrodo–solución tras la unión específica de la proteína NS1.

6.0.11. Construcción de la curva de calibración

La curva de calibración del biosensor fue construida utilizando cinco concentraciones de la proteína NS1 del virus del dengue serotipo 2 (DENV-2): 1, 10, 50, 100 y 200 ng/mL. Para cada punto de concentración se emplearon tres sensores independientes, obteniendo posteriormente el promedio y la desviación estándar del cambio en la resistencia de transferencia de carga (ΔR_{ct}).

El parámetro analítico utilizado correspondió al cambio en la resistencia de transferencia de carga calculado a partir de las mediciones obtenidas mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), según la siguiente expresión:

$$\Delta R_{ct} = R_{ct,final} - R_{ct,initial} \quad (6.2)$$

donde $R_{ct,initial}$ corresponde a la resistencia de transferencia de carga posterior al proceso de funcionalización y bloqueo con BSA, mientras que $R_{ct,final}$ corresponde al valor obtenido después de la incubación con la proteína objetivo.

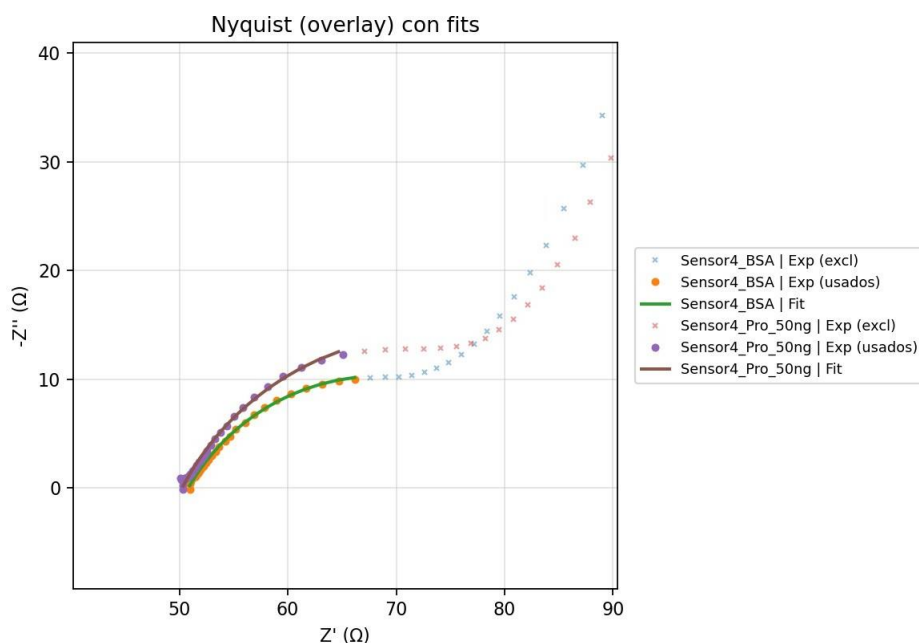


Figura 6.6: Ajuste de los espectros de impedancia electroquímica mediante un circuito equivalente de Randles modificado (CPE), mostrando la diferencia entre los valores de R_{ct} inicial y final utilizados para el cálculo de ΔR_{ct} .

Los valores de R_{ct} fueron obtenidos mediante ajuste de los espectros de impedancia a un circuito equivalente de Randles modificado con elemento de fase constante (CPE). La calidad del ajuste de los espectros de impedancia fue evaluada mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el error cuadrático chi-cuadrado reducido (χ^2), parámetros comúnmente empleados para validar la concordancia entre los datos experimentales y el circuito equivalente seleccionado. Adicionalmente, la selección del circuito de Randles modificado con elemento de fase constante (CPE) se fundamentó en su capacidad para representar superficies electroquímicas no ideales, asociadas a heterogeneidad superficial y distribución no uniforme de constantes de tiempo, características comúnmente reportadas en electrodos basados en materiales carbonosos porosos [94]. Posteriormente, se realizó el ajuste lineal de la curva de calibración utilizando los valores promedio de ΔR_{ct} y sus respectivas desviaciones estándar para cada concentración evaluada, obteniendo la ecuación de calibración, la pendiente analítica (m) y el coeficiente de determinación (R^2).

Adicionalmente, con el fin de evaluar la reproducibilidad intersensor para cada concentración,

se calculó el coeficiente de variación porcentual (%CV) a partir de la relación entre la desviación estándar y el valor promedio de ΔR_{ct} . Finalmente, para determinar si las diferencias observadas entre las concentraciones evaluadas correspondían a cambios estadísticamente significativos en la respuesta electroquímica del biosensor, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ [95].

6.0.12. Determinación del límite de detección y límite de cuantificación

Para la determinación del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se realizaron mediciones blanco utilizando sensores funcionalizados y bloqueados con BSA, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales de incubación empleadas para la detección de la proteína NS1, pero sin adicionar la proteína objetivo. Posteriormente, se calcularon los cambios de ΔR_{ct} asociados al blanco experimental.

A partir de las mediciones blanco se obtuvo el promedio y la desviación estándar correspondiente, utilizando esta última para el cálculo del LOD y LOQ según las expresiones analíticas convencionales reportadas para métodos de calibración [96]:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{m} \quad (6.3)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad (6.4)$$

donde σ corresponde a la desviación estándar del blanco y m corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

Posteriormente, con el fin de contextualizar el desempeño analítico del sistema desarrollado frente a tecnologías reportadas para la detección de NS1 del virus del dengue, se realizó una comparación bibliográfica con métodos convencionales de referencia, incluyendo ELISA y RT-PCR, así como con inmunosensores electroquímicos reportados recientemente en la literatura, considerando parámetros como límite de detección, tipo de matriz analizada, tiempo aproximado de respuesta y requerimiento de marcadores electroquímicos.

6.0.13. Evaluación de selectividad

La selectividad del biosensor fue evaluada mediante ensayos de reactividad cruzada utilizando proteínas asociadas a otras enfermedades virales. Para ello, se emplearon proteínas recombinantes correspondientes a SARS-CoV-2 (COVID-19), virus de Epstein-Barr (EBV) y virus del papiloma humano (VPH).

Para cada enfermedad interferente se utilizaron tres sensores independientes, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones de funcionalización, incubación y medición empleadas para la detección de la proteína NS1 del dengue. Posteriormente, se calcularon los valores promedio y desviaciones estándar de ΔR_{ct} obtenidos para cada proteína interferente.

Por consiguiente, con el fin de evaluar estadísticamente la respuesta del biosensor frente a las proteínas no diana, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) sobre los valores de

ΔR_{ct} obtenidos para cada proteína heteróloga. Posteriormente, se realizaron pruebas *t* de Student para dos muestras independientes, comparando la respuesta obtenida frente a la proteína objetivo NS1 con cada una de las proteínas interferentes evaluadas, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ [95].

6.0.14. Preparación de saliva artificial

Para la evaluación preliminar del biosensor en una matriz simulada, se preparó una solución de saliva artificial utilizando agua tipo I como solvente.

Cuadro 6.4: Composición de la saliva artificial utilizada durante pruebas experimentales.

Componente	Concentración final (mM)
KCl	17.98
NaCl	4.29
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.95
[42, 43] Na ₂ HPO ₄	1.95
NaHCO ₃	3.27
CaCl ₂	1.10
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.08
Urea	3.33
H ₂ SO ₄	0.50

El pH final de la solución fue ajustado a 7.2.

6.0.15. Prueba de concepto en matriz de saliva artificial

Con el fin de realizar una evaluación preliminar del desempeño del biosensor en una matriz simulada, se preparó una solución de saliva artificial adicionada con proteína NS1 del virus del dengue serotipo 2 a una concentración final de 30 ng/mL.

Para esta prueba se utilizaron 12 sensores independientes, los cuales fueron sometidos al mismo protocolo de funcionalización, incubación y medición electroquímica previamente descrito. Posteriormente, se determinó el cambio en la resistencia de transferencia de carga (ΔR_{ct}) de cada sensor mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS).

A partir de la ecuación obtenida en la curva de calibración, se estimó la concentración equivalente correspondiente al ΔR_{ct} medido para cada sensor. Posteriormente, se calculó el porcentaje de recuperación (*recovery*) respecto a la concentración teórica de 30 ng/mL utilizando la siguiente expresión:

$$Recovery(\%) = \frac{C_{experimental}}{C_{teorica}} \times 100 \quad (6.5)$$

donde $C_{experimental}$ corresponde a la concentración calculada mediante la ecuación de calibración y $C_{teorica}$ corresponde a la concentración nominal de 30 ng/mL preparada en la matriz de saliva

artificial.

Finalmente, los porcentajes de recuperación obtenidos para cada sensor fueron comparados gráficamente respecto al valor ideal de recuperación del 100 %, con el fin de evaluar el desempeño analítico del biosensor en una matriz compleja simulada.

Resultados y Discusión

7.0.1. Selección del método de funcionalización

Los resultados del análisis estadístico descriptivo se muestran en la Tabla 7.1. Los sensores tratados con NaOH presentaron valores bajos y homogéneos de R_{ct} en la superficie inicial, seguidos de un incremento progresivo tras la inmovilización del anticuerpo y el posterior bloqueo con BSA. Este comportamiento es consistente con la formación escalonada del inmunosensor, ya que cada modificación superficial genera una mayor dificultad en la transferencia electrónica.

En contraste, los sensores tratados con PBA presentaron una alta variabilidad en los valores de R_{ct} , evidenciada por coeficientes de variación elevados y respuestas inconsistentes entre sensores, incluyendo cambios no uniformes después de la modificación con anticuerpo y BSA.

Cuadro 7.1: Comparación estadística de los valores de R_{ct} para los métodos evaluados ($n = 3$ sensores por grupo).

Método	Etapas	Promedio R_{ct}	SD	CV (%)
PBA	Inicial	709.83	557.44	78.53
PBA	Anticuerpo	634.51	165.31	26.05
PBA	BSA	922.24	204.13	22.13
NaOH	Inicial	12.11	6.57	54.26
NaOH	Anticuerpo	20.24	5.48	27.08
NaOH	BSA	62.55	13.24	21.16

La Figura 7.1 presenta diagramas de Nyquist representativos obtenidos para los sensores tratados con PBA y NaOH durante las diferentes etapas de la funcionalización.

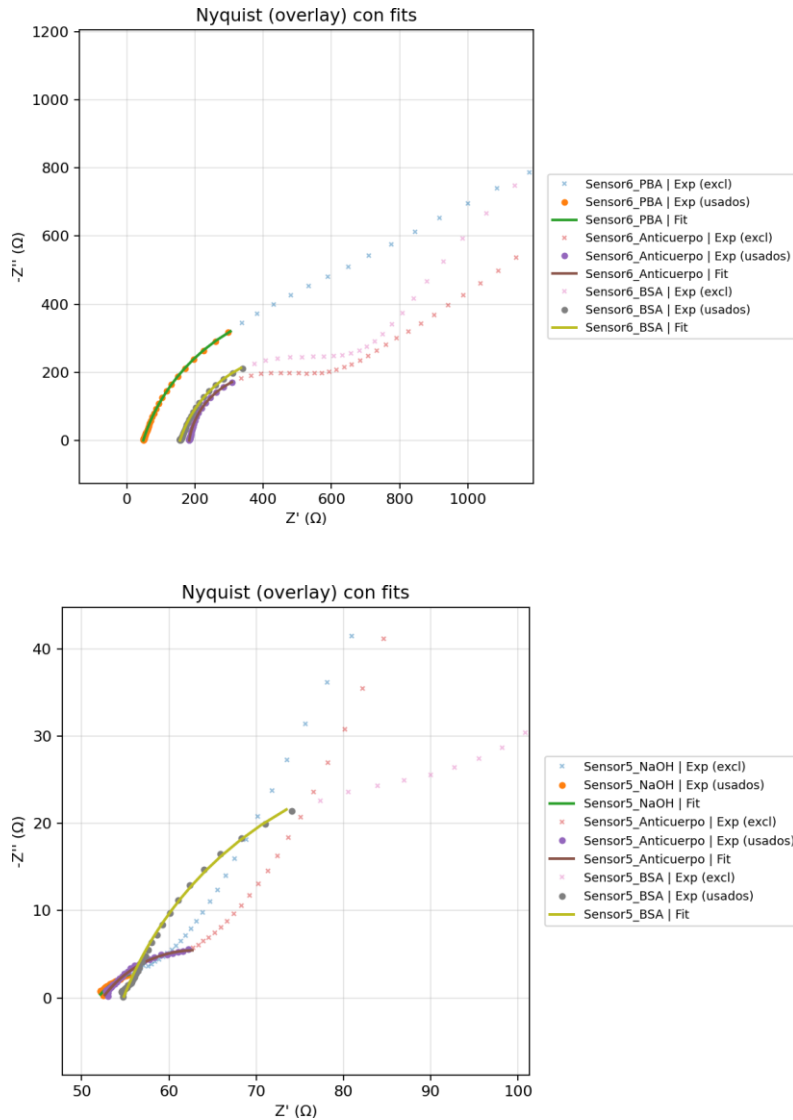


Figura 7.1: Diagramas de Nyquist representativos de los sensores funcionalizados mediante PBA y NaOH durante las diferentes etapas de la funcionalización.

En términos estadísticos y electroquímicos, el tratamiento sin ligando, realizando la limpieza con NaOH presentó una menor dispersión de los datos y un comportamiento más uniforme entre réplicas experimentales en comparación con el uso de PBA, lo que permitió seleccionar este método como la estrategia más adecuada para la construcción del biosensor. Además, el incremento progresivo de R_{ct} observado en las etapas de anticuerpo y BSA confirma una modificación superficial más estable y reproducible, acorde con el comportamiento esperado para la formación de un inmunosensor electroquímico.

7.0.2. Caracterización estructural por espectroscopía Raman

La caracterización estructural del grafeno inducido por láser (LIG) se realizó mediante espectroscopía Raman con el fin de evaluar las propiedades gráficas y la reproducibilidad del material empleado en los biosensores. Para ello, se adquirieron un total de 15 espectros Raman independientes correspondientes a tres biosensores diferentes, realizando cinco mediciones sobre distintas regiones de la superficie de cada sensor. A partir de estos espectros se obtuvieron los valores promedio y la desviación estándar de las bandas características del material.

Los resultados evidenciaron las bandas características del carbono gráfico en $1349.83 \pm 1.64 \text{ cm}^{-1}$ (D), $1583.44 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ (G) y $2699.38 \pm 2.91 \text{ cm}^{-1}$ (2D). La banda G se asocia a vibraciones del carbono sp^2 en redes gráficas, mientras que la banda D está relacionada con defectos estructurales y bordes presentes en el material. Asimismo, la presencia de la banda 2D confirma la existencia de dominios gráficicos con cierto grado de apilamiento [97, 98].

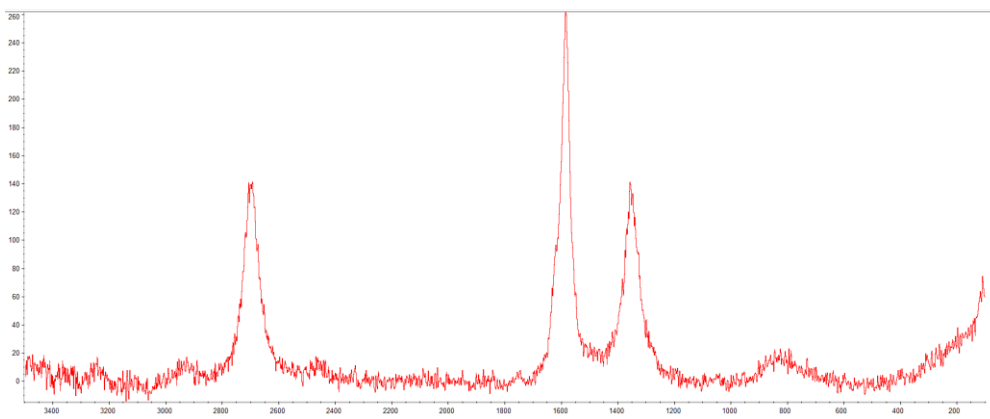


Figura 7.2: Espectro Raman representativo del electrodo de grafeno inducido por láser (LIG), donde se observan las bandas D, G y 2D características del material.

Los parámetros estructurales obtenidos a partir del análisis Raman mostraron una relación $I_D/I_G = 0,61 \pm 0,16$ y una relación $I_{2D}/I_G = 0,58 \pm 0,06$. La relación I_D/I_G indica un nivel moderado de defectos estructurales, característico del grafeno inducido por láser, donde la formación de bordes, poros y dominios sp^2 parcialmente desordenados incrementa la densidad de sitios electroquímicamente activos. Por su parte, el valor de I_{2D}/I_G sugiere una estructura multicapa con apilamiento desordenado, en lugar de grafeno monocapa, confirmando la naturaleza parcialmente gráfica del material y su relevancia para aplicaciones electroquímicas debido a su alta área superficial y actividad interfacial [97, 98].

7.0.3. Área electroactiva del electrodo LIG

A partir del análisis voltamétrico del sistema ferri/ferrocianuro en PBS en el rango de 0.05 a 0.30 V/s, se obtuvo una relación lineal entre la corriente pico anódica (i_p) y la raíz cuadrada de la

velocidad de barrido ($v^{1/2}$), comportamiento característico de un proceso controlado por difusión en sistemas redox [91]. Mediante la pendiente de dicha relación y la ecuación de Randles–Sevcik, se determinó un área electroactiva aparente de $0,916 \text{ cm}^2$. Adicionalmente, se obtuvo una separación de potencial pico ($\Delta E_p = 96 \text{ mV}$) y una relación de corrientes pico I_{pa}/I_{pc} de 1.06, indicando un comportamiento cuasi-reversible del sistema redox y una cinética de transferencia electrónica adecuada [92, 93].

El área electroactiva obtenida es significativamente mayor que el área geométrica del electrodo ($0,126 \text{ cm}^2$), lo cual se atribuye a la elevada rugosidad superficial, la porosidad y la arquitectura tridimensional multicapa del grafeno inducido por láser, características que incrementan la superficie electroquímicamente activa disponible para la transferencia de carga [92, 68].

7.0.4. Consideraciones sobre la caracterización superficial del LIG

La caracterización realizada mediante espectroscopía Raman permitió evaluar indirectamente la estructura gráfica y el nivel de defectos presentes en el LIG, mientras que la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) permitió analizar los cambios electroquímicos asociados al proceso de funcionalización y modificación superficial del biosensor. Sin embargo, estas técnicas no permiten describir completamente aspectos relacionados con la morfología, porosidad, homogeneidad superficial o composición química detallada del material funcionalizado.

Técnicas complementarias como microscopía electrónica de barrido (SEM) podrían emplearse para evaluar la morfología y porosidad superficial del LIG [99], mientras que la microscopía de fuerza atómica (AFM) permitiría analizar la rugosidad y uniformidad superficial [100]. De igual manera, técnicas como espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) y FTIR podrían utilizarse para estudiar la composición química superficial y confirmar la presencia de grupos funcionales asociados al proceso de funcionalización e inmovilización del anticuerpo [101, 102]. Adicionalmente, el mapeo Raman permitiría evaluar la homogeneidad estructural del LIG sobre toda la superficie del electrodo, así como posibles variaciones espaciales asociadas al número de capas y distribución de defectos [103].

Aunque estas técnicas no fueron implementadas en el presente trabajo, su incorporación en estudios futuros permitiría obtener una caracterización fisicoquímica más completa del material y complementar los resultados electroquímicos obtenidos.

7.0.5. Validación del modelo electroquímico y calidad del ajuste

Con el fin de evaluar la confiabilidad del modelo electroquímico empleado para la extracción de los parámetros de impedancia, se analizaron los indicadores estadísticos de calidad correspondientes a los 30 ajustes realizados durante la construcción de la curva de calibración, considerando tanto las mediciones previas a la incubación con la proteína objetivo (BSA) como las mediciones posteriores a la formación del inmunocomplejo.

Cuadro 7.2: Parámetros estadísticos del ajuste del circuito equivalente de Randles modificado con CPE para los espectros de impedancia empleados en la construcción de la curva de calibración ($n = 30$ ajustes).

Parámetro	Promedio	Desviación estándar
R^2	0.99993	$2,33 \times 10^{-5}$
χ^2	$4,24 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-5}$

Adicionalmente, la Figura 7.3 presenta un ejemplo representativo del ajuste experimental obtenido mediante el circuito equivalente seleccionado.

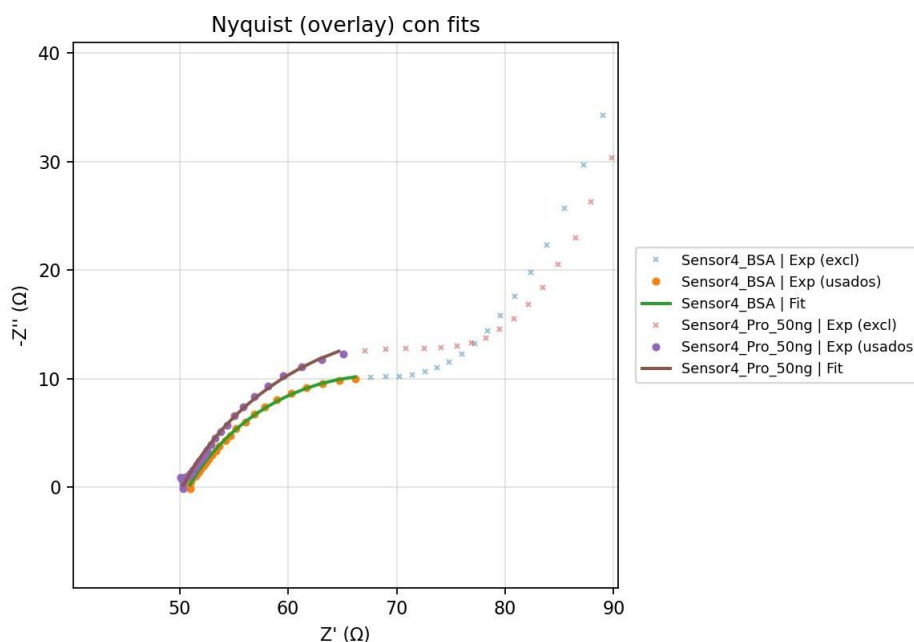


Figura 7.3: Ejemplo representativo del ajuste de los espectros de impedancia electroquímica mediante un circuito equivalente de Randles modificado con elemento de fase constante (CPE), mostrando la concordancia entre los datos experimentales y el modelo ajustado.

Los resultados mostraron un coeficiente de determinación promedio de $R^2 = 0,99993 \pm 2,33 \times 10^{-5}$ y un error chi-cuadrado promedio de $\chi^2 = (4,24 \pm 1,53) \times 10^{-5}$, evidenciando una alta concordancia entre los datos experimentales y el circuito equivalente seleccionado. Estos resultados respaldan la capacidad del modelo electroquímico empleado para describir adecuadamente la respuesta interfacial del sistema y permiten una extracción confiable de los valores de resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) utilizados en los análisis posteriores.

La incorporación del elemento de fase constante (CPE) permitió modelar el comportamiento capacitivo no ideal de la interfaz electrodo–electrolito, asociado a heterogeneidades superficiales, rugosidad y distribución no uniforme de constantes de tiempo, características comúnmente repor-

tadas en materiales carbonosos porosos y sistemas electroquímicos basados en grafeno [94]. Aunque en el presente estudio no se realizó una comparación formal con circuitos equivalentes alternativos ni se incluyeron diagramas de Bode, los indicadores estadísticos obtenidos y la concordancia visual observada en los ajustes sugieren que el modelo de Randles modificado con CPE representa adecuadamente el comportamiento electroquímico del biosensor bajo las condiciones experimentales evaluadas.

7.0.6. Curva de calibración

La Tabla 7.3 presenta los valores promedio de ΔR_{ct} obtenidos para cada concentración evaluada de la proteína NS1 del virus del dengue serotipo 2, junto con su respectiva desviación estándar.

Cuadro 7.3: Promedio de la respuesta electroquímica del biosensor para cada concentración de proteína NS1, junto con la desviación estándar y el coeficiente de variación intersensor.

Concentración (ng/mL)	ΔR_{ct} (Ω)	SD (Ω)	CV (%)
1	0.776	0.449	57.879
10	5.232	0.390	7.460
50	9.967	0.757	7.597
100	15.098	1.373	9.096
200	29.672	3.266	11.008

A partir de los datos experimentales se obtuvo una pendiente de calibración de:

$$m = 0,1360 \Omega/(\text{ng/mL}) \quad (7.1)$$

Posteriormente, se realizó el ajuste lineal de la curva de calibración utilizando los valores promedio de ΔR_{ct} para cada concentración evaluada. La Figura 7.4 muestra la relación entre la concentración de la proteína NS1 y la respuesta electroquímica del biosensor, expresada como el cambio en la resistencia de transferencia de carga (ΔR_{ct}). Los datos experimentales presentaron un comportamiento lineal descrito por la Ecuación 7.2, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9866$.

$$\Delta R_{ct} = 0,136C + 2,3276 \quad (7.2)$$

Los resultados obtenidos evidenciaron un incremento progresivo del ΔR_{ct} a medida que aumentó la concentración de proteína NS1, lo cual indica una respuesta electroquímica dependiente de la concentración del analito objetivo. Este comportamiento es consistente con el mecanismo esperado de detección inmunológica mediante EIS, donde la formación del complejo antígeno-anticuerpo sobre la superficie del electrodo genera una mayor oposición a la transferencia de carga del sistema redox.

La pendiente obtenida para la curva de calibración ($m = 0,1360 \Omega/(\text{ng/mL})$) representa la sensibilidad analítica del biosensor dentro del rango evaluado, indicando que por cada incremento unitario en la concentración de proteína NS1, la resistencia de transferencia de carga aumenta en

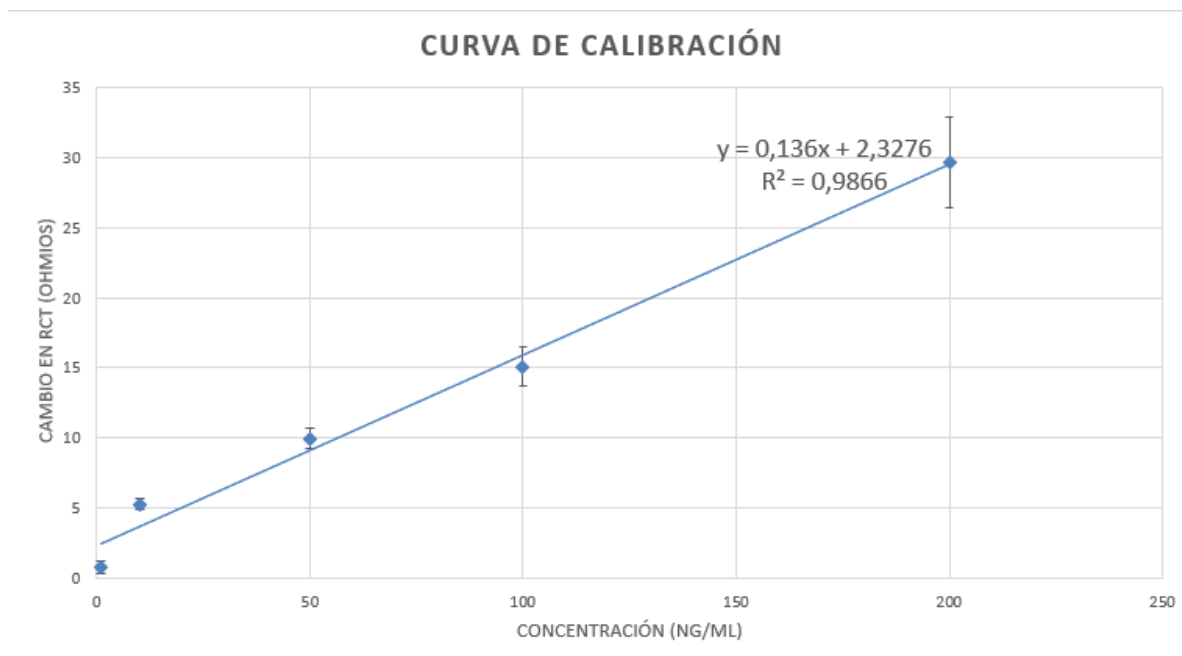


Figura 7.4: Curva de Calibración

promedio $0,136 \Omega$. Este comportamiento confirma la capacidad del sistema para transducir cambios en la concentración del analito en una señal electroquímica cuantificable.

Adicionalmente, la curva de calibración presentó un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9866$, evidenciando una alta correlación lineal entre la concentración de la proteína NS1 y la respuesta electroquímica del biosensor dentro del rango evaluado (1–200 ng/mL). Previo a la aplicación del análisis de varianza (ANOVA), se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro–Wilk para cada una de las concentraciones analizadas. Los resultados obtenidos no mostraron evidencia suficiente para rechazar la hipótesis de normalidad en ninguno de los grupos evaluados ($p > 0,05$), por lo que se consideró apropiado el empleo de pruebas estadísticas paramétricas para comparar las respuestas electroquímicas entre concentraciones. El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de concentración evaluados ($F = 138,44$, $p = 1,04 \times 10^{-8}$), confirmando que el incremento observado en ΔR_{ct} responde de manera dependiente a la concentración del analito dentro del rango estudiado y no puede atribuirse exclusivamente a la variabilidad experimental del sistema.

Asimismo, el análisis de reproducibilidad intersensor, evaluado mediante el coeficiente de variación (CV), mostró valores comprendidos entre 7.46 % y 11.01 % para el rango de 10 a 200 ng/mL, indicando una adecuada repetibilidad experimental entre biosensores fabricados bajo las mismas condiciones. Aunque la dispersión absoluta de la señal, expresada como desviación estándar, tendió a incrementarse con la concentración del analito, el comportamiento relativo permaneció estable dentro del rango cuantificable del sistema. En contraste, para la concentración de 1 ng/mL se obtuvo un CV de 57.88 %, evidenciando una mayor variabilidad relativa en concentraciones cercanas

al límite de detección, donde la relación señal/ruido y pequeñas variaciones interfaciales adquieren una influencia más significativa sobre la respuesta electroquímica.

En conjunto, estos resultados evidencian que la plataforma desarrollada presenta una respuesta electroquímica dependiente de la concentración de proteína NS1, con adecuada linealidad, sensibilidad analítica y reproducibilidad intersensor dentro del rango cuantificable evaluado, confirmando la consistencia experimental de la arquitectura electroquímica propuesta bajo las condiciones de prueba establecidas.

7.0.7. Determinación del límite de detección y cuantificación

La Tabla 7.4 presenta el promedio de los valores obtenidos para las mediciones blanco realizadas utilizando sensores funcionalizados y bloqueados con BSA en ausencia de la proteína objetivo.

Cuadro 7.4: Valores promedio del blanco experimental (BSA).

ΔR_{ct} (Ω)	Desviación estándar (Ω)
0.202	0.250

A partir de la desviación estándar del blanco experimental y la pendiente de la curva de calibración, se calcularon el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) utilizando las ecuaciones descritas previamente.

Cuadro 7.5: Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del biosensor.

LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
5.511	18.370

Los resultados obtenidos demuestran que el biosensor presenta capacidad de detección dentro del rango analítico evaluado, evidenciando una respuesta electroquímica reproducible frente a concentraciones crecientes de proteína NS1. El bajo valor de ΔR_{ct} obtenido para el blanco experimental sugiere una adecuada estabilidad de la superficie funcionalizada y una baja contribución de señales inespecíficas asociadas al proceso de bloqueo con BSA.

Adicionalmente, la diferencia observada entre los valores de LOD y LOQ evidencia que, aunque el biosensor es capaz de detectar concentraciones cercanas a 5.511 ng/mL, las mediciones cuantitativas con mayor confiabilidad analítica se encuentran por encima de aproximadamente 18.370 ng/mL, donde la señal presenta una relación señal/ruido más robusta y reproducible.

No obstante, estos parámetros deben analizarse críticamente en relación con las concentraciones de proteína NS1 reportadas en saliva durante infecciones por dengue, las cuales se han descrito en un rango aproximado de 0.5 a 41.5 ng/mL, con valores promedio cercanos a 3.8 ng/mL [4]. En este contexto, el límite de detección obtenido en el presente trabajo se encuentra por encima del valor promedio reportado en la literatura y de una fracción del rango fisiológico descrito, lo que sugiere

que muestras clínicas con bajas concentraciones de NS1 podrían no generar una respuesta detectable bajo las condiciones analíticas actuales.

Por ende, aunque los resultados obtenidos demuestran la factibilidad del sistema como una prueba de concepto electroquímica en matriz simulada, el desempeño analítico alcanzado aún debe interpretarse dentro de un contexto preclínico, ya que el límite de detección obtenido podría restringir la identificación de muestras con bajas concentraciones de NS1 dentro del rango salival reportado en la literatura. Por ello, resulta relevante contextualizar el comportamiento del sistema desarrollado frente a inmunosensores para detección de NS1 previamente reportados, con el fin de establecer su posicionamiento analítico dentro del estado actual de la tecnología.

7.0.8. Comparación del desempeño analítico con tecnologías reportadas

La Tabla 7.6 presenta una comparación del desempeño analítico del biosensor desarrollado frente a tecnologías reportadas para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue, incluyendo métodos convencionales de referencia como ELISA y RT-PCR, así como inmunosensores electroquímicos descritos recientemente en la literatura. Para esta comparación se consideraron parámetros como límite de detección, tipo de matriz analizada, tiempo aproximado de respuesta y requerimiento de marcadores o etiquetas electroactivas.

Cuadro 7.6: Comparación del desempeño analítico del biosensor desarrollado frente a tecnologías reportadas para la detección de dengue.

Tecnología	LOD	Matriz	Tiempo	Label-free	Referencia
ELISA (NS1 DENV-2)	3.91 ng/mL	Suero	2–5 h	No	[104]
RT-PCR	10^3 – 10^4 GCE/mL	Suero/plasma	3–6 h	No	[105]
Sensor peptídico electroquímico	0.2 ng/mL	PBS	~30 min	Sí	[53]
Sensor MIP impedimétrico	0.3 ng/mL	PBS	~20 min	Sí	[64]
Sensor de carbono poroso	0.18 ng/mL	Suero	~15 min	Sí	[54]
Inmunosensor AuNP/rGO	0.38 ng/mL	Suero	~30 min	Sí	[62]
Este trabajo (LIG-EIS)	5.511 ng/mL	Saliva artificial	~15 min	Sí	Este trabajo

RT-PCR detecta ARN viral y su límite de detección se expresa en equivalentes de copias genómicas por volumen, por lo que no es directamente comparable con métodos basados en detección de proteína NS1.

Como se observa en la Tabla 7.6, el biosensor desarrollado en este trabajo presentó un límite de detección de 5.511 ng/mL para la proteína NS1 de DENV-2, valor que, aunque superior al reportado para ensayos ELISA dirigidos al mismo biomarcador y serotipo (~ 3.91 ng/mL), se encuentra dentro del rango de desempeño reportado para plataformas electroquímicas orientadas a la detección de NS1 del virus del dengue. En comparación con otros inmunosensores electroquímicos reportados en la literatura, algunos sistemas presentan límites de detección inferiores al obtenido en este estudio, lo cual puede atribuirse al uso de arquitecturas más complejas basadas en nanomateriales funcionalizados, estrategias de amplificación de señal o etapas adicionales de modificación superficial.

En contraste, la plataforma desarrollada emplea una arquitectura *label-free* basada en espectroscopía de impedancia electroquímica sobre electrodos de grafeno inducido por láser fabricados directamente sobre sustratos flexibles, lo que simplifica el proceso de fabricación y favorece su potencial integración en futuras plataformas portátiles. Adicionalmente, aunque técnicas moleculares como RT-PCR fueron incluidas como referencia diagnóstica de uso clínico, estas detectan ARN viral en lugar de biomarcadores proteicos como NS1, por lo que sus límites de detección no son directamente comparables con los obtenidos en el presente estudio. No obstante, su inclusión permite contextualizar diferencias importantes en infraestructura requerida, complejidad operativa y tiempo de respuesta frente a la plataforma electroquímica propuesta. En conjunto, estos resultados posicionan el sistema desarrollado como una prueba de concepto electroquímica funcional, cuyo principal aporte radica en la validación experimental de la arquitectura propuesta y en la demostración preliminar de detección de NS1 en saliva artificial fortificada, aunque aún serán necesarias mejoras en sensibilidad analítica y validaciones en matrices biológicas reales para aproximarse al desempeño de tecnologías diagnósticas consolidadas.

7.0.9. Evaluación y análisis de selectividad

La Tabla 7.7 presenta los valores promedio de ΔR_{ct} obtenidos durante los ensayos de reactividad cruzada frente a proteínas interferentes correspondientes a COVID-19, virus de Epstein-Barr (EBV) y virus del papiloma humano (VPH). Complementariamente, la Figura 7.5 muestra la respuesta electroquímica promedio obtenida para cada interferente en comparación con los umbrales analíticos correspondientes al límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del biosensor. Con el fin de comparar las respuestas electroquímicas obtenidas frente a las proteínas interferentes con los umbrales analíticos del biosensor, los valores de LOD y LOQ expresados originalmente en unidades de concentración (ng/mL) fueron representados a sus señales equivalentes de ΔR_{ct} mediante la ecuación de calibración obtenida experimentalmente.

Cuadro 7.7: Resultados de reactividad cruzada del biosensor frente a proteínas interferentes.

Enfermedad	ΔR_{ct} (Ω)	Desviación estándar (Ω)
COVID-19 (200 ng/mL)	2.666	0.757
EBV (200 ng/mL)	2.616	1.147
VPH (200 ng/mL)	3.164	0.517

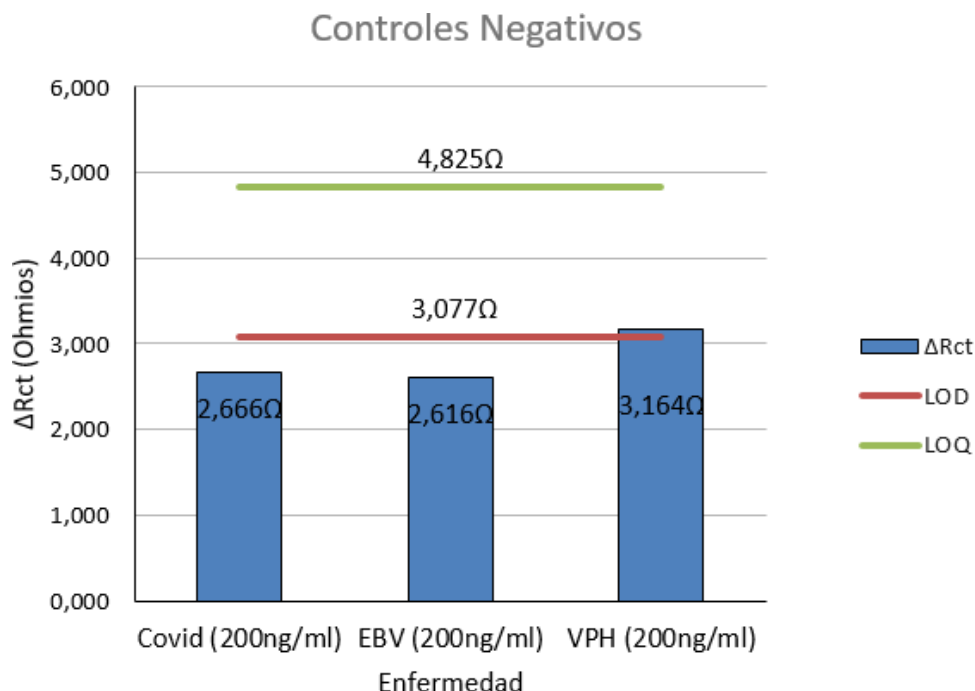


Figura 7.5: Reactividad cruzada frente a proteínas interferentes en comparación con las señales equivalentes al límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Previo a la aplicación de las pruebas paramétricas, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro–Wilk. Los resultados obtenidos para COVID-19 ($W = 0,999$, $p = 0,945$), EBV ($W = 0,937$, $p = 0,516$) y VPH ($W = 0,990$, $p = 0,804$) no mostraron evidencia suficiente para rechazar la hipótesis de normalidad ($p > 0,05$). En consecuencia, se consideró apropiado el empleo de pruebas estadísticas paramétricas para el análisis comparativo de los grupos evaluados.

Los resultados del análisis de varianza de una vía (ANOVA) no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas obtenidas para las proteínas heterólogas evaluadas ($F = 0,383$, $p = 0,698$), indicando un comportamiento electroquímico comparable y consistentemente bajo frente a los diferentes interferentes seleccionados.

De manera complementaria, las pruebas t de Student realizadas entre la respuesta obtenida para la proteína NS1 del dengue (200 ng/mL) y cada una de las proteínas interferentes mostraron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos, observándose valores de $p = 0,0051$ para COVID-19, $p = 0,0054$ para EBV y $p = 0,0051$ para VPH. Estos resultados confirman que el incremento de impedancia registrado para la proteína objetivo no puede atribuirse únicamente a variaciones experimentales o fenómenos inespecíficos de adsorción superficial, sino predominantemente al reconocimiento inmunológico específico antígeno–anticuerpo.

Los valores de ΔR_{ct} obtenidos para las proteínas heterólogas evaluadas se mantuvieron por

debajo del límite de cuantificación (LOQ) del biosensor, como se observa en la Tabla 7.7 y la Figura 7.5. Adicionalmente, las respuestas registradas para COVID-19 y EBV fueron inferiores a la señal equivalente al límite de detección (LOD), mientras que la respuesta obtenida para VPH fue ligeramente superior a dicho umbral. No obstante, esta respuesta permaneció muy por debajo del LOQ y fue significativamente inferior a la observada para la proteína NS1 del dengue a la misma concentración. Bajo las condiciones experimentales estudiadas, estos resultados sugieren una baja reactividad cruzada frente a las proteínas interferentes seleccionadas y evidencian una adecuada capacidad de discriminación del sistema inmunológico implementado dentro del conjunto limitado de interferentes evaluados.

Sin embargo, la selectividad del biosensor en el nivel actual de desarrollo no puede considerarse completamente validada desde una perspectiva diagnóstica, ya que los ensayos de reactividad cruzada fueron realizados únicamente frente a proteínas recombinantes asociadas a SARS-CoV-2 (Spike), virus de Epstein–Barr (gp350) y virus del papiloma humano (L1), debido a la disponibilidad limitada de otros antígenos recombinantes clínicamente más relevantes para el contexto del dengue. Esta limitación resulta particularmente importante considerando que la proteína NS1 presenta homología antigénica entre diferentes flavivirus, fenómeno ampliamente reportado como una de las principales fuentes de reactividad cruzada y de resultados falsos positivos en plataformas inmunodiagnósticas para dengue [106]. En consecuencia, con el nivel experimental alcanzado en el presente estudio no es posible afirmar selectividad específica frente a flavivirus estrechamente relacionados, como virus Zika, Chikungunya, fiebre amarilla o virus del Nilo Occidental, por lo que los resultados obtenidos deben interpretarse como una validación preliminar de selectividad dentro del conjunto restringido de interferentes evaluados.

7.0.10. Prueba de concepto en saliva artificial

La Tabla 7.8 presenta los resultados obtenidos durante la prueba de concepto realizada utilizando saliva artificial adicionada con proteína NS1 del virus del dengue serotipo 2 a una concentración nominal de 30 ng/mL.

Cuadro 7.8: Resultados obtenidos durante la prueba de concepto en saliva artificial.

Sensor	ΔR_{ct} (Ω)	Concentración calculada (ng/mL)	Recovery (%)
1	6.013	27.102	90.339
2	5.812	25.624	85.413
3	5.922	26.430	88.101
4	6.851	33.262	110.872
5	6.172	28.269	94.229
6	6.812	32.972	109.906
9	6.153	28.129	93.762
10	5.871	26.052	86.840
11	7.175	35.641	118.804
12	6.342	29.516	98.388

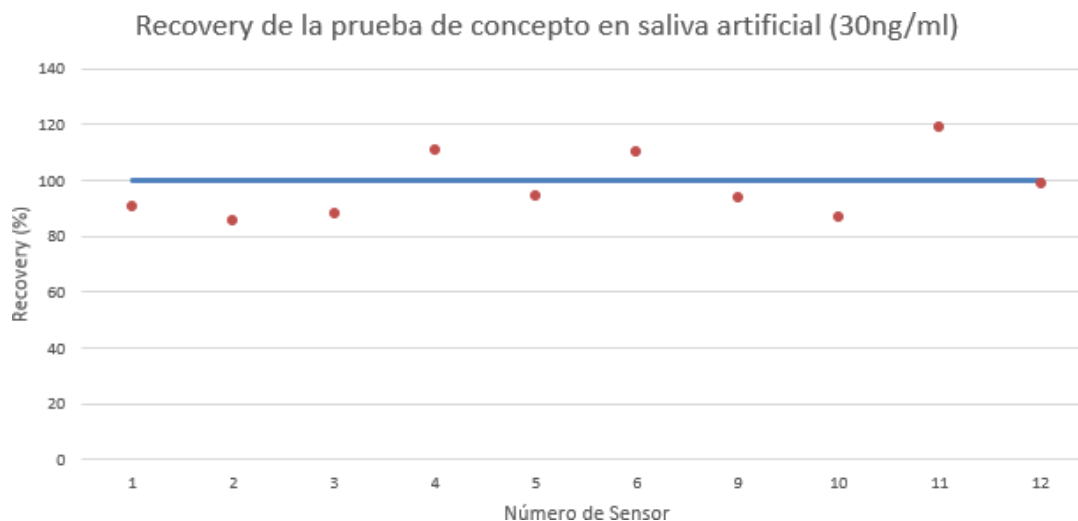


Figura 7.6: Prueba de concepto

Los resultados obtenidos muestran que la mayoría de los sensores presentaron porcentajes de recuperación cercanos al valor ideal del 100 %, lo que sugiere que el biosensor fue capaz de detectar la proteína NS1 en presencia de una matriz simulada de saliva manteniendo una respuesta analítica consistente con la curva de calibración previamente obtenida.

De acuerdo a la figura 7.6 los 12 sensores evaluados en la prueba de concepto en saliva artificial fortificada, 10 presentaron valores de recuperación dentro del rango aceptable (80–120 %), correspondiente a una tasa de concordancia experimental del 83.3 %. Los dos sensores restantes mostraron comportamientos anormales, atribuibles potencialmente a variaciones inherentes al proceso de fabricación y funcionalización del electrodo.

A pesar de estas variaciones, los resultados generales evidencian la viabilidad preliminar del biosensor para la detección de proteína NS1 en matrices complejas simuladas, constituyendo una prueba de concepto favorable para futuras validaciones utilizando muestras biológicas reales.

Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló una prueba de concepto electroquímica basada en grafeno inducido por láser (LIG) para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue serotipo 2 mediante espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). La revisión bibliográfica y epidemiológica realizada permitió justificar la selección de la proteína NS1 como biomarcador para el diagnóstico temprano del dengue debido a su presencia durante las fases iniciales de la infección y a su utilidad ampliamente reportada en métodos diagnósticos. Asimismo, la selección del serotipo DENV-2 se sustentó en su relevancia epidemiológica y circulación reportada en Colombia.

El diseño y fabricación del biosensor permitió obtener una plataforma electroquímica funcional basada en una configuración de tres electrodos sobre sustrato de poliimida utilizando grafeno inducido por láser. La caracterización Raman confirmó la formación de una estructura grafitica multicapa con defectos moderados, evidenciada por las bandas D, G y 2D características del LIG y por una relación $I_D/I_G = 0,61 \pm 0,16$, indicando una adecuada densidad de sitios electroquímicamente activos. Adicionalmente, el análisis electroquímico permitió determinar un área electroactiva aparente de $0,916 \text{ cm}^2$, superior al área geométrica del electrodo, lo cual se atribuyó a la elevada rugosidad y porosidad superficial del material. La evaluación comparativa de las estrategias de modificación superficial mostró que el tratamiento sin ligando, voltametría cíclica en NaOH presentó una respuesta electroquímica más estable y reproducible que el tratamiento con ligando, usando PBA, permitiendo seleccionar esta metodología para la construcción final del inmunosensor.

La evaluación analítica del biosensor evidenció una respuesta electroquímica dependiente de la concentración de proteína NS1 en el rango de 1 a 200 ng/mL, observándose un incremento progresivo del cambio en la resistencia de transferencia de carga (ΔR_{ct}) a medida que aumentaba la concentración del analito. El sistema presentó una adecuada linealidad, reproducibilidad intersensor y baja reactividad cruzada frente a las proteínas heterólogas evaluadas correspondientes a COVID-19, virus de Epstein-Barr y virus del papiloma humano, obteniéndose un límite de detección (LOD) de 5.511 ng/mL y un límite de cuantificación (LOQ) de 18.370 ng/mL. No obstante, al comparar estos parámetros con las concentraciones de NS1 reportadas en saliva durante infecciones por dengue, se observa que el LOD alcanzado se encuentra por encima de valores promedio descritos clínicamente, lo que sugiere que muestras con bajas concentraciones fisiológicas del biomarcador podrían no generar una respuesta detectable bajo las condiciones analíticas actuales. Asimismo, aunque el biosensor fue capaz de detectar señales cercanas al límite de detección, las mediciones cuantitativas más confiables se obtuvieron por encima del LOQ, donde la relación señal/ruido presentó mayor estabilidad y reproducibilidad. De igual manera, aunque las pruebas de reactividad cruzada realizadas evidenciaron una adecuada discriminación frente a las proteínas interferentes disponibles experimentalmente, el alcance de selectividad del sistema aún es limitado, ya que no se

evaluó frente a otros flavivirus antigénicamente relacionados, como Zika o fiebre amarilla, los cuales representan una de las principales fuentes potenciales de reactividad cruzada en inmunodiagnóstico de dengue. En este contexto, los resultados obtenidos demuestran la factibilidad del sistema como una prueba de concepto electroquímica para detección de NS1 en condiciones controladas utilizando PBS y saliva artificial fortificada, aunque el desempeño alcanzado aún debe interpretarse dentro de un contexto preclínico, siendo necesaria una futura validación con muestras clínicas reales para establecer sensibilidad, especificidad y capacidad diagnóstica bajo condiciones fisiológicas complejas.

Finalmente, la prueba de concepto realizada utilizando saliva artificial fortificada con proteína NS1 permitió demostrar que el biosensor conserva capacidad de detección electroquímica en una matriz simulada más compleja que PBS, obteniéndose porcentajes de recuperación dentro del rango aceptable de 80–120 % en la mayoría de los sensores evaluados, incluyendo 10 de los 12 sensores analizados. Estos resultados evidencian una capacidad preliminar de cuantificación bajo condiciones controladas, aunque también reflejan la presencia de variabilidad intersensor asociada al proceso de fabricación y funcionalización de la plataforma electroquímica. No obstante, los resultados obtenidos corresponden únicamente a una validación analítica preliminar realizada utilizando PBS, saliva artificial y proteína recombinante NS1. Por esta razón, el presente trabajo no permite establecer conclusiones sobre desempeño clínico, sensibilidad diagnóstica o aplicabilidad en muestras reales de pacientes. En consecuencia, serán necesarios estudios posteriores orientados a evaluar el comportamiento del biosensor en saliva humana real, incluyendo cohortes de pacientes positivos y negativos para dengue, así como la evaluación de interferentes fisiológicos, variabilidad interindividual y comparaciones frente a metodologías diagnósticas de referencia como ELISA y RT-PCR.

Trsbsjos futuros y recomendsciones

El presente trabajo permitió desarrollar y evaluar un biosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue en saliva artificial fortificada. No obstante, debido al alcance experimental planteado, este desarrollo corresponde a la implementación de una arquitectura de biosensor previamente reportada en la literatura, por lo que su aporte se enmarca principalmente como una adaptación y validación en condiciones controladas de laboratorio. En este sentido, aún existen diferentes aspectos susceptibles de mejora y ampliación en futuras investigaciones, especialmente en relación con la validación clínica y la optimización de la reproducibilidad del sistema.

Como principal trabajo futuro, se requiere avanzar hacia la validación del biosensor en muestras biológicas reales de saliva provenientes de pacientes con diagnóstico confirmado y negativo de dengue. Esto permitirá evaluar su desempeño en condiciones clínicas reales, considerando la complejidad de la matriz biológica y la presencia de posibles interferentes, así como establecer métricas de desempeño como sensibilidad, especificidad y reproducibilidad bajo condiciones fisiológicas.

Adicionalmente, futuras investigaciones deben enfocarse en la optimización de los procesos de funcionalización superficial, inmovilización de anticuerpos y condiciones electroquímicas de medición, así como en la estandarización del proceso de fabricación de los electrodos de grafeno inducido por láser y del electrodo de referencia. Finalmente, la maduración tecnológica del sistema (TRL) requiere su transición desde una validación en laboratorio hacia pruebas en entorno relevante y clínico, lo cual implica la integración con electrónica portátil, automatización de la lectura electroquímica y el desarrollo progresivo de una plataforma orientada a su escalamiento hacia un sistema point-of-care.

El presente trabajo permitió desarrollar y evaluar un biosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser para la detección de la proteína NS1 del virus del dengue en condiciones controladas utilizando PBS y saliva artificial fortificada. No obstante, debido al alcance experimental planteado, este desarrollo corresponde a una validación analítica preliminar de una arquitectura electroquímica previamente reportada y adaptada al contexto de detección de NS1 en DENV-2, por lo que aún existen diferentes aspectos susceptibles de ampliación y optimización en futuras investigaciones.

Como primera etapa de continuidad, se recomienda profundizar en la optimización analítica del sistema electroquímico, especialmente en los procesos de funcionalización superficial, inmovilización de anticuerpos y condiciones de medición por EIS, con el propósito de mejorar la sensibilidad del biosensor y disminuir el límite de detección hacia concentraciones más cercanas a los rangos fisiológicos reportados para NS1 en saliva. Asimismo, sería relevante continuar la optimización y estandarización del proceso de fabricación de los electrodos de grafeno inducido por láser y del

electrodo de referencia, con el fin de reducir la variabilidad intersensor observada experimentalmente y mejorar la reproducibilidad global del sistema.

Adicionalmente, futuras investigaciones deberían incluir estudios de selectividad frente a flavivirus antigénicamente relacionados, tales como virus Zika, fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental y Chikungunya, debido a la posibilidad de reactividad cruzada asociada a la proteína NS1. La incorporación de estos interferentes permitiría establecer con mayor rigurosidad el alcance inmunológico y diagnóstico del biosensor antes de avanzar hacia validaciones clínicas en muestras biológicas reales.

De igual manera, sería importante incorporar técnicas complementarias de caracterización superficial, como SEM, AFM, XPS o FTIR, que permitan correlacionar las propiedades morfológicas y químicas del LIG con el comportamiento electroquímico observado durante la funcionalización y detección.

Una vez optimizados los parámetros analíticos y evaluada la selectividad frente a flavivirus relacionados, podría avanzarse hacia estudios utilizando saliva humana real proveniente de pacientes positivos y negativos para dengue. Esto permitiría evaluar el desempeño del biosensor bajo condiciones fisiológicas complejas, considerando factores como proteínas salivales, enzimas, metabolitos, viscosidad, biofouling y variabilidad interindividual, así como determinar parámetros clínicos de desempeño como sensibilidad diagnóstica, especificidad y reproducibilidad.

Finalmente, tras etapas más robustas de validación analítica y clínica, podrían explorarse estrategias de integración electrónica y automatización de lectura orientadas al desarrollo progresivo de plataformas electroquímicas portátiles para aplicaciones diagnósticas tipo point-of-care.

Estimación de costos del desarrollo

Cuadro 10.1: Materiales y reactivos utilizados en el desarrollo del biosensor

Material	Cantidad / Volumen	Precio (USD)
Cinta De Poliimida	1000 unidades (MOQ)	1.50 c/u
EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide)	10 mg	234.38
NHS (N-hydroxysuccinimide)	5 g	29.18
1-Pyrenebutyric acid	1 g	18.50
Tinta nanopartículas de plata JS-A211	50 ml	350 – 3,750
Pasta Ag/AgCl (60/40)	50 g	397.28
Anticuerpo NS1 Dengue (40263-MM02)	100 μ L	356
Proteína NS1 recombinante (40263-V07H)	100 μ g	348
Bovine Serum Albumin (BSA)	10 g	179.30
NaOH	1 L	52.97
K ₃ [Fe(CN) ₆]	50 g	63.17
K ₄ [Fe(CN) ₆ · 3H ₂ O]	100 g	75.00
KCl	500 g	24.45
NaCl	1 kg	4,360
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	500 g	7,167
Na ₂ HPO ₄	1 kg	17,555
NaHCO ₃	500 g	4,368
MgCl ₂ · 6H ₂ O	500 g	8,073
CaCl ₂	2 mL	102
H ₂ SO ₄	1 L	44.35
Urea	500 g	36.38

Nota: Los materiales mostrados corresponden a insumos comerciales ampliamente utilizados en biosensores electroquímicos. Las referencias bibliográficas asociadas se presentan en la sección de referencias [107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125].

Cuadro 10.2: Equipos utilizados en el desarrollo del biosensor

Equipo	Precio (USD)
Ultracongelador Haier 578 L [126]	11,996 – 16,720
Refrigerador/Congelador Meling YCD-EL450 [127]	4,900
Estufa universal Memmert UN110 (108 L) [70]	3,508
RADWAG AS 220.R2 PLUS [77]	1,301
Agitador Vortex MX-S [79]	289
Minicentrífuga DLAB D1008 [78]	181
Microscopio Motic SMZ-171 [72]	1,759
Potenciostato PalmSens4 [74]	3,340
Medidor pH/ORP Hanna Edge [80]	792
VLS Desktop Model 2.30DT [71]	14,624
DXR3 Raman Microscope [73]	49,999

Bibliografía

- [1] Instituto Nacional de Salud (INS). (2025) Acceso a los boletines Epidemiológicos, reporte semanal. Accedido: 17 de mayo de 2025. [Online]. Available: <https://www.ins.gov.co/busca-dor-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemiologico.aspx>
- [2] World Health Organization. (n.d.) Enhancing dengue diagnosis and case management. WHO. Online. [Online]. Available: <https://www.who.int/activities/enhancing-dengue-diagnosis-and-case-management>
- [3] CDCespanol. (2025) Guía de pruebas clínicas para el dengue. Accedido: 17 de mayo de 2025. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/dengue/es/hcp/diagnosis-testing/pruebas-clinicas.html>
- [4] D. Wasik, A. Mulchandani, and M. V. Yates, “Salivary detection of dengue virus ns1 protein with a label-free immunosensor for early dengue diagnosis,” *Sensors*, vol. 18, no. 8, p. 2641, 2018.
- [5] E. M. Korhonen, E. Huhtamo, T. Smura, H. Kallio-Kokko, J. Paavonen, A. Vaheri, T. Sironen, and H. Piiparinen, “Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and ns1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue,” *Journal of Clinical Virology*, vol. 61, pp. 353–358, 2014.
- [6] ScienceDirect, “Grafeno inducido por láser: una visión general,” <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/laser-induced-graphene>, consultado: 1 de mayo de 2026.
- [7] I. J. Oh, D. Kim, S.-Y. Kim, S. Choi, W.-H. Yeo, and H.-R. Lim, “Advances in laser-induced graphene: materials, fabrication, and emerging applications in flexible electronics,” *Frontiers in Nanotechnology*, vol. 7, Jan. 2026.
- [8] Y. Li *et al.*, “Label-free electrochemical immunosensors: A practical guide,” *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 180, p. 117949, 2024.
- [9] Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2025) Dengue: Síntomas, Prevención y Tratamientos - OPS/OMS. Accedido: 17 de mayo de 2025. [Online]. Available: <https://www.paho.org/es/temas/dengue>
- [10] D. Martínez *et al.*, “Cryptic transmission and novel introduction of dengue 1 and 2 genotypes in colombia,” *Virus Evolution*, vol. 10, no. 1, p. veae068, Oct. 2024.
- [11] C. Rodríguez Pérez, S. D. Carreño Ruiz, M. Martinez, and R. F. Ortíz Ojeda, “PCR como técnica molecular más utilizada en el diagnóstico del virus del dengue. Revisión sistemática: PCR as the most widely used molecular technique in the diagnosis of dengue virus. Systematic review,” *Latam Rev. Latinoam. Cienc. Soc. Humanidades*, vol. 4, no. 1, p. 249, 2023.

- [12] S. R. Whitehorn and C. P. Simmons, “The pathogenesis of dengue,” *Vaccine*, vol. 29, no. 42, pp. 7221–7228, 2011.
- [13] J. Akey *et al.*, “Flavivirus ns1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system,” *Science*, vol. 343, no. 6174, pp. 881–885, 2014.
- [14] J. L. García-Bello *et al.*, “Grafeno: producción, caracterización y aplicaciones,” *Tecnología Química*, vol. 43, no. 1, pp. 59–80, Apr. 2023.
- [15] D. R. Sevene *et al.*, “Laser-induced graphene for electrochemical sensing of antioxidants in biodiesel,” *ACS Omega*, vol. 10, no. 1, pp. 368–377, Nov. 2024.
- [16] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. Wiley, 2001.
- [17] P. T. Kissinger and W. R. Heineman, “Cyclic voltammetry,” *Journal/Book Chapter Reference*, n.d.
- [18] A. K. Yetisen *et al.*, “Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices,” *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 12, pp. 2210–2251, 2013.
- [19] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan, and A. Mulchandani, “Electrochemical impedance spectroscopy (eis): Principles, construction, and biosensing applications,” *Sensors*, vol. 21, no. 19, p. 6578, Oct. 2021.
- [20] A. Lazanas and B. Prieto Simón, “A guide to recognizing your electrochemical impedance spectra: Revisions of the randles circuit in (bio)sensing,” *Sensors*, vol. 25, no. 19, p. 6260, 2025.
- [21] O. L. Agudelo, V. Reyes-Loaiza, L. Giraldo-Parra, M. Rosales-Chilama, S. Perdomo, M. A. Gómez, J. W. Rodriguez, V. Ortega, C. F. D. Rivera, D. Galindo, D. P. Valencia, M. Quimbaya, S. Plata, R. Bogdanowicz, F. Rosso, and A. Jaramillo-Botero, “Performance assessment of disposable carbon-based immunosensors for the detection of sars-cov-2 infections,” *Scientific Reports*, vol. 15, p. 7741, 2025.
- [22] T. Draz and N. Shafiee, “Applications of gold nanoparticles in virus detection,” *Theranostics*, vol. 8, no. 7, pp. 1985–2017, 2018.
- [23] M. Medina-Sánchez *et al.*, “Point-of-care colorimetric biosensors for infectious diseases: Recent advances and future perspectives,” *ACS Nano*, vol. 15, no. 10, pp. 16 220–16 247, 2021.
- [24] W. Shen *et al.*, “Microfluidic paper-based analytical devices for colorimetric detection of biomarkers: A review,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 144, p. 111697, 2019.
- [25] J. Lin *et al.*, “Laser-induced porous graphene films from commercial polymers,” *Nature Communications*, vol. 5, no. 1, p. 5714, Dec. 2014.

- [26] A. Rana and A.-N. Kawde, “Open-circuit electrochemical polymerization for the sensitive detection of phenols,” *Electroanalysis*, vol. 28, no. 4, pp. 898–902, 2016.
- [27] S. Keleştemur, M. Altunbek, and M. Çulha, “Influence of edc/nhs coupling chemistry on stability and cytotoxicity of zno nanoparticles modified with proteins,” *Applied Surface Science*, vol. 403, pp. 455–463, May 2017.
- [28] C. J.-M. Brustoloni, P. S. Khamsi, V. Kammarchedu, and A. Ebrahimi, “Systematic study of various functionalization steps for ultrasensitive detection of sars-cov-2 with direct laser-functionalized au-lig electrochemical sensors,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 16, no. 37, pp. 49 041–49 052, Sep. 2024.
- [29] A. Suea-Ngam, T. Ngamyoo, O. Chailapakul, N. Rodthongkum, P. Tangkijvanich, and P. Puthongkham, “Functionalized laser-induced graphene enabled ultrasensitive electroimmunoassay for rapid hepatitis b virus detection,” *Bioelectrochemistry*, vol. 169, p. 109179, Jun. 2026.
- [30] G. Y. Jung *et al.*, “Edc/nhs chemistry for surface modification of microfluidic chips,” *Langmuir*, vol. 26, no. 5, pp. 3310–3315, 2010.
- [31] Y. L. Jeyachandran, J. A. Mielczarski, E. Mielczarski, and B. Rai, “Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by bsa adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 341, no. 1, pp. 136–142, Jan. 2010.
- [32] National Human Genome Research Institute, “Anticuerpo | nhgri,” <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Anticuerpo>, accedido: 9 de mayo de 2026.
- [33] Elsevier ScienceDirect, “Anticuerpos recombinantes: una visión general | sciencedirect topics,” <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/recombinant-antibody>, accedido: 9 de mayo de 2026.
- [34] M. Li *et al.*, “Aptamer-based colorimetric biosensor for rapid detection of dengue virus ns1 protein using gold nanoparticles,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 83, pp. 83–88, 2016.
- [35] I. M. Banerjee and R. Bhunia, “Analytical performance evaluation of biosensors: concepts and approaches,” *Biosensors*, vol. 11, no. 8, p. 282, 2021.
- [36] Endress+Hauser, “Medidor de redox – sonda de potencial redox,” <https://www.co.endress.com/es/instrumentacion-campo/analisis-agua-liquidos-industria/medidor-redox-sonda-potencial-redox#:~:text=Las%20sondas%20de%20redox%20contienen,utilizando%20la%20ecuaci%C3%B3n%20de%20Nernst>, consultado: 28 de mayo de 2025.
- [37] JUMO España, “Redox – medición y sensores,” <https://www.jumo.es/web/about-us/blog-pl/redox>, consultado: 28 de mayo de 2025.

- [38] ICONTEC, “Nanotecnología. evaluación del riesgo de los nanomateriales,” <https://tienda.icontec.org/gp-nanotecnologia-evaluacion-del-riesgo-de-los-nanomateriales-ntc-iso-tr13121-2018.html>, accedido: 10 de mayo de 2025.
- [39] ICONTEC, “Evaluación biológica de los dispositivos médicos. parte 1: Evaluación y ensayo dentro de un proceso de gestión de riesgos,” <https://tienda.icontec.org/gp-evaluacion-biologica-de-los-dispositivos-medicos-parte-1-evaluacion-y-ensayo-dentro-de-un-proceso-de-gestion-de-riesgos-ntc-iso10993-1-2020.html>, accedido: 10 de mayo de 2025.
- [40] P. F. G. Rojo and H. V. M. Tejada, “Gtc iso 13014,” 2019, guía técnica colombiana.
- [41] J. Pytko-Polonczyk, A. Jakubik, A. Przeklasa-Bierowiec, and B. Muszynska, “Artificial saliva and its use in biological experiments,” *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 68, no. 6, pp. 807–813, 2017.
- [42] A. Sarkar, F. Xu, and S. Lee, “Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases – similarities and differences,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 273, p. 102034, 2019.
- [43] R. E. Bayoumy, N. A. El-Ragehy, N. Y. Hassan, and A. M. Mahmoud, “Development of a biosensor for spectrophotometric determination of l-lactate in artificial saliva,” *BMC Chemistry*, vol. 20, no. 1, p. 39, 2026.
- [44] A. Bardow, D. Moe, B. Nyvad, and B. Nauntofte, “The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂,” *Archives of Oral Biology*, vol. 45, no. 1, pp. 1–12, 2000.
- [45] V. Gupta, M. Sengupta, J. Prakash, and B. C. Tripathy, “Production of recombinant pharmaceutical proteins,” *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, pp. 77–101, 2016.
- [46] L. Guo *et al.*, “Electrochemical protein biosensors for disease marker detection: progress and opportunities,” *Microsystems & Nanoengineering*, vol. 10, no. 1, p. 65, 2024.
- [47] H.-R. Chen, Y.-C. Lai, and T.-M. Yeh, “Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate,” *Journal of Biomedical Science*, vol. 25, no. 1, p. 58, 2018.
- [48] L. Persson Berg, E. Thomsson, G. Hasi, M. Bäckström, and T. Bergström, “Recombinant epstein-barr virus glycoprotein 350 as a serological antigen,” *Journal of Virological Methods*, vol. 284, p. 113927, 2020.
- [49] “The papillomavirus major capsid protein 11,” *Virology*, vol. 445, no. 1–2, pp. 169–174, 2013.
- [50] B. A. Rebelo, A. Folgado, A. C. Ferreira, and R. Abranches, “Production of the sars-cov-2 spike protein and its receptor binding domain in plant cell suspension cultures,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 13, p. 995429, 2022.

- [51] L. B. Borroto, “Detección de flavivirus mediante el desarrollo de un inmunosensor electroquímico,” sin datos de publicación.
- [52] R. Dutta and et al., “Polyaniline based electrochemical sensor for the detection of dengue virus infection,” *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 77–84, 2020.
- [53] J. M. Lim, J. H. Kim, M. Y. Ryu, C. H. Cho, T. J. Park, and J. P. Park, “An electrochemical peptide sensor for detection of dengue fever biomarker ns1,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1026, pp. 109–116, oct 2018.
- [54] S. S. Hegde and et al., “A novel and ultrasensitive high-surface porous carbon-based electrochemical biosensor for early detection of dengue virus,” *Biosens. Bioelectron. X*, vol. 20, p. 100525, oct 2024.
- [55] I. Sampaio, F. D. Quatroni, J. N. Y. Costa, and V. Zucolotto, “Electrochemical detection of zika and dengue infections using a single chip,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 216, p. 114630, nov 2022.
- [56] “Mip-based impedimetric sensor for detecting dengue fever biomarker | applied biochemistry and biotechnology,” <https://link.springer.com/article/10.1007/S12010-020-03285-Y>, accedido: 9 de mayo de 2025.
- [57] C. Singhal and et al., “Electrochemical multiplexed paper nanosensor for specific dengue serotype detection predicting pervasiveness of dhf/dss,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 6, no. 10, pp. 5886–5894, oct 2020.
- [58] I. C. Prado, J. P. R. da S. Carvalho, A. S. Araujo, P. Napoleão-Pêgo, and S. G. De-Simone, “Ultrasensitive peptide-based electrochemical biosensor for universal diagnostic of dengue,” *Biosensors*, vol. 15, no. 4, 2025.
- [59] K. Navakul, C. Warakulwit, P. Yenchitsomanus, A. Panya, P. A. Lieberzeit, and C. Sangma, “A novel method for dengue virus detection and antibody screening using a graphene-polymer based electrochemical biosensor,” *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 13, no. 2, pp. 549–557, feb 2017.
- [60] M. R. Hasan and et al., “Different electrode system based electrochemical aptasensor for the detection of dengue virus antigen in human serum: A comparative study,” *Sens. Int.*, vol. 5, p. 100285, ene 2024.
- [61] M. S. Cheng, J. S. Ho, C. H. Tan, J. P. S. Wong, L. C. Ng, and C.-S. Toh, “Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 725, pp. 74–80, may 2012.
- [62] A. Sangili, T. Kalyani, S.-M. Chen, K. Rajendran, and S. K. Jana, “Label-free electrochemical immunosensor based on l-cysteine-functionalized aump on reduced graphene oxide for the

- detection of dengue virus e-protein in dengue blood serum,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 238, p. 109876, jun 2022.
- [63] M. R. Hasan, P. Sharma, S. Shaikh, S. Singh, R. Pilloton, and J. Narang, “Electrochemical aptasensor developed using two-electrode setup and three-electrode setup: Comprising their current range in context of dengue virus determination,” *Biosensors*, vol. 13, no. 1, 2023.
- [64] M. S. Silva and et al., “Rational selection of hidden epitopes for a molecularly imprinted electrochemical sensor in the recognition of heat-denatured dengue ns1 protein,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 191, p. 113419, nov 2021.
- [65] D. Nidzworski, K. Siuzdak, P. Niedziałkowski *et al.*, “A rapid-response ultrasensitive biosensor for influenza virus detection using antibody modified boron-doped diamond,” *Scientific Reports*, vol. 7, p. 15707, 2017.
- [66] S. A. Perdomo *et al.*, “Sensars: A low-cost portable electrochemical system for ultra-sensitive, near real-time, diagnostics of sars-cov-2 infections,” *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, vol. 70, pp. 1–10, 2021.
- [67] D. M. Mills and et al., “Rapid detection of different dna analytes using a single electrochemical sensor,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 293, pp. 11–15, ago 2019.
- [68] J. de la Roche, I. López-Cifuentes, and A. Jaramillo-Botero, “Influence of lasing parameters on the morphology and electrical resistance of polyimide-based laser-induced graphene (lig),” *Carbon Letters*, vol. 33, pp. 587–595, 2023.
- [69] Fisher Scientific., “Elmasonic easy 60 h ultrasonic cleaner,” <https://www.fishersci.es/shop/products/elmasonic-easy-60-h-7/17804525/>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [70] TEquipment, “Memmert un110-230v - universal oven, 108l,” <https://www.tequipment.net/Memmert/UN110-230V/Laboratory-Ovens/>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [71] E. S. LLC, “Vls desktop model 2.30dt,” <https://www.engravingsystemsllc.com/products/vls-desktop-model-2-30dt>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [72] BIOWEB Colombia, “Microscopio estereoscópico trinocular motic smz-171,” <https://colombia.bioweb.co/products/microscopios-estereos-trinoculares-motic-serie-smz-171>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [73] LabX, “Dxr3 raman microscope,” <https://www.labx.com/item/thermo-scientific-dxr3-raman-microscope-system-532/ESS-234889-358552681212?queryID=b21e3a96f5d8740fdd123fbf40dd79aa>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [74] PalmSens, “Palmsens4 compact potentiostat,” <https://www.jpnpartsale.com/shop/palmsens4-compact-galvanostat-10v-1mhzeis/>, accedido: 14 de mayo de 2026.

- [75] PalmSens BV, *PSTrace 5.9 Electrochemical Software*, PalmSens BV, Houten, The Netherlands, 2024, software used for electrochemical control, acquisition, and data visualization.
- [76] Thermo Fisher Scientific, “Finnpipette f2 pipettes,” <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4662000N>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [77] Galileo Equipment, “Radwag as 220.r2.plus analytical balance,” <https://www.galileoequipos.com/en/analytical-balances/641-radwag-as-220r2plus.html>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [78] CTR Scientific, “Minicentrífuga modelo d1008 dlab,” <https://ctrscientific.com/products/mini-centrifuga-modelo-d1008-dlab>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [79] Grupo Milligram, “Agitador vortex modelo mx-s,” <https://grupomilligram.com.co/product/agitador-vortex-modelo-mx-s/>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [80] B. Colombia, “Medidor hanna edge ph/orp,” <https://colombia.bioweb.co/products/medidor-de-ph>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [81] NovaCentrix, “Metalon silver ink js-a211,” <https://store.novacentrix.com/products/metalon-js-a211>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [82] Sigma-Aldrich, “Silver/silver chloride conductive ink (60/40),” <https://www.sigmaaldrich.com>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [83] S. Biological, “Dengue virus (denv) type 2 ns1 protein (his tag), catalog no. 40263-v07h,” <https://www.sinobiological.com>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [84] Sino Biological, “Dengue virus (denv) type 2 ns1 antibody, mouse mab,” <https://www.sinobiological.com>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [85] S. Biological, “Recombinant sars-cov-2 (2019) nucleocapsid protein, catalog no. 40588-v08b,” <https://www.sinobiological.com>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [86] Sino Biological, “Recombinant rbv gp350 protein, catalog no. 40373-v08h,” <https://www.sinobiological.com>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [87] Abcam, “Hpv18-11 recombinant protein, catalog no. ab119881,” <https://www.abcam.com/en-us/products/proteins-peptides/recombinant-hpv18-11-protein-ab119881>, 2026, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [88] Y. Fu, Z. Li, Z. Liu, J. Yang, S. Zhao, S. Kang, G. Yang, G. Liu, and L. Zhang, “Gradient-structured pi/pdms composites for photoactuation inspired by scallion leaf and bamboo node,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 534, p. 174939, 2026.
- [89] C. Kincal and N. Solak, “Controlling thermoelectric properties of laser-induced graphene on polyimide,” *Nanomaterials*, vol. 14, no. 10, p. 879, 2024.

- [90] O. L. Agudelo *et al.*, “Performance assessment of disposable carbon-based immunosensors for the detection of sars-cov-2 infections,” *Scientific Reports*, vol. 15, no. 1, p. 7741, Mar. 2025.
- [91] Chemistry LibreTexts, “Linear sweep voltammetry,” 2026, accedido: 10 de mayo de 2026. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Analytical_Electrochemistry:_The_Basic_Concepts/04_Voltammetric_Methods/A._Basics_of_Voltammetry/02_Potential_Sweep_Methods/a\)_Linear_Sweep_Voltammetry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Courseware/Analytical_Electrochemistry:_The_Basic_Concepts/04_Voltammetric_Methods/A._Basics_of_Voltammetry/02_Potential_Sweep_Methods/a)_Linear_Sweep_Voltammetry)
- [92] S. Baachaoui *et al.*, “Laser-induced porous graphene electrodes from polyketimine membranes for paracetamol sensing,” *Royal Society Open Science*, vol. 10, no. 8, p. 230294, 2023.
- [93] L. K. La Rotta Martínez, “Caracterización electroquímica de un complejo de cobalto con ligandos benzoato como candidato para electrolito en baterías de flujo redox,” <https://hdl.handle.net/1992/76781>, Jul. 2025, accedido: 10 de mayo de 2026.
- [94] E. Barsoukov and J. R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, 2nd ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2005.
- [95] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 9th ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2022.
- [96] International Council for Harmonisation, “Ich harmonised guideline q2(r2): Validation of analytical procedures,” <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, 2023, consultado: 10 de mayo de 2026.
- [97] D. M. Chipara, A. C. Chipara, and M. Chipara, “Raman spectroscopy of carbonaceous materials: A concise review,” <https://www.spectroscopyonline.com/view/raman-spectroscopy-carbonaceous-materials-concise-review>, accedido: 10 de mayo de 2026.
- [98] M. J. Madito, “Revisiting the raman disorder band in graphene-based materials: A critical review,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 139, p. 103814, 2025.
- [99] ScienceDirect, “Scanning electron microscopy: An overview,” 2026, accessed: 14 May 2026. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/scanning-electron-microscopy>
- [100] ScienceDirect, “Atomic force microscopy - an overview,” 2026, accessed: 14 May 2026. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/atomic-force-microscopy>
- [101] Universidad de Málaga, “Espectroscopía fotoelectrónica de rayos x,” 2026, accessed: 14 May 2026. [Online]. Available: <https://www.scai.uma.es/areas/aqcm/xps/xps.html>
- [102] *Membrane Characterization*. Elsevier, 2017.

- [103] Z. H. Ni, H. M. Wang, Y. Ma, J. Kasim, Y. H. Wu, and Z. X. Shen, “Tunable stress and controlled thickness modification in graphene by annealing,” *ACS Nano*, vol. 2, no. 5, pp. 1033–1039, 2008.
- [104] S. C. Lai and et al., “Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of dengue virus ns1 and differentiation of dengue virus serotypes during early infection,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 57, no. 8, 2019.
- [105] G. A. Santiago and et al., “Analytical and clinical performance of the cdc real time rt-pcr assay for detection and typing of dengue virus,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 7, 2013.
- [106] L. K. Tan, W. Y. Wong, H. T. Yang, R. G. Huber, P. J. Bond, L. C. Ng, S. Maurer-Stroh, and C. H. Hapuarachchi, “Flavivirus cross-reactivity to dengue nonstructural protein 1 antigen detection assays,” *Diagnostics*, vol. 10, no. 2, p. 129, 2020.
- [107] NovaCentrix, “Tinta de nanopartículas de plata js-a211,” <https://novacentrix.com/es/product/js-a211-silver-nanoparticles/>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [108] Sigma-Aldrich, “Silver/silver chloride paste 60/40 (901773-50g),” <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/search/901773-50g>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [109] Sigma-Aldrich, “Sodium hydroxide,” <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/search/sodium-hydroxide>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [110] Sigma-Aldrich, “Edc (n-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide),” <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/aldrich/39391>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [111] Sigma-Aldrich, “N-hydroxysuccinimide (nhs) 98 %,” <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/aldrich/130672>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [112] Chem-Impex, “1-pyrenebutyric acid,” <https://www.chemimpex.com/products/30784>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [113] Sigma-Aldrich, “Potassium hexacyanoferrate(ii) trihydrate,” <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/sigald/p3289>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [114] Sigma-Aldrich, “Potassium ferricyanide(iii),” <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/sigald/702587>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [115] Sigma-Aldrich, “Bovine serum albumin (bsa),” <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/product/sigma/a7030>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [116] K. Lab, “Kcl 99.5 %,” <https://www.keck.com.co/tienda/grado/ar-grado/p-02084-00500>, accedido: 14 de mayo de 2026.

- [117] Keck Lab, “NaCl extra puro 99.5 %,” <https://www.keck.com.co/tienda/linea/extra-puros/1-05819-01000>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [118] K. Lab, “NaH₂PO₄·H₂O ar 99 %,” <https://www.keck.com.co/tienda/linea/ar/1-5858b-00500>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [119] Keck Lab, “Na₂HPO₄ ar 99 %,” <https://www.keck.com.co/tienda/linea/ar/1-05972-01000>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [120] K. Lab, “NaHCO₃ ar 99.7 %,” <https://www.keck.com.co/tienda/linea/ar/1-05895-00500>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [121] Cultek, “Calcium chloride CaCl₂ 300 mm,” <https://www.cultek.com/cloruro-de-calcio-cacl2-300-mm-2-ml.html>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [122] K. Lab, “MgCl₂·6H₂O ar 98 %,” <https://www.keck.com.co/tienda/sin%20categoria/magnesio-cloruro-hexahidrato-ar-98-00>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [123] Blamis, “Ácido sulfúrico 9597 %,” <https://blamis.com.co/acido-sulfurico-95-97-p-a-emsure-i-so-acido-sulfurico>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [124] LetsLab, “Urea gen,” <https://www.letslab.com/catalog/product/view/id/30317>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [125] Jiangyin Meiyuan Industries Corporation, “High temperature resistant polyimide tape,” <https://meiyuan1988.en.made-in-china.com/product/SOAFuhPyLwki/China-Cinta-De-Poliimida-High-Temperature-Resistant-Tape-Heat-Resistant-Polyimide-Tape.html>, accedido: 15 de mayo de 2026.
- [126] El Crisol, “Ultracongelador vertical de 578l. haier,” <https://elcrisol.com.mx/ultracongelador-vertical-de-578l-haier.html>, accedido: 14 de mayo de 2026.
- [127] Goltech Solutions, “Refrigerador y congelador combinados 2°C 8°C/-10°C-26°C meling ycd-el450,” <https://goltech.net/producto/refrigerador-y-congelador-combinados-2%E2%84%83%E2%84%83-10%E2%84%83-26%E2%84%83-meling-ycd-el450/>, accedido: 14 de mayo de 2026.