



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali

**Facultad de Ingeniería
y Ciencias**

Ingeniería Biomédica

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADO

Bionanosensor electroquímico como herramienta
potencial de monitoreo de la actividad de la artritis
reumatoide en saliva

María del Mar Aristizábal Cárdenas
Akemy Teshima Sanjuan

Director

Dr. Andres Jaramillo Botero

15 de mayo de 2026

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de grado.

En primer lugar, agradecemos de manera muy especial al Dr. Andrés Jaramillo Botero, director del Instituto iÓMICAS, por brindarnos la invaluable oportunidad de desarrollar este proyecto en un entorno de investigación de alto nivel. Gracias por abrirnos las puertas del instituto, por creer en nuestras capacidades desde el inicio y por guiarnos con generosidad, paciencia y entusiasmo. Sus enseñanzas, su visión científica y su confianza en nosotras fueron fundamentales no solo para la realización de este trabajo, sino también para nuestro crecimiento como futuras ingenieras biomédicas e investigadoras.

Agradecemos igualmente a todo el equipo de iÓMICAS por su constante apoyo y disposición para compartir sus conocimientos. En especial, queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a Martin, Ana, César, Gloria y Clara, quienes con su acompañamiento, enseñanzas y ayuda desinteresada hicieron más enriquecedor y significativo este proceso. Su apoyo técnico y humano fue esencial para superar los retos experimentales y académicos que surgieron a lo largo del proyecto.

Asimismo, agradecemos a todos los docentes de la Pontificia Universidad Javeriana Cali que, a lo largo de la carrera, contribuyeron con sus enseñanzas y dedicación a nuestra formación como ingenieras biomédicas.

Finalmente, queremos agradecer de todo corazón a nuestras familias, por su amor incondicional, comprensión, paciencia y apoyo constante en cada etapa de este camino. Su confianza en nosotras y su respaldo inquebrantable fueron la mayor motivación para perseverar y culminar este importante logro.

A todos ustedes, muchas gracias por haber sido parte fundamental de este sueño y por contribuir de manera significativa a la realización de este proyecto.

Agradecimientos personales de Akemy Teshima Sanjuan

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi mamá, la persona más importante en mi vida y mi mayor fuente de inspiración. Gracias por estar a mi lado en todo momento, por brindarme tu amor incondicional y por apoyarme en cada uno de mis sueños. Tu vida ha sido para mí un claro ejemplo de resiliencia, disciplina, fortaleza y perseverancia. Admiro profundamente la mujer que eres y todo lo que has logrado. Este logro es también tuyo, porque sin tu esfuerzo, sacrificio y confianza en mí, nada de esto habría sido posible.

A mi prima y a mi pareja, gracias por su amor, su compañía y su apoyo incondicional durante este camino. Gracias por estar presentes en los momentos de alegría y también en aquellos de dificultad, por escucharme, animarme y fortalecer mi confianza cuando más lo necesité. Su presencia en mi vida ha sido fundamental para seguir adelante y creer en mis capacidades.

A mi compañera de trabajo de grado, María del Mar Aristizabal, quiero agradecerle de todo corazón, ya que sin ella nada de esto habría sido posible. Gracias por acompañarme en este proceso en todos los sentidos, por compartir cada reto, cada aprendizaje y cada logro. Gracias por crecer

juntas, por tu paciencia infinita, por tu dedicación y por tu apoyo constante. Más que una compañera de tesis, has sido una amiga y un pilar fundamental durante esta etapa tan importante de nuestras vidas.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de una u otra manera hicieron parte de este proceso y me brindaron su apoyo, motivación y confianza. Este trabajo representa no solo un logro académico, sino también el resultado del amor, el esfuerzo y el acompañamiento de quienes han creído en mí a lo largo de este camino.

Agradecimientos personales de María del Mar Aristizábal

Agradezco profundamente a mi familia por ser mi mayor motivación y el ejemplo más grande en mi vida. Gracias por su amor, apoyo incondicional y acompañamiento constante durante todo mi proceso de formación académica y, especialmente, en la culminación de este trabajo de grado. A mis papás, por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia; a mi hermana, por su compañía y confianza; y a mi tía, por su cariño y apoyo en cada etapa de este camino.

También quiero agradecer especialmente a mi compañera de trabajo de grado y amiga, Akemy, por todos los retos, aprendizajes y experiencias que compartimos a lo largo de este proyecto. Gracias por el trabajo en equipo, por la gran cantidad de conocimiento que adquirimos juntas y, sobre todo, por tu apoyo constante y tu invaluable amistad, que hicieron este proceso mucho más significativo y enriquecedor.

Glosario

Símbolos

<i>L</i>	Litro
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
nm	Nanómetro
<i>M</i>	Molar
mM	Milimolar
<i>g</i>	Gramo
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
ng	Nanogramo
ng/mL	Nanogramo por mililitro

Acrónimos y Abreviaturas

AR	Artritis reumatoide
BSA	Albúmina sérica bovina
CV	Voltametría cíclica
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIS	Espectroscopía de impedancia electroquímica
ECSA	Área superficial electroquímicamente activa
LIG	Grafeno inducido por láser
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
NHS	N-Hidroxisuccinimida
OCP	Potencial de circuito abierto
PBA	Ácido 1-pirenebutírico
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
Rct	Resistencia de transferencia de carga
SEM	Microscopía electrónica de barrido

Términos

Proteína Moléculas grandes y complejas que cumplen muchas funciones importantes en el cuerpo. Son vitales para la mayoría de los trabajos que realizan las células y son necesarias para mantener la estructura, función y regulación de los tejidos y órganos del cuerpo

Antígeno Sustancia o agente que el organismo reconoce como no propio. Puede tratarse de un virus, de una bacteria, de toxinas. Pero, en algunos casos, el cuerpo puede confundirse y considerar como sustancia extraña a una estructura propia.

Anticuerpo Proteínas que forman parte del sistema inmune, son herramientas para la defensa de las células huésped.

Biomarcador Molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad.

Citocina Proteínas de bajo peso molecular que transmiten información entre las células implicadas en las respuestas inmunológicas.

Linfocito Células que circulan en la sangre y son parte del sistema inmunológico. Hay dos tipos principales de linfocitos: células T y células B. Las células B producen anticuerpos y las células T son combatientes directos de los invasores extraños y también productoras de citoquinas.

Enzima Proteína que acelera la velocidad de una reacción química específica en la célula.

Macrófago Tipo de glóbulo blanco que rodea los microorganismos y los destruye, extrae las células muertas y estimula la acción de otras células del sistema inmunitario.

Sinoviocito tipo fibroblasto Componente celular residente más importante de la membrana sinovial articular.

Osteoclasto son células multinucleadas especializadas en la resorción ósea.

Osteoblasto Células responsables de la síntesis y mineralización de la matriz ósea.

Metaloproteinasas de la matriz Miembro de un grupo de enzimas que pueden descomponer las proteínas, como el colágeno, que se encuentran normalmente en los espacios entre las células de los tejidos.

Sensibilidad diagnóstica el porcentaje de personas con la enfermedad que la prueba identifica correctamente.

Especificidad diagnóstica el porcentaje de personas sin la enfermedad que la prueba descarta correctamente.

Sensibilidad analítica representa la cantidad mínima de sustancia en una muestra que puede medirse con precisión mediante un ensayo.

Especificidad analítica la capacidad de un ensayo para medir un organismo o sustancia en particular, en lugar de otros, en una muestra.

Enlace covalente enlace químico que se forma cuando dos átomos no metálicos comparten pares de electrones.

Enlace iónico es un tipo de unión química basada en la atracción electrostática entre iones de carga opuesta.

Analito es el componente (elemento, compuesto o ion) de interés analítico de una muestra. Son especies químicas cuya presencia o concentración se desea conocer.

Resumen

Este proyecto propone el desarrollo de un bionanosensor electroquímico para monitorear de forma no invasiva la actividad de la artritis reumatoide (AR) mediante la detección y cuantificación de un biomarcador selectivo en saliva. La AR, una enfermedad autoinmune que afecta a millones y puede causar discapacidad severa, requiere un seguimiento constante que hoy resulta costoso, invasivo, poco accesible y poco selectivo. Nuestra solución busca eventualmente transformar este panorama con una herramienta casera, rápida, precisa y fácil de usar, que empodere al paciente y optimice el diagnóstico temprano y el control de la enfermedad.

Palabras Clave: Artritis reumatoide (AR), bionanosensor electroquímico, biomarcador, monitoreo no invasivo

Abstract

This project proposes the development of an electrochemical bionanosensor for the non-invasive monitoring of rheumatoid arthritis (RA) activity through the detection and quantification of a selective biomarker in saliva. RA is an autoimmune disease that affects millions of people worldwide and can lead to severe disability if not properly monitored and treated. Current follow-up methods are often costly, invasive, limited in accessibility, and lack sufficient specificity. The proposed solution aims to transform this scenario by providing a rapid, accurate, user-friendly, and home-based tool that empowers patients while supporting early diagnosis and improving disease monitoring and management.

Keywords: Rheumatoid arthritis (RA), electrochemical bionanosensor, biomarker, non-invasive monitoring.

Índice general

1. Introducción	1
2. Planteamiento del Problema	3
3. 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. Artritis Reumatoide	9
5.2.2. Proteína 14-3-3 eta como biomarcador en artritis reumatoide	16
5.2.3. Saliva como matriz biológica	19
5.2.4. Celda Electroquímica	20
5.2.5. Bionanosensores electroquímicos	20
5.2.6. Técnicas electroquímicas	21
5.2.7. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	23
5.2.8. Grafeno inducido por láser (LIG)	27
5.2.9. Biofuncionalización de superficies	31
5.3. Trabajos Relacionados	33
6. Materiales y Métodos	37
6.1. Materiales y reactivos	37
6.1.1. Presupuesto	38
6.2. Revisión bibliográfica y selección del biomarcador y matriz biológica	39
6.3. Proceso de fabricación y funcionalización de los sensores	39
6.3.1. Preparación del sustrato de poliimida	40
6.3.2. Obtención de electrodos LIG	41
6.3.3. Modificación de contactos eléctricos y electrodo de referencia	41
6.3.4. Ensamblaje y caracterización fisicoquímica	41
6.3.5. Caracterización electroquímica inicial	41
6.4. Diseño experimental y selección de sensores	42
6.4.1. Variabilidad intrínseca de los sensores LIG	42
6.4.2. Fabricación por lotes independientes	43
6.4.3. Caracterización inicial y criterios de preselección	43

6.4.4.	Proceso de funcionalización química	44
6.4.5.	Procesamiento de datos	45
6.5.	Análisis de datos mediante herramienta computacional A&M EIS Studio	45
6.5.1.	Ajuste de espectros de impedancia	46
6.5.2.	Extracción de parámetros electroquímicos	46
6.5.3.	Selección y validación del circuito equivalente	46
6.6.	Definición de la señal analítica y normalización	47
6.6.1.	Fundamento de la señal: cambios en R_{ct}	47
6.6.2.	Señal analítica normalizada	48
6.6.3.	Construcción y normalización de blancos	48
6.7.	Construcción de las curvas de calibración	49
6.7.1.	Protocolo de medición	49
6.7.2.	Rangos de calibración evaluados	49
6.7.3.	Ajuste lineal y evaluación de la calidad del modelo	49
6.7.4.	Análisis estadístico complementario	50
6.8.	Determinación del LOD y el LOQ	50
6.8.1.	Método 1: Relevancia estadística	51
6.8.2.	Método 2: Blancos normalizados (ICH Q2)	51
6.8.3.	Método 3: Desviación estándar residual de la regresión	52
6.8.4.	Interpretación comparativa de los tres métodos	52
6.9.	Evaluación de especificidad: reactividad cruzada	53
6.9.1.	Selección de interferentes y protocolo	53
6.9.2.	Criterio de comparación e interpretación	53
6.10.	Prueba de concepto en saliva artificial	53
6.10.1.	Concentraciones evaluadas y protocolo	54
6.10.2.	Criterios de evaluación	54
6.11.	Limitaciones del estudio	55
7.	Resultados y Discusión	57
7.1.	Revisión bibliográfica y selección del biomarcador y matriz bio- lógica	57
7.2.	Proceso de fabricación y funcionalización de los bionanosensores	58
7.3.	Caracterización fisicoquímica	58
7.4.	Caracterización electroquímica inicial	60
7.4.1.	Desarrollo de la aplicación para el análisis automatizado de datos electroquímicos	64
7.4.2.	Selección del circuito equivalente	64
7.5.	Funcionalización de la superficie LIG	65
7.5.1.	Seguimiento electroquímico del proceso de funcionalización	65
7.6.	Curva de calibración de 0,5 - 20 ng/ml	68
7.6.1.	Análisis de la curva de calibración de 0,5–20 ng/mL	70
7.7.	Curva de calibración de 1 - 4 ng/ml	71

Índice general	19
7.7.1. Análisis de la curva de calibración de 1–4 ng/mL	73
7.8. Discusión	74
7.9. Prueba de concepto en saliva artificial	77
7.9.1. Análisis de prueba de concepto en saliva artificial	78
7.10. Prueba de reactividad cruzada en saliva artificial	79
7.10.1. Evaluación de la reactividad cruzada	79
8. Conclusiones	81
9. Trabajos futuros	83
10. Anexos	85
Anexos	85
Declaración sobre el uso de inteligencia artificial	87
Anexo 1 – Tablas complementarias	88
Bibliografía	91

Índice de figuras

5.1. Comparación entre una articulación sinovial normal y una articulación afectada por artritis reumatoide con formación de pannus.	11
5.2. Esquema general de la fisiopatología de la artritis reumatoide a nivel celular y molecular.	13
5.3. Estructura tridimensional de la proteína 14-3-3 eta.	17
5.4. Papel de las proteínas 14-3-3 en la biología ósea	18
5.5. Diagrama esquemático que ilustra las principales vías por las que las moléculas del suero ingresan a la saliva.	19
5.6. Bionanosensor electroquímico	21
5.7. Representación esquemática de la relación entre ν_{ct} y ν_{mt} en procesos electroquímicos reversibles e irreversibles.	22
5.8. Representación esquemática de la voltametría cíclica: (a) forma de onda del potencial aplicado en función del tiempo y (b) voltamograma resultante de corriente en función del potencial.	23
5.9. Esquema simple para describir el circuito de EIS y la reacción redox que tiene lugar en la superficie del electrodo de trabajo en una celda electroquímica convencional.	24
5.10. Representación esquemática de los diagramas de Bode y Nyquist para un circuito RC en paralelo	25
5.11. Espectro de impedancia y circuito equivalente	26
5.12. Representación esquemática del proceso de fabricación de electrodos LIG sobre PI mediante irradiación con un láser de CO ₂	28
5.13. Espectros Raman representativos de materiales basados en grafeno inducido por láser (LIG)	30
5.14. Esquema de biofuncionalización no covalente de una superficie de grafeno.	32
7.1. Bionanosensores de grafeno inducido por láser (LIG).	58
7.2. Espectro Raman de los bionanosensores LIG.	59
7.3. Relación entre la diferencia de corriente capacitiva (ΔI) y la velocidad de barrido utilizada para la estimación de la capacitancia de doble capa del electrodo.	60
7.4. Relación entre la corriente de pico de oxidación y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido utilizada para la estimación del área electroactiva del electrodo mediante la ecuación de Randles-Sevcik.	61
7.5. Interfaces principales de la aplicación <i>A&M EIS Studio</i>	63
7.6. Diagramas de Nyquist representativos obtenidos durante el seguimiento electroquímico	66
7.7. Curva de calibración normalizada para el rango de 0,5–20 ng/mL. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes para cada concentración.	68
7.8. Curva de calibración normalizada para las concentraciones de 1-4 ng/ml.	71

7.9. Evaluación de la reactividad cruzada del bionanosensor.	79
--	----

Índice de tablas

5.1. Descripción de las variables empleadas en la ecuación de Randles-Sevcik.	29
5.2. Bandas características del espectro Raman de materiales basados en grafeno.	30
6.1. Costos de materiales para la estructura del bionanosensor.	38
6.2. Costos de uso de equipos.	39
7.1. Matriz de decisión para la selección del biomarcador y la matriz biológica para el desarrollo del bionanosensor.	57
7.2. Comparación multicriterio de matrices biológicas para la selección de la muestra más apropiada.	57
7.3. Parámetros Raman promedio obtenidos para tres bionanosensores LIG.	59
7.4. Valores de área efectiva y área geométrica de los sensores LIG	61
7.5. Separación entre potenciales de oxidación y reducción y relación entre corrientes de pico para diferentes velocidades de barrido en presencia del sistema ferricianuro/ferrocianuro.	62
7.6. Comparación del desempeño de los circuitos equivalentes evaluados para el ajuste de los espectros EIS.	65
7.7. Valores promedio de $\Delta R_{ct, norm}$ obtenidos durante el seguimiento electroquímico del proceso de funcionalización utilizando tres bionanosensores de control.	66
7.8. Resultados del ANOVA y SEM para la curva de calibración en el rango de 0,5–20 ng/mL.	68
7.9. Resultados del análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la curva de calibración en el rango de 0,5–20 ng/mL.	68
7.10. Curva de calibración del bionanosensor en el rango de 0.5 a 20 ng/mL de proteína 14-3-3 eta.	69
7.11. Parámetros de la regresión lineal y valores estimados LOD y LOQ calculados mediante el método de la desviación estándar del blanco para la curva de calibración normalizada en el rango de 0,5–20 ng/mL.	69
7.12. Datos utilizados para el cálculo del error residual de la regresión en el rango 0,5-20 ng/ml.	69
7.13. Estimación del LOD y LOQ mediante el método del error estándar residual de la regresión en el rango de 0,5–20 ng/ml.	69
7.14. Evaluación de la relevancia estadística de cada concentración frente al blanco y su clasificación como detectable y cuantificable en el rango de 0,5–20 ng/mL.	70
7.15. Resultados del ANOVA y SEM para la curva de calibración en el rango de 1–4 ng/mL.	72
7.16. Resultados del análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la curva de calibración en el rango de 1–4 ng/mL.	72

7.17. Curva de calibración del bionanosensor en el rango de 1 a 4 ng/mL de proteína 14-3-3 eta.	72
7.18. Parámetros de la regresión lineal y valores estimados del LOD y LOQ calculados mediante el método de la desviación estándar del blanco para la curva de calibración normalizada en el rango de 1–4 ng/mL.	72
7.19. Datos utilizados para el cálculo del error estándar residual de la regresión en el rango de 1–4 ng/mL.	73
7.20. Estimación del LOD y LOQ mediante el método del error estándar residual de la regresión en el rango de 1–4 ng/mL.	73
7.21. Evaluación de la relevancia estadística de cada concentración frente al blanco y su clasificación como detectable y cuantificable en el rango de 1–4 ng/mL.	73
7.22. Bionanosensores electroquímicos reportados para la detección de biomarcadores asociados con artritis reumatoide.	76
7.23. Resultados de la prueba de concepto del bionanosensor en saliva artificial utilizando concentraciones clínicamente relevantes de proteína 14-3-3 eta.	77
10.1. Valores individuales empleados para la estimación de la señal basal del sistema (0 ng/mL) en la curva de calibración normalizada.	88
10.2. Valores individuales empleados para la estimación de la señal basal del sistema (blancos) utilizados en la curva de calibración normalizada de 0.5–20 ng/mL.	89
10.3. Parámetros electroquímicos obtenidos para los sensores blanco	90

Introducción

La Artritis Reumatoide o AR es una de las enfermedades reumáticas más comunes a nivel mundial. Esta afecta a miles de colombianos y tiene un impacto significativo en su calidad de vida. La progresión de esta enfermedad puede llevar a la pérdida de la capacidad funcional y la independencia de quienes la padecen. Esta condición no solo impacta la calidad de vida, sino que también incrementa el riesgo de muerte prematura [1]. Es de naturaleza fluctuante, es decir, cuenta con periodos de remisión y brotes, que requieren de un monitoreo constante. Sin embargo, los métodos actuales de monitoreo, como los exámenes de sangre, imágenes diagnósticas y cuestionarios son poco específicos y sensibles. Ante esta problemática surge la necesidad de desarrollar alternativas más sensibles y específicas en torno al monitoreo de la AR [2],[3], [4].

Los bionanosensores electroquímicos para detectar y medir biomarcadores son cada vez más comunes en nuestra vida diaria. Estos permiten medir concentraciones ultrabajas de analitos objetivos, estos sensores han ganado una atención significativa en muchos campos de aplicación, incluyendo, entre otros, los químicos, biológicos, médicos, industriales y agrícolas, gracias a sus capacidades de detección y cuantificación de analitos en tiempo real. Las nuevas estrategias para diseñar sensores capaces de medir concentraciones extremadamente bajas de diferentes especies moleculares están impulsadas por la promesa de menores costos de fabricación, sensibilidad y selectividad ultra altas, bajo consumo de energía, respuesta en tiempo real, biocompatibilidad, capacidades in vitro y facilidad de integración con los procesos de fabricación electrónica convencionales [5].

En este contexto, proponemos una investigación centrada en el desarrollo de un bionanosensor electroquímico. Esta propuesta busca ofrecer una herramienta de monitoreo más accesible, sensible y específica, para detectar y cuantificar de manera selectiva un biomarcador molecular en saliva asociado a la enfermedad. Esto permitiría un paso importante hacia el monitoreo de la artritis reumatoide evitando daños irreversibles. Esperamos que esta propuesta tenga el potencial de no solo mejorar el monitoreo temprano y eficaz, sino que también contribuya a reducir la mortalidad y discapacidades asociadas a la AR, particularmente en países con sistemas de salud con alta demanda como en Colombia.

En este documento presentaremos la investigación realizada, para el desarrollo de un bionanosensor electroquímico, comenzando con el planteamiento del problema, su justificación y los objetivos propuestos. En este, abordaremos un marco teórico que cubrirá las bases teóricas necesarias para el desarrollo de este proyecto. Adicionalmente, presentaremos la estructura metodológica, que abordará la identificación del biomarcador molecular confiable y clínicamente relevante para la AR en

saliva al igual que el diseño, fabricación, caracterización, optimización y validación del bionanosensor electroquímico y finalmente los resultados esperados de este proyecto.

Planteamiento del Problema

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, crónica y autoinmunitaria en la que el sistema inmunológico ataca principalmente las articulaciones sinoviales, pero que también puede comprometer órganos como los pulmones, el corazón, los vasos sanguíneos, la piel y los ojos [6]. Esta afección afecta de forma desproporcionada a las mujeres —alrededor del 70 % de los casos— y suele iniciarse en edades medias, afectando con más frecuencia a personas mayores de 55 años [7].

Según el Global Burden of Disease Study (GBD), en el año 2020 se estimó que 17,6 millones de personas de todas las edades vivían con AR en el mundo. En Latinoamérica y el Caribe, el número de casos prevalentes fue de 1,69 millones durante el mismo periodo [8]. Esta condición no solo deteriora la funcionalidad física del paciente, sino que también incrementa el riesgo de muerte prematura, deteriorando significativamente la calidad de vida e independencia de quienes la padecen.

La progresión de la enfermedad puede llevar a deformidades articulares irreversibles, limitación funcional severa y complicaciones sistémicas. Por ello, la OMS ha incluido a la AR dentro de la iniciativa “Rehabilitación 2030”, que busca integrar servicios de rehabilitación a los sistemas nacionales de salud, con un enfoque centrado en los síntomas, comorbilidades y factores modificables como la nutrición y el ejercicio [9].

Desde una perspectiva económica y ocupacional, la AR representa una amenaza para la estabilidad financiera del paciente. En un estudio de 2008, se encontró que el 35 % de los pacientes diagnosticados dejaron de trabajar en los 10 años posteriores al diagnóstico [10]. Factores como la ocupación, el peso corporal, el nivel de actividad física y el acceso a medicamentos influyen directamente en el ritmo de progresión de la enfermedad.

Actualmente, la AR se entiende como una enfermedad altamente heterogénea y de curso variable, caracterizada por brotes de inflamación activa y períodos de remisión. Para su seguimiento, se han desarrollado índices validados como el DAS28, que incluye recuentos articulares, evaluación del paciente y biomarcadores como la proteína C reactiva (PCR) o la velocidad de sedimentación globular (VSG) [4]. De estos, el DAS28-PCR ha ganado popularidad por su accesibilidad y capacidad de respuesta a cambios en la inflamación.

Sin embargo, se han identificado importantes limitaciones. A pesar de su uso extendido, múltiples estudios han evidenciado que una proporción significativa de pacientes con AR activa presenta niveles normales de PCR y VSG, lo que indica una discordancia entre los biomarcadores séricos y

la inflamación sinovial real [4],[11].

En este contexto, un estudio publicado en *Frontiers in Medicine* examinó la utilidad y limitaciones de la PCR, la VSG y el DAS28-PCR en relación con hallazgos histopatológicos sinoviales. Los resultados subrayan que, aunque la PCR muestra una relación moderadamente fuerte con la actividad inflamatoria, su valor como marcador aislado es limitado. Se concluye que es necesario interpretar sus niveles con criterio y que se requieren mejores paneles de biomarcadores que permitan una estratificación más precisa de la enfermedad y la identificación de subgrupos de pacientes en los que la inflamación no puede medirse con precisión mediante PCR [4].

Por tanto, evaluar la actividad de la AR de manera sensible, específica, accesible y continua sigue siendo un reto clínico. Las herramientas actuales, aunque validadas, presentan limitaciones prácticas que pueden conducir a una clasificación errónea de la enfermedad, retraso en las decisiones clínicas y mayor riesgo de daño estructural irreversible. Esta situación evidencia la necesidad urgente de desarrollar nuevas tecnologías portátiles de bajo costo que permitan el monitoreo no invasivo y frecuente de biomarcadores complementarios, especialmente aquellos que puedan reflejar la actividad de la enfermedad incluso cuando los marcadores convencionales están en rangos normales.

Justificación

Según la Liga Panamericana de Asociaciones de Reumatología, la artritis es la causa más frecuente de limitación para los pacientes, superando a la enfermedad cardíaca, el cáncer o la diabetes mellitus, ya que, según sus estudios, el 50 % de las personas con artritis reumatoide pueden llegar a presentar discapacidad funcional y el 20 % discapacidad total sino son tratados a tiempo [12].

Su curso clínico, caracterizado por periodos de remisión y exacerbación, requiere de un monitoreo constante y preciso para prevenir daños irreversibles. Sin embargo, las herramientas actuales de seguimiento clínico presentan importantes limitaciones: los exámenes de sangre como la PCR y la VSG, así como índices compuestos como el DAS28-PCR, no siempre reflejan fielmente el estado inflamatorio del paciente, lo que puede conducir a una clasificación errónea de la enfermedad y, en consecuencia, a decisiones terapéuticas tardías o inadecuadas [4], [11].

Los estudios biológicos de medición sérica de fármacos/metabolitos son más precisos, pero no están disponibles para el estudio de todos los fármacos. Tienen la desventaja de ser métodos más costosos, invasivos, poco prácticos para los pacientes y su interpretación depende de la farmacocinética de cada individuo y de las interacciones farmacológicas [13], [14], [15], [16]. Además, reflejan resultados de adherencia a corto plazo y pueden sobreestimar la adherencia a largo plazo porque pueden estar influenciados por el efecto de «adherencia de bata blanca», fenómeno en el que los pacientes mejoran temporalmente el cumplimiento de su tratamiento en los días previos a una consulta o evaluación médica, generando resultados que no necesariamente representan su comportamiento habitual de adherencia. [17].

Algunos autores han descrito que factores como la actividad de la enfermedad, las comorbilidades, la relación médico-paciente y la edad pueden influir en la adherencia al tratamiento farmacológico [18]. La no adherencia al tratamiento reduce la efectividad de los fármacos, retarda la recuperación de la sintomatología, permite la progresión de la enfermedad y crea la necesidad de adicionar nuevas intervenciones y medicamentos para alcanzar un óptimo control de los síntomas con el riesgo de generar interacciones farmacológicas y eventos adversos, así como el incremento en los costos [19], [20]. Además, afecta la calidad de vida y genera un incremento en el número de recaídas, de discapacidad y de mortalidad, [19], [21]. Se ha descrito que en Norteamérica el costo por falta de adherencia está estimado en 300 billones de dólares por año representado en costos evitables.

Debido a esto, el desarrollo de un bionanosensor electroquímico para la detección no invasiva de la proteína 14-3-3 eta en saliva, biomarcador asociado con la actividad y progresión de la ar-

tritis reumatoide, se presenta como una alternativa innovadora y asequible para el monitoreo de esta enfermedad. Este tipo de tecnología ofrece una variedad de ventajas en comparación con los exámenes de sangre, como la facilidad de uso, bajo costo, rapidez en la obtención de resultados y la posibilidad de ser utilizada fuera del entorno hospitalario, así como prescindibilidad de personal especializado para el monitoreo. Lo que la hace especialmente adecuada para su implementación en entornos con recursos limitados o con difícil acceso a laboratorios especializados.

Adicionalmente, los avances en el desarrollo de bionanosensores electroquímicos y su integración con técnicas de detección altamente específicas, respaldan la viabilidad de este enfoque para la evaluación de biomarcadores clínicamente relevantes en fluidos no invasivos. La utilización de saliva como matriz diagnóstica no sólo mejora la comodidad del paciente, sino que también facilita una mayor frecuencia en el seguimiento, promoviendo la adherencia al monitoreo y fortaleciendo el control clínico de la enfermedad.

El desarrollo de este medio de monitoreo se fundamenta en la necesidad de contar con herramientas prácticas y confiables que permitan tanto a los pacientes como a los profesionales de la salud tomar decisiones oportunas y personalizadas en el manejo de la artritis reumatoide. Este dispositivo tiene el potencial de contribuir significativamente al logro de los objetivos terapéuticos actuales, como la remisión o la baja actividad de la enfermedad, impactando positivamente en la calidad de vida de los pacientes y en la sostenibilidad de los sistemas de salud.

Objetivos

4.1. Objetivo General

Desarrollar un bionanosensor electroquímico como herramienta potencial para el monitoreo casero, no invasivo y selectivo de la actividad de la artritis reumatoide en saliva.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar un biomarcador confiable y clínicamente relevante para la artritis reumatoide en saliva.
- Fabricar el prototipo de bionanosensor electroquímico para la detección específica del biomarcador identificado.
- Caracterizar la respuesta del bionanosensor electroquímico mediante técnicas electroquímicas.
- Validar el desempeño del bionanosensor electroquímico como prueba rápida en condiciones de laboratorio, utilizando material recombinante en saliva artificial.

Marco de Referencia

5.1. Áreas Temáticas

- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Biotecnología.
- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Bionanosensores electroquímicos.
- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Punto de atención.
- Ingeniería en medicina y biología - Ingeniería biomédica - Monitoreo de enfermedades.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Biomarcadores.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Bioquímica - Proteínas.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Procesos biológicos - Biología molecular.
- Ingeniería en medicina y biología - Biología - Nanobiociencia - Nanobiotecnología.
- Ingeniería - Investigación y desarrollo.

5.2. Marco Teórico

5.2.1. Artritis Reumatoide

5.2.1.1. Generalidades de la artritis reumatoide

La artritis reumatoide o AR es un trastorno autoinmune, inflamatorio y sistémico que afecta a las articulaciones sinoviales. Su etiología no es clara, pero se sabe que hay factores genéticos y ambientales que intervienen. La AR puede aparecer en cualquier edad, pero es más común entre los 40 y 60 años y afecta más a mujeres que a hombres [22].

Se pueden presentar síntomas como articulaciones sensibles, calientes e hinchadas, rigidez articular que generalmente empeora por las mañanas y después de la inactividad, cansancio, fiebre y pérdida del apetito [23].

La AR, en sus etapas tempranas tiende a afectar primero las articulaciones más pequeñas, especialmente las que unen los dedos de las manos con las manos y los dedos de los pies con los pies, de forma simétrica y bilateral, los síntomas suelen extenderse a las muñecas, las rodillas, los

tobillos, los codos, la cadera y los hombros. De igual forma, hay múltiples factores de riesgo que incrementan la probabilidad de desarrollar esta enfermedad, entre los cuales se destacan el género femenino, ya que la prevalencia es mayor en mujeres, la edad adulta media como etapa más común de inicio, los antecedentes familiares de artritis reumatoide, el tabaquismo, que no solo eleva el riesgo de aparición sino que se asocia con una forma más severa, y el sobrepeso, que contribuye a la inflamación sistémica y, por ende, al aumento del riesgo de manifestación de la enfermedad [22], [23].

Esta enfermedad es de naturaleza fluctuante, con periodos donde los síntomas varían en intensidad o pueden aparecer y desaparecer, los periodos de mayor actividad de la enfermedad, denominados brotes, se alternan entre periodos de remisión relativa, cuando la hinchazón y el dolor se disipan o desaparecen. Con el paso del tiempo, la artritis reumatoide puede provocar que las articulaciones se deformen y salgan de lugar [23]. Aún no se conocen con certeza las causas de la AR; sin embargo, se cree que su aparición tiene una alta influencia por múltiples factores, entre ellos factores genéticos como ser portador de ciertos alelos como HLA-DR4 y HLA-DR1 y ambientales como la exposición a virus o bacterias, que en individuos susceptibles, puede ocasionar una respuesta inmunitaria anómala. En estos casos, el sistema inmunológico ataca las membranas sinoviales de las articulaciones, lo que genera inflamación crónica, engrosamiento sinovial y daño progresivo del cartílago y el hueso [23], [24].

5.2.1.2. Estructura de la articulación sinovial

Para asimilar correctamente la fisiopatología de la artritis reumatoide, es importante tener una perspectiva general de los componentes estructurales de las articulaciones sinoviales, que son las más comúnmente afectadas por esta enfermedad.

Una articulación sinovial compuesta de varios componentes esenciales como el cartílago articular, la membrana sinovial y los extremos óseos. La articulación contiene líquido sinovial, que permite que las superficies óseas se articulen entre sí. La matriz extracelular está compuesta de agua y proteoglicanos (glicosaminoglicano y ácido hialurónico). Las propiedades viscoelásticas del líquido sinovial y su función inherente como lubricante y amortiguador se atribuyen en gran medida al ácido hialurónico. Cada uno de estos componentes son cruciales para el desempeño normal de la articulación, al igual que son blanco de los procesos inflamatorios característicos de la AR. Como consecuencia de esta inflamación crónica, se produce la proliferación de la membrana sinovial y la formación de tejido pannus, el cual invade progresivamente el cartílago y el hueso, favoreciendo el daño articular. La Figura 5.1 ilustra los principales cambios estructurales y celulares asociados a este proceso.[25].

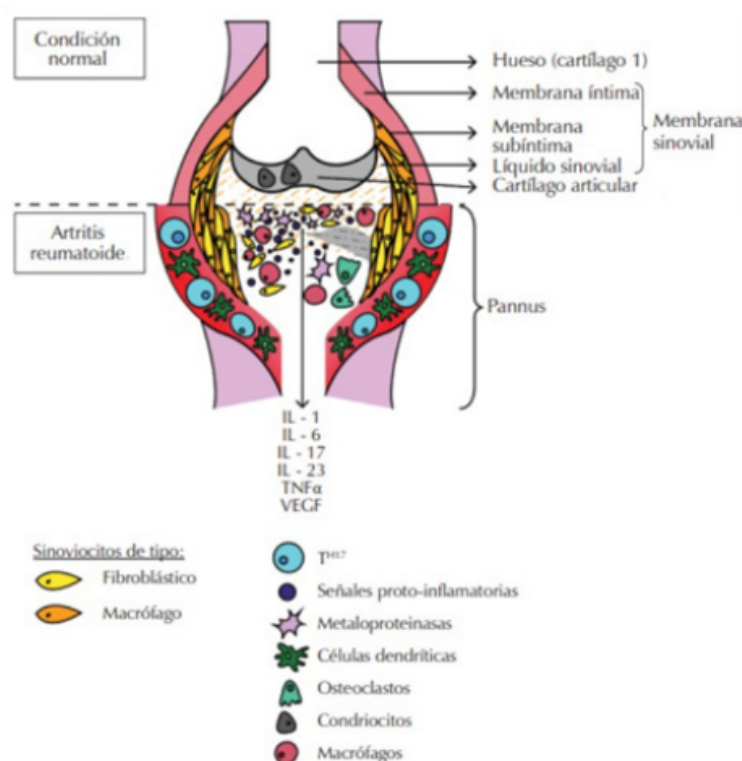


Figura 5.1: Comparación entre una articulación sinovial normal y una articulación afectada por artritis reumatoide con formación de pannus.

[26]

A continuación, se describen los principales componentes de la articulación sinovial y sus funciones, con el fin de facilitar la comprensión de los mecanismos patológicos involucrados en la artritis reumatoide.

- **Membrana sinovial:** Es un revestimiento delgado y delicado, sirve como fuente importante de nutrientes para el cartilago, ya que este es avascular. Además, las células sinoviales sintetizan lubricantes articulares como el ácido hialurónico, así como colágeno y fibronectina, que constituyen la estructura del intersticio sinovial [27].

La membrana sinovial se puede dividir en dos partes fundamentales

- **Revestimiento sinovial:** Normalmente, esta capa tiene un grosor de tan solo 1 a 3 células. En la AR, este revestimiento está muy hipertrofiado (8 a 10 células de grosor). Las principales poblaciones celulares de esta capa son fibroblastos y macrófagos [27].
- **Área subíntima de la membrana sinovial:** Aquí se ubican los vasos sanguíneos sinoviales; esta área normalmente presenta muy pocas células. Sin embargo, en la AR, la

zona subíntima presenta una infiltración importante de células inflamatorias, incluyendo linfocitos T y B, macrófagos, mastocitos y células mononucleares que se diferencian en osteoclastos multinucleados. Esta intensa infiltración celular se acompaña de neovasos (angiogénesis). En la AR, la membrana sinovial hipertrofiada (también llamada pannus) invade y erosiona el cartílago y el hueso contiguos [27].

- **Cartílago:** Compuesto principalmente por colágeno tipo II y proteoglicanos, este tejido suele ser muy resistente y absorbe impactos y tensiones considerables. En la AR, su integridad, resiliencia y contenido de agua se ven afectados. Esto parece deberse a la producción de enzimas proteolíticas (colagenasa, estromelina) tanto por las células del revestimiento sinovial como por los propios condrocitos. Las citocinas, como la IL-1 y el TNF, impulsan la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y, si bien aumentan las vías catabólicas de los condrocitos y la destrucción de la matriz, también inhiben la formación de cartílago nuevo [27].
- **Hueso:** Compuesta principalmente por colágeno tipo I, la destrucción ósea es característica de la AR. Este proceso se debe principalmente a la activación de los osteoclastos. Los osteoclastos se diferencian bajo la influencia de citocinas, especialmente la interacción de RANK con su ligando. La expresión de estas citocinas está impulsada por citocinas como el TNF y la IL-1, así como por otras citocinas como la IL-17. También es posible que mediadores derivados de las células sinoviales activadas contribuyan a la destrucción ósea [27].

5.2.1.3. Fisiopatología de la artritis reumatoide

La fisiopatología de la artritis reumatoide (AR) inicia con la citrulinación, una modificación postraduccional mediada por la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD), la cual convierte residuos de arginina en citrulina. Este proceso genera neoantígenos que, en individuos genéticamente predispuestos, desencadenan una respuesta autoinmune caracterizada por la producción de autoanticuerpos, entre ellos los anti-CCP (anticuerpos antipeptidos citrulinados cíclicos) [28].

Posteriormente, los complejos inmunes activan las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T y B. Las células T colaboradoras tipo 1 (Th1) inducen la activación de macrófagos en la articulación sinovial mediante la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF). Por su parte, las células T colaboradoras tipo 17 (Th17) producen interleucina 17 (IL-17), interleucina 1 (IL-1) y TNF- α , citocinas que actúan sobre condrocitos, osteoclastos y fibroblastos. Los condrocitos liberan enzimas degradadoras de colágeno y metaloproteinasas de matriz (MMP). Simultáneamente, los fibroblastos se transforman en fibroblastos similares a sinoviocitos (FLS), los cuales producen citocinas proinflamatorias que conducen a la destrucción de la matriz extracelular. Además, las células T activan a las células B y a las células plasmáticas, responsables de secretar diversos autoanticuerpos [29].

Estos autoanticuerpos pueden unirse a neutrófilos y macrófagos, favoreciendo la formación del pannus y el daño del cartílago. Asimismo, pueden formar complejos inmunitarios que contribuyen al dolor articular y a la destrucción ósea. En conjunto, estos procesos conducen a la inflamación crónica de la membrana sinovial y a la erosión progresiva del cartílago y del hueso, características distintivas de la artritis reumatoide [29].

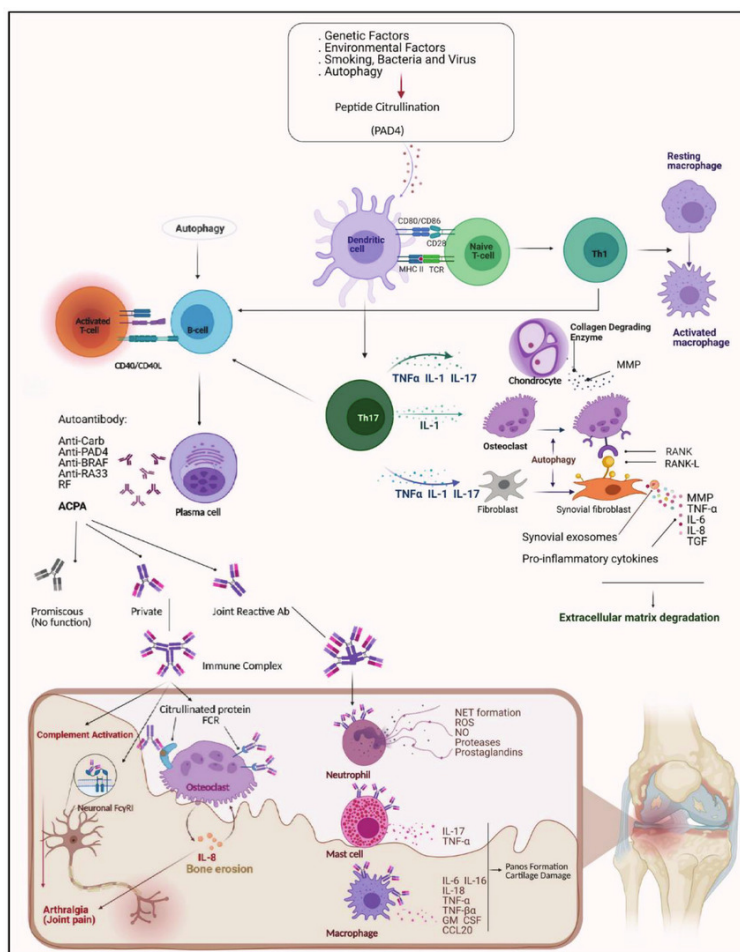


Figura 5.2: Esquema general de la fisiopatología de la artritis reumatoide a nivel celular y molecular. [29]

5.2.1.4. Técnicas de monitoreo de la AR

El estado actual de AR de un paciente se controla comúnmente a través de un examen clínico por un reumatólogo capacitado, análisis de sangre y un conjunto de técnicas de imagen para la inflamación que incluyen resonancia magnética y ultrasonido [30]. Además, se calcula una puntuación de actividad de la enfermedad como el DAS28, que se basa en un recuento de 28 articulaciones inflamadas y dolorosas, niveles de marcadores inflamatorios en la sangre y una puntuación VAS

sobre la actividad de la enfermedad por parte del paciente [31], [32].

5.2.1.5. Exámenes de sangre:

Para el monitoreo, es necesario evaluar periódicamente los reactantes de fase aguda, los procedimientos usuales incluyen la medición de Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) y Proteína C Reactiva (PCR). Sin embargo, no todos los pacientes con brotes presentarán reactantes de fase aguda elevados [33].

- **Proteína C Reactiva:** Los niveles más altos de PCR se asocian con una mayor actividad de la enfermedad AR según los componentes principales del DAS28 [34],[35].

Los aspectos individuales de la actividad de la enfermedad, como el recuento de articulaciones inflamadas y las medidas informadas por el paciente, incluido el estado funcional (puntuación del Cuestionario de evaluación de la salud), la rigidez matutina, la fatiga y el dolor, también se han asociado con la PCR [36],[37],[38],[39],[40].

Sin embargo, la utilidad de la prueba de PCR como medida rutinaria de la actividad de la AR no es universal debido a la considerable proporción de pacientes tratados que experimentan brotes de AR, pero aún presentan niveles normales de PCR [41],[42].

- **Velocidad de Sedimentación Globular:** La VSG se encuentra elevada en prácticamente todos los procesos que cursan con inflamación (enfermedades inflamatorias reumáticas o no, infecciones) y en algunas neoplasias, por lo que es totalmente inespecífica. Se eleva a las 24 h de iniciado el estímulo inflamatorio y no suele normalizarse hasta al cabo de cinco a diez días de su resolución [43].

Existen también diversas situaciones que cursan sin inflamación que pueden elevarla. Con frecuencia, la VSG se ha utilizado como marcador de actividad de diferentes enfermedades. Con el desarrollo de métodos más específicos de evaluación, ésta ha permanecido como una medida apropiada de actividad de enfermedad o respuesta al tratamiento para sólo unas pocas afecciones, una de ellas siendo la artritis reumatoide.

No obstante, la VSG no debe considerarse nunca como un indicador aislado de la evolución y/o respuesta al tratamiento de estos procesos, y es imprescindible una completa revisión clínica junto con el apoyo de otros procedimientos diagnósticos si fuese necesario [43].

5.2.1.6. Cuestionarios:

- **Cuestionario DAS28:** Es una medida continua de la actividad de la AR que combina información sobre articulaciones inflamadas, articulaciones dolorosas, respuesta de fase aguda y salud general, se considera como un criterio de referencia para la actividad de la AR [44].

El DAS28, la variante más utilizada del DAS, tiene en cuenta la evaluación general del paciente y del médico sobre la actividad de la enfermedad (durante las últimas 48 h), el número de articulaciones inflamadas y dolorosas (de 28 articulaciones) y los reactantes de fase aguda: lo más habitual es utilizar la VSG, pero se puede sustituir por la PCR [45]. El DAS28 mide la

actividad general de la enfermedad en una escala de 0 a 10 [33].

Según el DAS28 se considera enfermedad la siguiente:

- Enfermedad muy activa si $\text{DAS28} > 5,1$
 - Activo si el DAS28 está entre 5,1 y 3,2
 - En baja actividad de la enfermedad si DAS28 es 2,6–3,2
 - En remisión basada en DAS si $\text{DAS28} < 2,6$
 - Los valores DAS también se pueden utilizar para clasificar a los pacientes según su respuesta al tratamiento: un cambio de al menos 0,6 normalmente se considera como respuesta.
- **Resultados informados por los pacientes:** dada la naturaleza dolorosa y sintomática de la AR, es importante monitorear los resultados informados por el paciente [46]. Estos resultados reflejan su perspectiva y se utilizan en la práctica clínica habitual de la AR. A continuación, presentamos los principales utilizados en la práctica diaria.
- **Evaluaciones de una sola pregunta:** la evaluación global del paciente (EGP) es una de las preguntas más utilizadas en la práctica y la investigación de la AR y se incluye en varias puntuaciones compuestas, como el DAS28. La EGP se evalúa a menudo mediante una sola pregunta con una respuesta de 0 a 10 o 0 a 100. El contenido puede variar y se relaciona con la salud global (p. ej., cómo está su salud en general) o con la actividad de la enfermedad (p. ej., qué tan activa es su artritis). Las palabras clave utilizadas, es decir, para la puntuación de 0, 10 o 100 según la escala utilizada, y el momento (es decir, este día o esta semana) también varían[33].
- **Cuestionario de Evaluación de la Salud:** la medición de la incapacidad funcional se basa en varios índices. El Índice de Discapacidad del Cuestionario de Evaluación de la Salud de Stanford (HAQ-DI) es actualmente la medida más utilizada para el funcionamiento y la discapacidad en las enfermedades reumáticas, en particular en la AR [47],[48],[49]. El HAQ consta de 20 preguntas y está ampliamente validado. La puntuación va de 0 (sin incapacidad) a 3 (incapacidad total); una puntuación inferior a 0,5 se considera normal, mientras que una puntuación superior a 1,5 indica una discapacidad grave.

El HAQ ha demostrado ser tan informativo como el recuento articular o los datos radiográficos o biológicos; sin embargo, no se utiliza ampliamente en la práctica clínica debido a limitaciones de tiempo [33].

5.2.1.7. Imágenes diagnósticas:

la prevención de daño estructural para evitar la evolución hacia una discapacidad grave es un objetivo fundamental en la AR [50]. De este modo, el lugar que ocupan los criterios de evaluación estructural como son las imágenes diagnósticas ha adquirido una importancia primordial.

- **Radiografías:** son un instrumento de medida ampliamente utilizado en torno a la monitorización, pero puede plantear problemas de reproducibilidad y medición del examen, que generalmente requiere de estandarización y evaluadores capacitados. La sensibilidad y especificidad de las radiografías puede variar dependiendo del estadio clínico de la AR [51].
- **Ecografía articular:** la ecografía articular permite confirmar la sinovitis y evaluar su actividad mediante Doppler [52]. La sinovitis suele evaluarse semicuantitativamente, al igual que la actividad inflamatoria, mediante Doppler [52]. Las ecografías también pueden detectar erosiones, pero no todas las erosiones ecográficas evolucionan a erosiones radiográficas. De este modo, la ecografía articular puede ser útil en el momento del diagnóstico de la sinovitis y durante el seguimiento para evaluar la actividad inflamatoria de la AR [33].
- **Resonancia Magnética Articular:** la resonancia magnética (RM) de la mano (generalmente realizada en la mano dominante) puede ser útil en la AR [53]. La RM permite la cuantificación de las lesiones de sinovitis y tendinitis, así como detección temprana de erosiones óseas que no son visibles en una radiografía estándar. Sin embargo, su coste y disponibilidad son un obstáculo para su uso en la práctica diaria [33].

5.2.2. Proteína 14-3-3 eta como biomarcador en artritis reumatoide

Las proteínas 14-3-3 son proteínas de unión a residuos fosfo-serina/fosfo-treonina capaces de asociarse con una amplia variedad de proteínas diana, como quinasas, fosfatasas, receptores transmembrana y factores de transcripción. Estas proteínas se expresan de manera ubicua en los organismos eucariotas y, al interactuar con múltiples moléculas funcionalmente diversas y generalmente fosforiladas, regulan una gran cantidad de procesos fisiológicos, entre ellos el tráfico intracelular de proteínas, la proliferación celular, el crecimiento y la apoptosis, la regulación del metabolismo, la transducción de señales y las respuestas al estrés [54].

Las proteínas 14-3-3 constituyen una familia altamente conservada compuesta por siete isoformas (β , γ , ε , η , σ , θ y ζ). En particular, la isoforma 14-3-3 eta es uno de los siete miembros de esta familia y se expresa preferencialmente en concentraciones más elevadas en ciertos tejidos, lo que resalta la importancia de isoformas específicas en la regulación de funciones dependientes del tipo de tejido [54].



Figura 5.3: Estructura tridimensional de la proteína 14-3-3 eta. [55].

En la artritis reumatoide, la proteína 14-3-3 eta ha adquirido especial interés debido a su participación en mecanismos inflamatorios y destructivos a nivel articular. Esta proteína puede unirse a numerosas proteínas de señalización e inducir un estado proinflamatorio mediante el aumento de los niveles de interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) y metaloproteinasas de matriz (MMPs) [56]. Estas moléculas desempeñan un papel fundamental en la degradación del cartílago y del hueso, por lo que la proteína 14-3-3 η se ha relacionado con el daño articular progresivo y con la actividad de la enfermedad [54].

Diversos estudios han demostrado que la proteína 14-3-3 eta se expresa en altas concentraciones en macrófagos y fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide. La estimulación con TNF- α favorece su liberación al medio extracelular, desde donde puede actuar sobre fibroblastos similares a sinoviocitos (FLS), promoviendo su migración e invasión. Este fenómeno contribuye a la hiperplasia sinovial y a la formación del pannus, procesos centrales en la fisiopatología de la enfermedad [57].

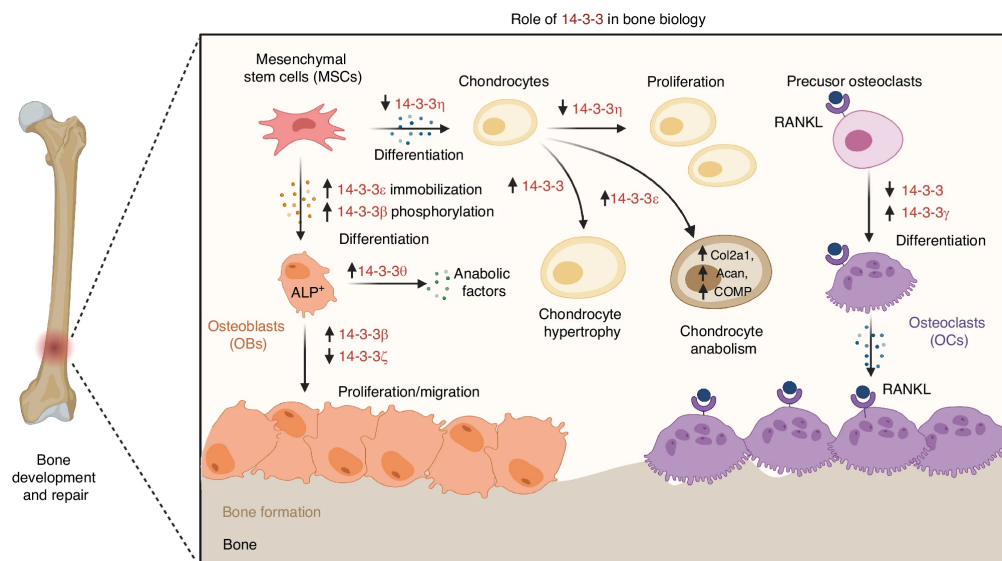


Figura 5.4: Papel de las proteínas 14-3-3 en la biología ósea [57].

Además de su relevancia fisiopatológica, la proteína 14-3-3 eta ha demostrado un importante valor clínico como biomarcador. En un estudio poblacional, los pacientes con artritis reumatoide presentaron niveles séricos promedio de 3.26 ng/mL, significativamente superiores a los 0.37 ng/mL observados en individuos sanos. Estos niveles mostraron una correlación positiva con el daño radiográfico basal, lo que respalda su utilidad como indicador de progresión estructural de la enfermedad [57].

La proteína 14-3-3 eta ha mostrado una capacidad diagnóstica comparable a biomarcadores tradicionales como el factor reumatoide y los anticuerpos anti-CCP, con valores de sensibilidad y especificidad que pueden alcanzar aproximadamente el 97.5 % y 90 %, respectivamente. Su principal fortaleza radica en su capacidad para detectar la enfermedad en pacientes seronegativos, en quienes se han reportado tasas de positividad cercanas al 75 % en pacientes negativos para anti-CCP y hasta el 87.5 % en aquellos negativos para factor reumatoide. Asimismo, la combinación de la proteína 14-3-3 eta con biomarcadores tradicionales mejora significativamente la sensibilidad diagnóstica en comparación con el uso individual de cada marcador [56].

Además de su utilidad como biomarcador sérico, se ha reportado que la proteína 14-3-3 eta también puede detectarse en saliva. Diajil et al. evaluaron las concentraciones séricas y salivales de esta proteína en pacientes con artritis reumatoide y observaron niveles salivales significativamente superiores en comparación con individuos sanos. En particular, la concentración promedio en saliva fue de 3.800 ± 2.659 ng/mL en pacientes con artritis reumatoide, mientras que en los controles sanos fue de 1.563 ± 0.620 ng/mL ($p < 0,001$). Estos resultados sugieren que la saliva constituye una matriz biológica prometedora para el tamizaje y monitoreo no invasivo de la artritis reumatoide

[58]

5.2.3. Saliva como matriz biológica

La saliva ha emergido como una matriz biológica de gran interés para aplicaciones diagnósticas y de monitoreo debido a sus múltiples ventajas frente a muestras convencionales como el suero. Al igual que este último, la saliva contiene hormonas, anticuerpos, factores de crecimiento, enzimas, microorganismos y sus productos metabólicos. Muchos de estos constituyentes ingresan a la saliva desde la sangre mediante mecanismos como difusión pasiva, transporte activo y ultrafiltración extracelular, lo que permite considerar a la saliva, en numerosos casos, como un reflejo del estado fisiológico del organismo [59].

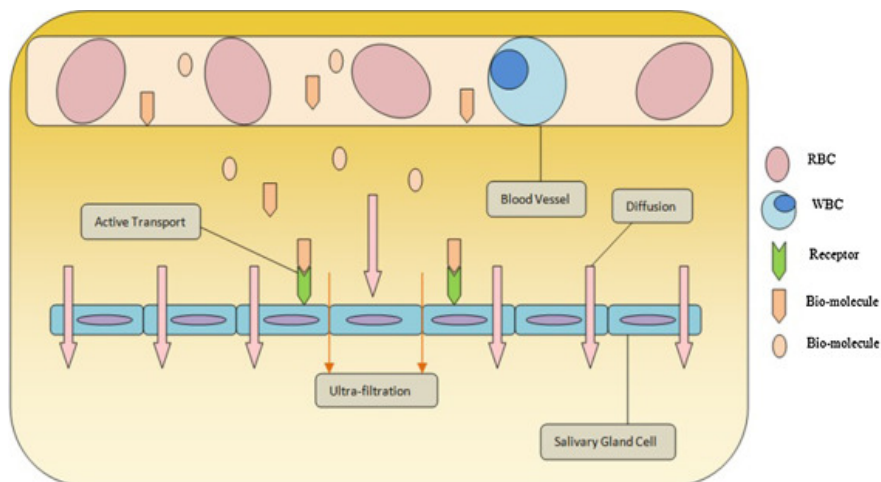


Figura 5.5: Diagrama esquemático que ilustra las principales vías por las que las moléculas del suero ingresan a la saliva.

[59].

Históricamente, el uso de la saliva como herramienta de tamizaje fue reconocido desde la década de 1960; sin embargo, su verdadero potencial se evidenció posteriormente al demostrarse ventajas significativas frente al análisis en suero. Entre estas ventajas se destacan su carácter no invasivo, facilidad de uso, bajo costo y mayor seguridad al no requerir agujas para la toma de muestra. Asimismo, no requiere personal médico altamente capacitado, permite la obtención de múltiples muestras de manera sencilla y posibilita la recolección y análisis en el hogar. Otras ventajas incluyen un menor riesgo de contaminación cruzada, menores costos de transporte y almacenamiento, y una manipulación más simple durante los procedimientos analíticos [59].

Inicialmente, existieron preocupaciones respecto al uso de la saliva debido a que muchas moléculas de interés se encuentran en concentraciones inferiores a las observadas en sangre. No obstante, el desarrollo de métodos moleculares altamente sensibles y el avance de la nanotecnología han permi-

tido superar esta limitación, ampliando considerablemente las aplicaciones de la saliva como matriz analítica [59].

Gracias a su precisión, facilidad de uso y costo-efectividad, las pruebas basadas en saliva han demostrado un importante potencial en aplicaciones clínicas y de investigación. Estas características permiten plantear el uso de la saliva como una herramienta adecuada para el tamizaje y monitoreo de enfermedades tanto orales como sistémicas, facilitando evaluaciones repetidas y descentralizadas. Sin embargo, para su implementación rutinaria es necesario continuar con la estandarización de los métodos de recolección, la validación de biomarcadores y el desarrollo de dispositivos sensibles, específicos y comercialmente viables [59].

5.2.4. Celda Electroquímica

Está conformada por tres electrodos: un electrodo de trabajo (WE), uno de referencia (RE) y un contraelectrodo (CE). En el WE ocurre la reacción electroquímica, para lo cual se le aplica un potencial variable respecto del electrodo de potencial fijo (RE). La corriente resultante de la reacción química circula entre el WE y el CE. La variación de potencial aplicado y la medición de corriente se controlan mediante un potenciostato [60].

5.2.5. Bionanosensores electroquímicos

Se utilizan para medir la presencia de un analito a partir de la detección de cambios en el potencial, la corriente, la resistencia o la conductividad producidos por una reacción química de tipo redox (reducción-oxidación) que tiene lugar dentro de una celda electroquímica. El analito de interés está contenido en una solución electrolítica que interactúa (de manera convencional) con tres electrodos, que actúan como transductor del sensor. Dos aspectos clave definen el nanosensor electroquímico: 1) el electrodo de trabajo y 2) la técnica electroquímica.

Los tipos de electrodos de trabajo se agrupan como electrodos de gota de mercurio, electrodos a base de carbono, electrodos de carbono vítreo, electrodos de diamante, electrodos de pasta de carbono, electrodos serigrafiados y electrodos a base de papel. Actualmente, las técnicas electroquímicas más comunes son potenciométricas, conductimétricas, voltamperométricas, amperométricas e impedanciométricas [61],[62].

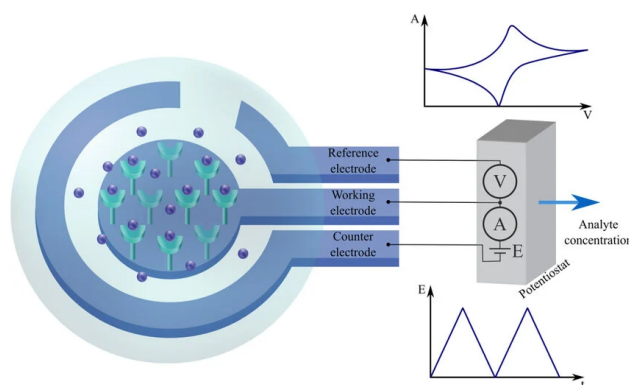


Figura 5.6: Bionanosensor electroquímico
[63]

En la Figura 5.6 se evidencia un bionanosensor electroquímico con configuración de tres electrodos. Los marcadores esféricos morados representan el analito objetivo. Se produce una reacción redox en la superficie del electrodo de trabajo debido a la interacción entre el electrodo funcionalizado y el analito objetivo. Como resultado de este proceso químico, fluye una corriente a través del electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Si el analito se reduce en el electrodo de trabajo, la corriente es catódica, mientras que la oxidación del analito produce una corriente anódica. El potenciostato garantiza las condiciones de voltaje requeridas en cada electrodo y mide la corriente faradaica.

5.2.6. Técnicas electroquímicas

- **Métodos potenciométricos:** se basan en la medición del potencial de carga en el electrodo de trabajo. Este potencial resulta de las reacciones químicas que tienen lugar dentro de la solución de muestra debido a la concentración de analito en el electrodo de referencia y bajo condiciones de flujo sin corriente. El potencial medido corresponde a la separación de carga a través de una interfaz que depende directamente del tipo de electrodo y puede describirse utilizando la ecuación de Nernst, que permite el cálculo de actividades iónicas o concentración efectiva como una función del potencial del electrodo y un potencial estándar [64].
- **Métodos voltamétricos:** implican la aplicación de un potencial dependiente del tiempo al electrodo de trabajo. Este cambio de potencial genera un flujo de corriente que implica una reacción química redox en la solución de muestra entre los electrodos de trabajo y de referencia, lo que proporciona información cuantitativa y cualitativa asociada al analito objetivo. Dependiendo del proceso de oxidación o reducción, la corriente fluye a través del electrodo de trabajo hacia el contraelectrodo (también conocida como corriente faradaica). La magnitud de esta corriente está determinada por la velocidad de la reacción redox, que es proporcional a la velocidad del transporte de masa hacia y desde el electrodo y a la cinética electrónica [65].

El transporte de masa representa la velocidad a la que las especies químicas involucradas se acercan o se alejan de la superficie del electrodo y puede expresarse mediante los modos de difusión, migración y convección. El modo de difusión se basa en el movimiento de iones o moléculas, debido a las diferentes concentraciones de analito en la superficie del electrodo y en la solución. En la convección, el movimiento ocurre cuando la solución se mezcla mecánicamente. Durante el modo de migración, el reactivo y los productos se mueven debido a la carga superficial del electrodo [65].

Los procesos voltamétricos generalmente ocurren en la región donde la difusión es el único modo de influencia significativa en el transporte de masa. La velocidad a la que se mueven los electrones en el proceso redox, es decir, la cinética electrónica, también afecta la corriente. Si la cinética electrónica es rápida, el proceso redox es reversible y está en equilibrio. Si la cinética electrónica es lenta, el proceso redox es irreversible y la reacción química no se describe mediante la ecuación de Nernst. Además de la corriente faradaica, existen otras corrientes no faradaicas o de fondo que pueden afectar las mediciones voltamétricas. Esta corriente generalmente está relacionada con la reacción redox de impurezas, en la solución a granel y la carga superficial del electrodo que conduce a la formación de una interfaz estructurada electrodo-solución, también conocida como doble capa eléctrica (EDL) [65].

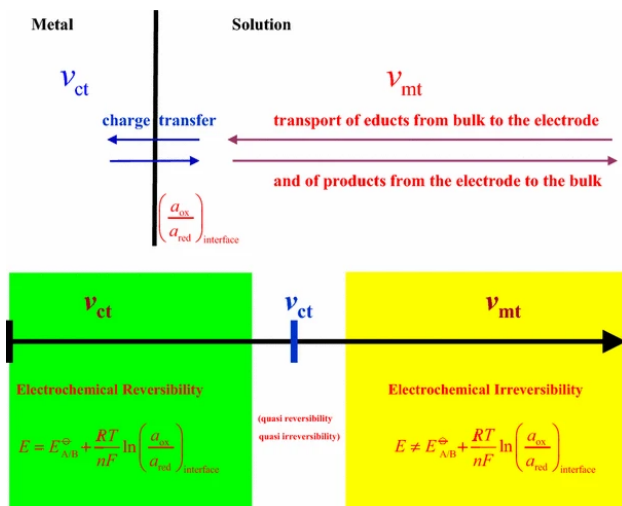


Figura 5.7: Representación esquemática de la relación entre ν_{ct} y ν_{mt} en procesos electroquímicos reversibles e irreversibles.

[65]

Las diferentes técnicas de voltametría existentes se clasifican de forma única según las características de potencial basadas en el tiempo aplicadas. Las técnicas más comunes incluyen la voltametría de barrido lineal y la voltametría cíclica. Cada una genera un gráfico o voltamograma de la corriente frente al potencial aplicado, donde la corriente es función de la

concentración del analito objetivo. En la voltametría de barrido lineal, se aplica una rampa de potencial lineal para analizar la reacción de oxidación o reducción, mientras que en la voltametría cíclica se utilizan potenciales positivos y negativos para analizar tanto el proceso de oxidación como el de reducción del analito. En el proceso cíclico, la respuesta de la corriente presenta picos de corriente separados para los procesos de oxidación y reducción. Si se produce una reacción redox irreversible, solo se define uno de estos picos [63].

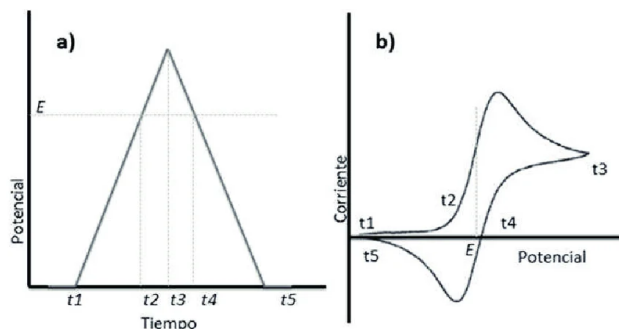


Figura 5.8: Representación esquemática de la voltametría cíclica: (a) forma de onda del potencial aplicado en función del tiempo y (b) voltamograma resultante de corriente en función del potencial. [66]

- **Técnica amperométrica:** La técnica amperométrica comparte principios con los métodos voltamétricos; sin embargo, se diferencia porque el potencial aplicado al electrodo de trabajo se mantiene constante durante la medición. Bajo estas condiciones, la señal analítica corresponde a la corriente generada por las reacciones de oxidación o reducción que ocurren en la superficie del electrodo y que se registra respecto al electrodo de referencia. Debido a su capacidad para detectar pequeñas variaciones de corriente, esta técnica suele ofrecer una mayor sensibilidad que los métodos potenciométricos [63].

5.2.7. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

5.2.7.1. Concepto básico de EIS

En una celda electroquímica convencional, las interacciones entre la materia (especies redox) y el electrodo incluyen la concentración de las especies electroactivas, la transferencia de carga y la transferencia de masa desde la solución a granel hasta la superficie del electrodo, además de la resistencia del electrolito. Cada una de estas características se representa mediante un circuito eléctrico compuesto por resistencias, condensadores o elementos de fase constante, conectados en paralelo o en serie para formar un circuito equivalente, como se muestra en la Figura 5.9, donde R_{ct} corresponde a la resistencia a la transferencia de carga, R_s representa la resistencia del electrolito y C_{dl} es la capacitancia de la doble capa eléctrica [67].

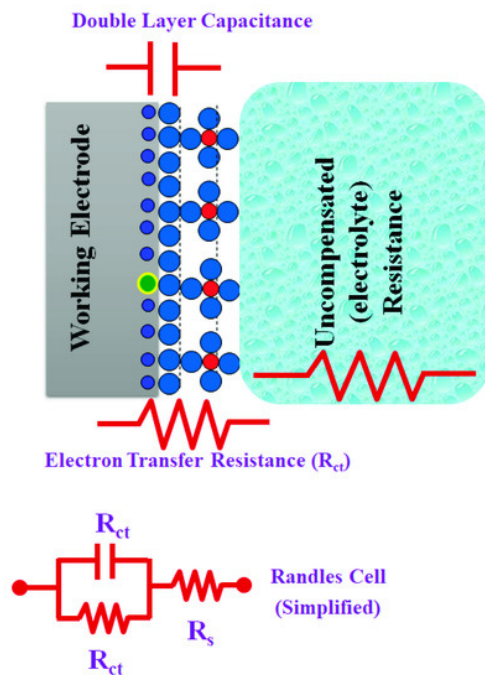


Figura 5.9: Esquema simple para describir el circuito de EIS y la reacción redox que tiene lugar en la superficie del electrodo de trabajo en una celda electroquímica convencional.

[67]

Así pues, la Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) puede utilizarse para explorar los procesos de transferencia de masa, transferencia de carga y difusión. En consecuencia, la EIS permite estudiar propiedades intrínsecas de los materiales o procesos específicos que puedan influir en la conductancia, resistencia o capacitancia de un sistema electroquímico. Su principio de funcionamiento consiste en aplicar una perturbación sinusoidal de pequeña amplitud al sistema electroquímico y analizar la respuesta de corriente obtenida en un amplio rango de frecuencias. La respuesta de la celda electroquímica se considera pseudolineal, obteniéndose un desfase en el que la respuesta de corriente a un potencial sinusoidal es una senoide a la frecuencia aplicada. Por lo tanto, la señal de excitación se presenta en función del tiempo, tal como se indica en la Ecuación (5.1) [67]:

$$E_t = E_0 \sin(\omega t) \quad (5.1)$$

Donde E_t es el potencial en el tiempo t , E_0 es la amplitud de la señal y ω es la frecuencia radial.

La señal de excitación aplicada en EIS puede describirse mediante una función sinusoidal en la que el potencial varía periódicamente con el tiempo. La relación entre la frecuencia radial y la frecuencia aplicada se expresa como $\omega = 2\pi f$, donde ω es la frecuencia angular y f es la frecuencia en hertz. En sistemas lineales, la corriente resultante presenta la misma frecuencia que la señal aplicada,

pero con una amplitud diferente y un desfase de fase (Φ) respecto al potencial. Este desfase depende de las propiedades electroquímicas de la interfaz y constituye una fuente importante de información sobre el comportamiento del sistema [67].

La impedancia se define como la relación entre el potencial aplicado y la corriente obtenida, y se expresa como una magnitud compleja. Matemáticamente, puede representarse en forma polar como $Z = Z_0 e^{i\Phi}$ o en forma rectangular como $Z = Z' + iZ''$, donde Z' corresponde a la componente real asociada con procesos resistivos y Z'' representa la componente imaginaria relacionada con fenómenos capacitivos y difusivos. Esta representación permite analizar de manera simultánea diferentes procesos electroquímicos que ocurren en la interfaz electrodo-solución [67].

Los resultados obtenidos mediante EIS suelen representarse mediante diagramas de Nyquist y Bode. En el diagrama de Nyquist se grafica la parte imaginaria negativa ($-Z''$) en función de la parte real (Z'), lo que facilita la identificación de parámetros como la resistencia de la solución y la resistencia a la transferencia de carga. En los diagramas de Bode, por su parte, se representa el módulo de la impedancia y el ángulo de fase en función del logaritmo de la frecuencia, proporcionando información adicional sobre la respuesta del sistema en diferentes escalas temporales. Ambos tipos de representación son complementarios y ampliamente utilizados en el análisis de biosensores electroquímicos [67].

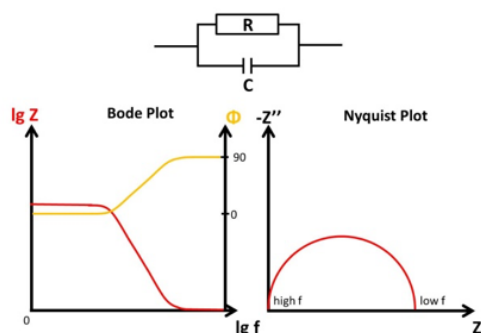


Figura 5.10: Representación esquemática de los diagramas de Bode y Nyquist para un circuito RC en paralelo

[68]

5.2.7.2. Circuitos equivalentes EIS

Los procesos electroquímicos asociados con la interfaz electrodo-electrolito y las reacciones redox pueden representarse mediante un circuito eléctrico equivalente conformado por componentes como resistencias, capacitores e inductores. Este circuito equivalente se diseña e implementa con el fin de comprender y evaluar los diferentes componentes individuales del sistema analizado por EIS. Uno de los modelos más utilizados es el circuito equivalente de Randles, el cual incluye (R_s) , (C_{dl}) , (R_{ct}) y (Z_W) , asociada a los procesos de difusión que ocurren en la interfaz electrodo-electrolito, como se muestra en la Figura 5.11 [67].

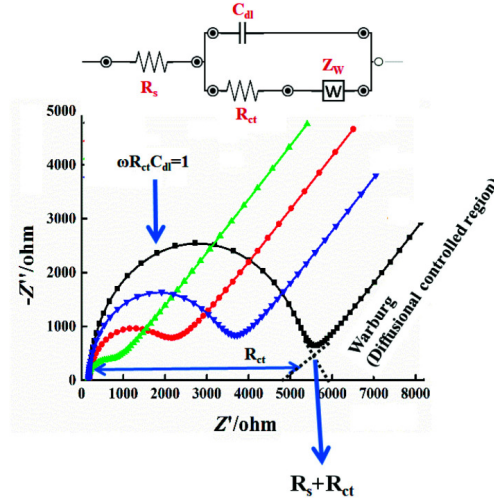


Figura 5.11: Espectro de impedancia y circuito equivalente [67]

Experimentalmente, un capacitor ideal rara vez describe con exactitud el comportamiento de sistemas electroquímicos reales. Por esta razón, suele emplearse un elemento adicional denominado elemento de fase constante (*Constant Phase Element*, CPE), el cual permite modelar de manera más precisa la respuesta capacitiva no ideal del sistema. Entre las principales causas de este comportamiento se encuentran la rugosidad superficial, la heterogeneidad y la porosidad de los materiales evaluados [67].

- **Elemento de Gerischer** Es un componente de los circuitos equivalentes utilizado para describir sistemas electroquímicos en los que los procesos de transferencia de carga se encuentran acoplados con fenómenos de difusión dentro de materiales porosos [69]. A diferencia de la impedancia de Warburg, que modela principalmente procesos difusivos, el elemento de Gerischer representa situaciones en las que las especies electroactivas difunden a través de la estructura del material y reaccionan simultáneamente en múltiples sitios activos.

De acuerdo con Ryš et al. [69], este elemento puede interpretarse como la respuesta de una línea de transmisión semi-infinita compuesta por resistencias y elementos capacitivos distribuidos, lo que le confiere una base física para describir materiales con estructuras tridimensionales y alta porosidad.

La impedancia del elemento de Gerischer puede expresarse como:

$$Z_G = \frac{R_G}{\sqrt{1 + \tau_G j \omega}} \quad (5.2)$$

donde R_G es un parámetro resistivo asociado al proceso global de reacción-difusión, τ_G es la constante de tiempo característica del sistema, j es la unidad imaginaria y ω es la frecuencia angular.

Según Ryś et al. [69], la inclusión del elemento de Gerischer mejora el ajuste de espectros de impedancia en materiales con una estructura porosa desarrollada, ya que sus parámetros reflejan propiedades como la porosidad, la heterogeneidad y la accesibilidad de los poros. Por esta razón, este elemento resulta especialmente útil para modelar la respuesta electroquímica de materiales tridimensionales y altamente porosos como lo es el grafeno inducido por láser.

5.2.8. Grafeno inducido por láser (LIG)

El grafeno, que es un alótropo del carbono de un átomo de espesor compuesto por átomos de carbono organizados en una red hexagonal bidimensional [70] el cual ha recibido una atención significativa en diversos campos de investigación debido a sus propiedades excepcionales, como su alta área superficial específica, excelente conductividad eléctrica, biocompatibilidad y estabilidad química, lo posicionan como un material altamente prometedor para sensores de vigilancia sanitaria [71].

En este contexto, han surgido nuevas estrategias para la obtención de materiales basados en grafeno que permitan aprovechar estas propiedades de manera más eficiente entre ellas, el grafeno inducido por láser (LIG) el cual es un nanomaterial de carbono poroso tridimensional (3D) fabricado mediante escritura directa con láser de dióxido de carbono sobre materiales poliméricos en condiciones ambientales. También se le denomina grafeno ablacionado por láser (LAG), grafeno rayado por láser (LSG) o grafeno derivado por láser (LDG) [72].

La morfología del LIG puede ser controlada fácilmente por computador, lo cual es de gran importancia para el desarrollo de sensores eléctricos/electroquímicos de alta sensibilidad y dispositivos electrónicos portátiles (wearables) para la detección de biomarcadores médicos. La poliimida (PI) y sus complejos se utilizan comúnmente para preparar LIG. Asimismo, se ha reportado el uso de poliéterimida (PEI), cáscara de papa, madera, corcho, coco, tela y polisulfona (PSU) como materiales poliméricos base para grabar grafeno poroso 3D. En el proceso de preparación del LIG, se emplea frecuentemente un láser infrarrojo de CO₂ (generalmente con una longitud de onda de excitación de 10.6 μm) [72].

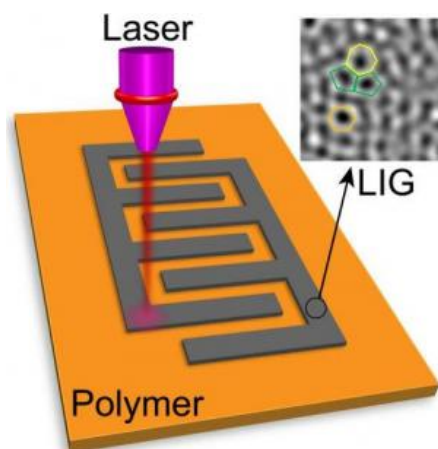


Figura 5.12: Representación esquemática del proceso de fabricación de electrodos LIG sobre PI mediante irradiación con un láser de CO_2 .

[73]

Como se observa en la Figura 5.12 el principio principal consiste en que, durante el barrido del láser sobre el material polimérico base, se rompen los enlaces nitrógeno-carbono, carbono-oxígeno y carbono-oxígeno de dicho material, los cuales se reordenan posteriormente para formar una estructura de grafeno poroso tridimensional. Además del láser infrarrojo de CO_2 , se ha confirmado que los láseres ultravioleta (UV) y los láseres de luz visible también pueden ser utilizados para preparar LIG [71].

5.2.8.1. Área superficial electroquímicamente activa del grafeno inducido por láser

El área de un electrodo suele definirse a partir de sus dimensiones físicas; sin embargo, esta aproximación es estrictamente válida únicamente para superficies idealmente planas. En la práctica, la mayoría de los materiales presentan micro y nanoestructuras que incrementan de manera significativa la superficie realmente disponible para las reacciones electroquímicas. Esta superficie efectiva se denomina área superficial electroquímicamente activa (*Electrochemically Active Surface Area*, ECSA o EASA) y corresponde a la fracción del electrodo que participa directamente en los procesos de transferencia de carga. Una de las metodologías más utilizadas para estimar la ECSA es mediante la ecuación de Randles-Sevcik para sistemas reversibles. Adicionalmente, se pueden evaluar otros parámetros electroquímicos relevantes, como la separación entre los potenciales de oxidación y reducción (ΔE_p) y la relación entre las corrientes pico anódica y catódica (I_{pa}/I_{pc}). Estos parámetros proporcionan información sobre la reversibilidad del sistema redox y la eficiencia de la transferencia electrónica en la superficie del electrodo. La relación entre el área electroquímicamente activa y el área geométrica (A_{GEO}) se conoce como rugosidad electroquímica y constituye un parámetro útil para describir el grado de desarrollo superficial del material [74].

La ECSA cuantifica la superficie de interacción efectiva de un transductor electroquímico y per-

mite realizar comparaciones más precisas entre distintos materiales de electrodo. En el caso del LIG, este parámetro resulta particularmente relevante debido a la estructura porosa y tridimensional característica del material, la cual puede incrementar el número de sitios electroactivos disponibles y favorecer tanto la transferencia electrónica como la inmovilización de biomoléculas sobre la superficie [74].

En numerosos estudios, la ECSA de electrodos de LIG se ha estimado mediante voltametría cíclica *in situ*, utilizando el par redox hexacianoferrato (II/III), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, y aplicando la ecuación de Randles-Sevcik. En este método, la corriente pico (i_p) se grafica en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($\nu^{1/2}$), obteniéndose una relación lineal cuya pendiente permite calcular el área electroquímicamente activa del electrodo [74]. La ecuación de Randles-Sevcik para un sistema reversible a temperatura ambiente puede expresarse como:

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C \nu^{1/2} \quad (5.3)$$

Cuadro 5.1: Descripción de las variables empleadas en la ecuación de Randles-Sevcik.

Símbolo	Descripción
i_p	Corriente pico (A)
n	Número de electrones transferidos
A	Área superficial electroquímicamente activa (cm^2)
D	Coefficiente de difusión del analito ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
C	Concentración del analito en la solución (mol cm^{-3})
ν	Velocidad de barrido (V s^{-1})

5.2.8.2. Caracterización estructural y morfológica del LIG

- **Espectroscopia Raman** La espectroscopía Raman es una técnica ampliamente empleada para estudiar los modos vibracionales de moléculas y materiales, siendo especialmente útil en la caracterización estructural de nanomateriales basados en carbono. En materiales grafénicos, el espectro Raman se caracteriza por la presencia de las bandas D, G y 2D, las cuales proporcionan información sobre el grado de grafitización, la presencia de defectos y el orden estructural del material. La identificación de estas bandas en el material obtenido constituye una evidencia de la conversión de la poliimida en estructuras grafénicas como resultado de la irradiación con láser de CO_2 5.13 . Las bandas del espectro Raman de los materiales basados en grafeno se presentan en el cuadro 5.2 [74].

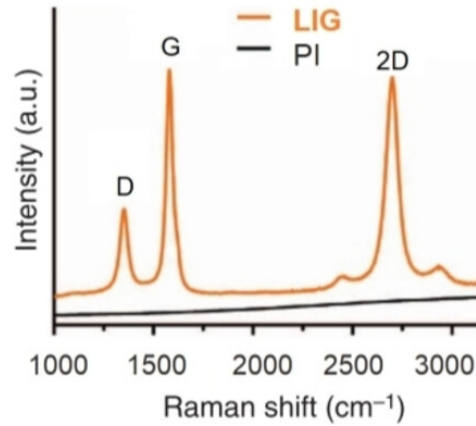


Figura 5.13: Espectros Raman representativos de materiales basados en grafeno inducido por láser (LIG)

[74].

Cuadro 5.2: Bandas características del espectro Raman de materiales basados en grafeno.

[74]

Banda	Desplazamiento Raman (cm^{-1})	Origen
D	1335	Asociada a defectos estructurales y discontinuidades presentes en la red de carbono grafitico.
G	1582	Relacionada con las vibraciones de los enlaces carbono-carbono (sp^2) presentes en dominios grafiticos ordenados.
2D	2668	Vinculada al orden estructural de las capas grafénicas y a las interacciones entre láminas de grafeno.

- **Relación I_D/I_G , relación I_{2D}/I_G :** La relación entre las intensidades de las bandas D y G del espectro Raman (I_D/I_G) es un parámetro ampliamente utilizado para la caracterización de materiales basados en grafeno, ya que permite evaluar el grado de desorden estructural asociado a la presencia de defectos, así como estimar el tamaño promedio de los dominios de carbono con hibridación sp^2 [74]. Adicionalmente, la relación entre las intensidades de las bandas 2D y G (I_{2D}/I_G) constituye un indicador útil de la calidad estructural del grafeno y puede emplearse para identificar la presencia de láminas de grafeno de alta calidad y con un reducido número de capas [74].

5.2.9. Biofuncionalización de superficies

La biofuncionalización de superficies es un proceso fundamental en el desarrollo de biosensores, ya que permite inmovilizar biomoléculas de reconocimiento sobre la superficie del transductor con el fin de conferir especificidad y sensibilidad hacia un analito determinado. En los biosensores basados en grafeno, este proceso es especialmente importante debido a que la detección depende directamente de la interacción entre el biomarcador objetivo y las moléculas de reconocimiento ancladas a la superficie del material. La adecuada biofuncionalización no solo favorece la unión estable de los bioreceptores, sino que también contribuye a preservar su actividad biológica y a mejorar la biocompatibilidad y el desempeño analítico del sensor [75].

5.2.9.1. Sondas biomoleculares

Las biomoléculas empleadas como elementos de reconocimiento, también denominadas sondas biomoleculares o bioreceptores, incluyen aptámeros, anticuerpos y enzimas. Entre ellas, los anticuerpos son ampliamente utilizados debido a su alta afinidad y especificidad hacia antígenos particulares, lo que los convierte en herramientas idóneas para la detección de proteínas y biomarcadores asociados a enfermedades. La selección del bioreceptor es un aspecto crítico, ya que determina en gran medida la selectividad y sensibilidad del biosensor [75].

5.2.9.2. Modificaciones covalentes y no covalentes

Los métodos de inmovilización de biomoléculas sobre materiales basados en grafeno pueden clasificarse en covalentes y no covalentes. La modificación covalente consiste en la formación de enlaces químicos fuertes entre la superficie y la biomolécula, proporcionando una inmovilización altamente estable. Para ello, es necesario introducir grupos funcionales reactivos mediante agentes como las sales de arildiazonio o el ácido 1-pirenobutírico (PBA), los cuales permiten posteriormente la inmovilización de biomoléculas mediante química 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) [75].

Por otra parte, la modificación no covalente se basa en interacciones como el apilamiento π - π , las interacciones electrostáticas y las fuerzas hidrofóbicas, preservando la estructura electrónica del grafeno. Un agente ampliamente utilizado en este tipo de funcionalización es el 1-pirenobutírico éster succinimidilo (PBASE), el cual se adsorbe sobre la superficie del grafeno y reacciona con grupos amino de biomoléculas [75]. En general, la modificación covalente ofrece mayor estabilidad, mientras que la no covalente permite conservar mejor las propiedades electrónicas del grafeno.

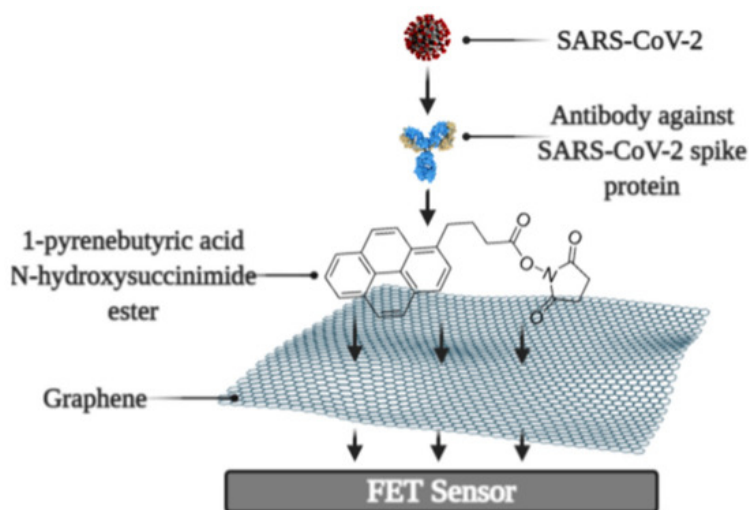


Figura 5.14: Esquema de biofuncionalización no covalente de una superficie de grafeno. [76]

La Figura 5.14 muestra una estrategia representativa de biofuncionalización de superficies de grafeno mediante el uso de moléculas bifuncionales. En este esquema, el PBASE se adsorbe sobre la superficie del grafeno a través de interacciones π - π entre el grupo pireno y la red conjugada de carbono sp^2 , preservando así las propiedades electrónicas del material. Posteriormente, el grupo éster de N-hidroxisuccinimida reacciona con grupos amino primarios presentes en anticuerpos u otras biomoléculas, formando enlaces amida estables que permiten su inmovilización sobre la superficie del transductor. Aunque en este trabajo se empleó PBA seguido de activación con EDC/NHS para la inmovilización covalente del anticuerpo, esta figura ilustra de manera clara el principio general de anclaje molecular sobre materiales basados en grafeno y la posterior unión específica de biomoléculas de reconocimiento.

5.2.9.3. Inmovilización mediante química EDC/NHS

Una de las estrategias más empleadas para la inmovilización covalente es la química de carbo-diimidas, (EDC) y (NHS). En este proceso, los grupos carboxilo presentes en la superficie se activan para reaccionar con grupos amino de proteínas o anticuerpos, formando enlaces amida estables. Esta metodología es ampliamente utilizada para inmovilizar anticuerpos sobre materiales basados en grafeno y sus derivados, debido a la alta estabilidad y reproducibilidad que proporciona [75].

5.2.9.4. Pasivación y bloqueo de sitios no específicos

Después de la inmovilización del bioreceptor, es necesario bloquear o pasivar los sitios libres de la superficie para evitar la adsorción no específica de otras biomoléculas presentes en la muestra. Este proceso mejora la selectividad del bionanosensor y reduce señales de fondo no deseadas. Entre

los agentes de bloqueo más utilizados se encuentra la albúmina sérica bovina (BSA), una proteína capaz de recubrir las regiones no ocupadas de la superficie y minimizar interacciones inespecíficas, contribuyendo así a una detección más confiable y reproducible [75].

5.3. Trabajos Relacionados

- **Desarrollo del sistema FRENED para la detección rápida de sCD14 en biofluidos:** Este sistema fue desarrollado para la medición cuantitativa y rápida del biomarcador sCD14 ya sea en una muestra de orina o suero para medir la actividad de la AR en 5 minutos. Consiste en un lector de cartuchos portátil que miden la fluorescencia inducida por láser en un cartucho de solo uso [77]. Para medir los niveles de sCD14 con el sistema FRENEDTM-CD14, se añade una gota (35 microlitros) de suero u orina a una solución de dilución y se aplica a la entrada del cartucho, donde se mezcla con nanopartículas fluorescentes conjugadas con anticuerpos anti-CD14; cuando la muestra llega a la zona de prueba, hidrata los anticuerpos anti-CD14 secos en la fase sólida.
El sistema FRENEDTM-CD14 permite obtener resultados en aproximadamente 4 minutos, considerando tanto la etapa de reacción en el cartucho como la lectura instrumental. La cuantificación de sCD14 se basa en la comparación de las señales de fluorescencia generadas en las regiones de prueba y referencia. La relación entre ambas señales disminuye a medida que aumenta la concentración del analito, por lo que una menor razón de fluorescencia corresponde a una mayor concentración de sCD14 en la muestra. [78].
- **HANDSCAN:** El dispositivo emplea técnicas de imagen óptica para la evaluación de procesos inflamatorios. Para ello, ambas manos son expuestas simultáneamente a luz roja e infrarroja cercana, mientras una cámara registra la radiación transmitida. La señal obtenida depende de la cantidad de sangre presente en los tejidos, ya que un incremento en la vascularización produce una mayor absorción de la luz y, en consecuencia, una disminución de la intensidad detectada. [79]. El procedimiento total dura aproximadamente de 5 a 10 minutos y puede ser realizado por cualquier profesional de la salud después de una breve capacitación [80].
El HandScan produce un valor para el nivel de inflamación para cada articulación por separado y una puntuación combinada para toda la mano. La inflamación también se muestra visualmente con una escala del verde al rojo superpuesta en las articulaciones de la mano y las muñecas. Esto puede ayudar a comprender la actividad actual de la artritis de un paciente, así como a localizar la actividad inflamatoria. Investigaciones anteriores demostraron que el HandScan es una prueba sensible y específica con buena validez [80],[81].
- **Biosensor para la cuantificación del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF):** Se basa en un bionanosensor electroquímico, funcionalizado con un anticuerpo monoclonal (mAb) de IgM murino contra el MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos) humano, con un electrodo de oro modificado recubierto con compuestos de nanopartículas de oro, nanopartículas de dióxido de titanio y tiónina (NGP-NTiP-Thi), seguido de la adsorción

de anticuerpos anti-MIF de isotipo IgM o IgG1[82].

El bionanosensor de IgM detectó el MIF en una relación lineal en el rango de 0,03 a 230 ng/mL, con un límite inferior ($S/N = 3$) de 0,02 ng/mL. Las mediciones mostraron niveles considerables de sensibilidad, selectividad, estabilidad y mantenimiento a largo plazo de la bioactividad, esto lo demostraron en pruebas con MIF sérico en pacientes con artritis reumatoide (AR) en comparación con donantes sanos.

- **Bionanosensor microfluídico rápido para la determinación en el punto de atención de la artritis reumatoide mediante la detección de anticuerpos antipéptido citrulinado cíclico:** Los autores desarrollaron una plataforma microfluídica para la detección de anticuerpos anti-CCP, biomarcadores ampliamente utilizados en el diagnóstico de la artritis reumatoide. El sistema combinó un chip microfluídico funcionalizado mediante la interacción estreptavidina-biotina con un microespectrómetro para realizar mediciones colorimétricas a 450 nm. La plataforma mostró una alta correlación entre la señal óptica y la concentración del biomarcador, demostrando su potencial para el diagnóstico temprano y el monitoreo de la enfermedad en entornos de atención inmediata.[83].
- **Nanobiosensor electroquímico para la detección temprana de biomarcadores de artritis reumatoide:** El trabajo de Selvam et al. desarrolló un inmunosensor electroquímico para la detección de anticuerpos anti-CCP, uno de los biomarcadores más específicos para el diagnóstico temprano de la artritis reumatoide. El sensor se construyó sobre un electrodo serigrafiado modificado con un nanocompuesto de MoS_2 , polianilina y nanopartículas de oro, y la detección se realizó mediante EIS. El dispositivo presentó un rango lineal de 0.25 a 1500 IU/mL y un límite de detección de 0.16 IU/mL, demostrando alta sensibilidad y selectividad para la detección de biomarcadores asociados a la artritis reumatoide [84].
- **Inmunosensor electroquímico para la detección temprana del biomarcador de artritis reumatoide: anticuerpos antipéptido citrulinado cíclico en suero humano basados en el sistema avidina-biotina:** En este trabajo se desarrollo un inmunosensor electroquímico libre de marcadores para la detección de anticuerpos anti-CCP, empleando microelectrodos interdigitales modificados con péptidos citrulinados. La cuantificación se realizó mediante EIS, obteniendo un rango lineal de 1 a 800 IU/mL y un límite de detección de 0.60 IU/mL en PBS y 0.82 IU/mL en suero humano. El sensor demostró alta sensibilidad y selectividad para la detección temprana de biomarcadores asociados a la artritis reumatoide [85].
- **Determinación simultánea de la quimiocina CXCL7 y la metaloproteinasa MMP3 como biomarcadores de la artritis reumatoide:** Los autores de este trabajo desarrollaron el primer inmunosensor electroquímico dual para la determinación simultánea de la quimiocina CXCL7 y la metaloproteinasa MMP3, dos biomarcadores relevantes para el diagnóstico

y seguimiento de la artritis reumatoide. El sistema utilizó microesferas magnéticas carboxiladas y electrodos de carbono serigrafiados duales, empleando un formato tipo sándwich con anticuerpos de captura y detección. La cuantificación se realizó mediante mediciones amperométricas de H_2O_2 mediadas por hidroquinona, obteniendo rangos lineales de 1 a 75 ng mL^{-1} para CXCL7 y de 2 a 2000 pg mL^{-1} para MMP3, con límites de detección de 0.8 ng mL^{-1} y 1.2 pg mL^{-1} , respectivamente. El inmunosensor fue aplicado exitosamente en muestras de suero de pacientes con artritis reumatoide [86].

Materiales y Métodos

6.1. Materiales y reactivos

6.1.0.1. Materiales Generales

- Balón de fondo plano de 100 mL (SCHOTT DURAN)
- Beakers de 200 mL, 100 mL, 50 mL y 25 mL
- Cajas Petri
- Pipetas de 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L y 2 μ L
- Tubos Falcon de 10 mL
- Tubos Falcon de 50 mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos Eppendorf de 2 mL

6.1.0.2. Reactivos

- Anticuerpo Monoclonal Anti 14-3-3 eta (Sino Biological Inc., China)
- Proteína recombinante 14-3-3 eta (Sino Biological Inc., China)
- Proteína recombinante SARS-CoV-2 (2019-nCoV) / Nucleocapsid-His (Sino Biological Inc., China)
- Proteína recombinante EBV GP350 protein (His Tag) (Sino Biological Inc., China)
- Proteína recombinante NS1 (Sino Biological Inc., China)
- BSA (Sigma-Aldrich, USA)
- Ácido 1-pirenebutírico (Toronto Research Chemicals (TRC, Canadá)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDC.HCL.)
- N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich, USA)

- MES sodium salt (Glentham Life Sciences, UK)
- Plata cloruro de plata (Ag/AgCl) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tinta de nanopartículas de plata (NovaCentrix, USA)
- Hidróxido de Sodio (NaOH) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ácido clorhídrico (HCL) (Sigma-Aldrich, USA)
- N,N-dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich, USA)

6.1.0.3. Equipos e Instrumentación

- Balanza analítica de precisión (WTC 2000, RADWAG Balances & Scales, USA)
- Microcentrífuga compacta (Mini-6K/7K, Biobase).
- Campana de extracción de gases (JPCEGH120PP-TOPA-A220, JPinglobal, USA)
- Sonicador de ultrasonido (Elmasonic Easy 60H, Elma, Suiza)
- Horno universal (UN110, Memmert, Alemania)
- Microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FE-SEM) (CLARA, TESCAN, USA)
- Sistema láser de CO₂ (VLS2.3DT, Universal Laser Systems, USA).
- Microscopio Raman DXR3 (DXR3, Thermo Fisher Scientific, USA).
- Potenciostato/Galvanostato PalmSens4 (PalmSens4, PalmSens, Países Bajos).

6.1.1. Presupuesto

ESTRUCTURA DEL BIONANOSENSOR				
ARTÍCULO	COSTO UNIDAD	CANTIDAD	UNIDAD	PRECIO SUBTOTAL
Base del bionanosensor	\$2.315	500	Bionanosensores	\$1.157.500
Tinta de nanopartículas de plata	\$99.486	1	Gramo	\$99.486
Pasta Plata Cloruro de Plata	\$25.159	2	Gramos	\$50.319
Anticuerpo	\$1.121.762	2	Unidades de 100 µL	\$2.243.460
Proteína recombinante	\$1.451.201	2	Unidades de 100 µg	\$2.902.320
TOTAL				\$6.453.085

Cuadro 6.1: Costos de materiales para la estructura del bionanosensor.

EQUIPOS			
NOMBRE	PRECIO/HORA	HORAS	PRECIO SUBTOTAL
Potenciostato/galvanostato PalmSens4	\$1.724	1.920	\$3.310.080
Recursos de laboratorio húmedo	\$4.760	300	\$1.428.000
Microscopio RAMAN	\$41.320	96	\$3.966.720
Microscopio electrónico de barrido Tescan Clara (FE-SEM)	\$152.310	48	\$7.310.880
TOTAL			\$16.015.680

Cuadro 6.2: Costos de uso de equipos.

6.2. Revisión bibliográfica y selección del biomarcador y matriz biológica

La primera fase metodológica consistió en la selección de la matriz biológica y del biomarcador mediante un enfoque estructurado basado en el uso de matrices de evaluación, con el fin de asegurar una elección fundamentada tanto en criterios clínicos como experimentales.

Inicialmente, se construyó una matriz comparativa de matrices biológicas, en la cual se evaluaron saliva, orina y sudor como posibles medios para la detección del biomarcador. Esta evaluación se realizó considerando criterios como la facilidad de obtención de la muestra, el grado de invasividad,

la estabilidad de los analitos en la matriz, la presencia de proteínas potencialmente interferentes y su compatibilidad con el desarrollo de un bionanosensor electroquímico. A cada alternativa se le asignó un puntaje con base en estos criterios, permitiendo identificar la matriz con mayor viabilidad para el propósito del estudio.

Posteriormente, se elaboró una matriz de posibles biomarcadores a partir de una revisión de la literatura científica, en la cual se recopilieron candidatos asociados a la artritis reumatoide y procesos inflamatorios relacionados. Para cada biomarcador se consolidó información relevante, incluyendo su relación con la enfermedad, rango de concentración reportado, características fisicoquímicas y su presencia en la matriz biológica seleccionada. Esta matriz permitió realizar una preselección de candidatos con potencial para ser detectados mediante técnicas electroquímicas.

Finalmente, se desarrolló una matriz de decisión en la que se integraron los criterios previamente definidos para evaluar de manera conjunta los biomarcadores en función de su pertinencia clínica y viabilidad experimental. En esta etapa se asignaron puntajes a cada candidato considerando aspectos como sensibilidad, especificidad, estabilidad, disponibilidad de elementos de reconocimiento y compatibilidad con el sistema de detección propuesto. Cada calificación fue respaldada por la evidencia reportada en la literatura y documentada en las notas asociadas a la matriz.

Este proceso estructurado permitió establecer, de manera objetiva y fundamentada, la combinación de matriz biológica y biomarcador empleada en el desarrollo experimental del biosensor.

6.3. Proceso de fabricación y funcionalización de los sensores

El presente trabajo se desarrolló sobre una plataforma de biosensado electroquímico previamente establecida en el Instituto iÓMICAS. La estrategia general de detección *label-free* mediante

EIS, el uso de anticuerpos inmovilizados sobre materiales carbonosos y el análisis de la respuesta electroquímica a partir de cambios en la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) se fundamentan en trabajos previos como el de Nidzworski et al. [87], quienes demostraron la viabilidad de inmunosensores impedimétricos ultrasensibles utilizando electrodos de diamante dopado con boro funcionalizados con anticuerpos para la detección del virus de la influenza. Posteriormente, Perdomo et al. adaptaron este enfoque a electrodos de carbono de bajo costo y desarrollaron el sistema SenSARS para el diagnóstico rápido de SARS-CoV-2. Asimismo, la fabricación del LIG sobre PI se apoyó en los fundamentos reportados por de la Roche et al. [88], [63].

Aunque la estrategia general de funcionalización se basó principalmente en el protocolo desarrollado en SenSARS [89], en este trabajo se introdujeron modificaciones importantes para adaptarlo a la detección de la proteína 14-3-3 eta. En particular, se empleó ácido PBA como molécula enlazadora no covalente, en lugar del PABA utilizado en SenSARS. Adicionalmente, se mantuvo el uso de la química de activación con EDC/NHS, pero con concentraciones, proporciones molares y condiciones experimentales ajustadas específicamente para favorecer la inmovilización del anticuerpo monoclonal anti-14-3-3 eta. También se modificaron los tiempos de incubación correspondientes a la etapa de activación superficial y a la inmovilización del anticuerpo, mientras que la etapa de bloqueo con BSA se conservó bajo condiciones equivalentes a las reportadas en SenSARS. Estas adaptaciones fueron necesarias debido a las diferencias en las características fisicoquímicas del biomarcador objetivo, del anticuerpo empleado y de la matriz biológica analizada.

En este contexto, la contribución original del presente trabajo consistió en adaptar y validar esta plataforma tecnológica para la detección electroquímica de la proteína 14-3-3 eta en saliva, con el propósito de explorar su potencial como herramienta no invasiva para el monitoreo de la actividad de la artritis reumatoide.

La fabricación de los bionanosensores electroquímicos se llevó a cabo mediante la obtención de electrodos de LIG sobre sustratos de poliimida tipo Kapton, seguida de etapas de modificación eléctrica, caracterización fisicoquímica y funcionalización química de la superficie con el fin de permitir el reconocimiento específico del biomarcador de interés.

6.3.1. Preparación del sustrato de poliimida

La preparación del sustrato de poliimida (Kapton de 125 μm de espesor) se realizó siguiendo el instructivo interno del laboratorio iÓMICAS, con el objetivo de garantizar condiciones adecuadas de limpieza y estabilidad térmica previas al proceso de impresión.

Inicialmente, el sustrato fue sometido a un proceso de curado térmico en horno a 150 °C durante 30 minutos, con el fin de eliminar tensiones residuales y mejorar la estabilidad del material. Posteriormente, se permitió su enfriamiento a temperatura ambiente sobre una superficie limpia.

A continuación, se realizó un proceso de limpieza mediante ultrasonido, en el cual los sustratos fueron sumergidos en alcohol isopropílico y sometidos a ultrasonido a 60 °C durante 10 minutos. Este paso permitió remover contaminantes superficiales y asegurar una adecuada interacción entre el láser y la superficie del polímero. Finalmente, los sustratos fueron secados en ambiente limpio y almacenados en condiciones controladas hasta su utilización.

6.3.2. Obtención de electrodos LIG

Los electrodos fueron obtenidos mediante irradiación láser directa sobre la superficie de PI utilizando un sistema de grabado láser ULS. Las condiciones de impresión se establecieron empleando una potencia de 4.8 W.

Previo a la impresión, se realizó la limpieza de la impresora, incluyendo las partes móviles con etanol al 70 % y los lentes ópticos mediante solución especializada, con el fin de asegurar la reproducibilidad del proceso. Asimismo, se realizó la calibración del sistema óptico mediante el ajuste de altura del lente.

Durante la impresión, el láser induce la carbonización de la PI, generando una estructura porosa de grafeno conductivo que conforma el electrodo de trabajo, el contraelectrodo y las pistas de conexión.

Adicionalmente, se fabricaron mascarillas mediante corte láser, las cuales fueron utilizadas para delimitar el área activa del sensor y evitar el contacto de las soluciones con las zonas de conexión eléctrica.

6.3.3. Modificación de contactos eléctricos y electrodo de referencia

Posterior a la impresión, los terminales eléctricos fueron recubiertos con tinta de plata conductiva, asegurando una adecuada conexión eléctrica entre el material grafénico y el sistema de medición. Este recubrimiento fue sometido a un proceso de curado térmico a 220 °C durante 30 minutos.

Posteriormente, el electrodo de referencia fue modificado mediante la aplicación de tinta de Ag/AgCl, seguido de un proceso de curado a 140 °C durante 30 minutos, con el fin de estabilizar su potencial electroquímico.

6.3.4. Ensamblaje y caracterización fisicoquímica

Una vez completada la modificación de los electrodos, se procedió a la adhesión de las mascarillas previamente fabricadas, definiendo el área activa de medición.

Los sensores fueron caracterizados mediante espectroscopía Raman en diferentes regiones de la superficie de LIG, con el fin de evaluar la homogeneidad del material y confirmar la formación de estructuras grafénicas. Para ello, se analizó la presencia y relación de las bandas características del grafeno, tales como las bandas D, G y 2D.

6.3.5. Caracterización electroquímica inicial

La caracterización electroquímica inicial de los sensores se realizó mediante voltametría cíclica (CV), con el objetivo de evaluar parámetros fundamentales como la capacitancia de la doble capa, el área electroactiva, la relación entre picos redox y la separación de potenciales (ΔE_p), indicadores clave del comportamiento electroquímico del sistema.

Inicialmente, se empleó solución tampón PBS para la estimación de la capacitancia de la doble capa. Para ello, se realizaron mediciones de CV en un rango de velocidades de barrido de 0.05 a

0.3 V/s (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3 V/s), registrando 5 ciclos por cada velocidad. Este procedimiento se repitió utilizando cuatro sensores diferentes por cada velocidad, con el fin de considerar la variabilidad entre dispositivos.

A partir de los voltamogramas obtenidos, se extrajo la corriente capacitiva en el potencial cercano a 0 V, identificando los valores de corriente anódica y catódica. Posteriormente, se calculó la diferencia entre ambas corrientes (ΔI) y se obtuvo un valor promedio para cada velocidad de barrido. Estos valores fueron graficados en función de la velocidad de barrido, obteniéndose una relación lineal cuya pendiente corresponde a la capacitancia de la doble capa del sistema, expresada en faradios.

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización en presencia de una solución redox de ferrocianuro/ferrocianuro, bajo las mismas condiciones de velocidad de barrido. A partir de estos voltamogramas, se determinaron los picos de oxidación y reducción, calculando la separación de potenciales (ΔE_p) como la diferencia entre ambos, así como la relación entre corrientes de pico anódico y catódico (I_{pa}/I_{pc}), la cual se espera cercana a la unidad para sistemas reversibles.

El área electroactiva del electrodo se estimó mediante la ecuación de Randles-Sevcik, considerando un proceso reversible:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

donde n corresponde al número de electrones transferidos ($n = 1$), A es el área electroactiva del electrodo (cm^2), D es el coeficiente de difusión ($0,00276 \text{ cm}^2/\text{s}$), C la concentración del analito ($2 \times 10^{-6} \text{ mol/cm}^3$) y v la velocidad de barrido (V/s).

Para la determinación de A , se graficó la corriente de pico (I_p) en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$), obteniendo una relación lineal. La pendiente de esta gráfica fue utilizada para calcular el área electroactiva del electrodo a partir de la ecuación de Randles-Sevcik.

Este conjunto de análisis permitió validar el comportamiento electroquímico de los sensores y establecer parámetros de referencia para las etapas posteriores de funcionalización.

6.4. Diseño experimental y selección de sensores

6.4.1. Variabilidad intrínseca de los sensores LIG

Los sensores de LIG presentan variabilidad intrínseca en su respuesta electroquímica incluso cuando son fabricados bajo condiciones nominalmente idénticas. Esta característica es consecuencia directa del proceso de formación del material: durante la irradiación láser sobre poliimida, el calentamiento localizado induce la carbonización del polímero y la liberación de especies gaseosas, generando una estructura tridimensional porosa cuya arquitectura varía según la distribución local de energía del haz. Lin et al. demostraron que este proceso produce películas de grafeno poroso con

heterogeneidades en el tamaño y distribución de poros, el grado de grafitización y la densidad de defectos, lo que se traduce en diferencias en el área electroactiva y en las propiedades eléctricas y electroquímicas del material [90].

Como consecuencia, sensores fabricados con los mismos parámetros de impresión pueden presentar diferencias apreciables en parámetros como la C_{dl} , R_{ct} , la corriente faradaica y la respuesta frente al analito. Todas las estrategias metodológicas descritas en las secciones siguientes, incluyendo la fabricación por lotes, la preselección de sensores, la normalización de la señal y el uso de múltiples métodos para el cálculo del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ), responden a esta limitación fundamental del material.

6.4.2. Fabricación por lotes independientes

Con el propósito de abordar explícitamente la variabilidad descrita en la sección anterior, los sensores fueron fabricados en lotes independientes en días diferentes. En todos los lotes se mantuvieron constantes los parámetros de impresión láser (potencia, velocidad y resolución), así como las etapas de limpieza, modificación de contactos, funcionalización química, condiciones de incubación y parámetros electroquímicos de medición. La única variable introducida entre lotes correspondió al momento de fabricación, lo que permitió evaluar tanto la variabilidad interlote como la intralote sobre el desempeño analítico del sistema.

En total se fabricaron dos lotes utilizados para construir curvas de calibración. El primer lote se destinó a una curva en el rango de 1 a 4 ng/mL de la proteína 14-3-3 η , seleccionado por encontrarse dentro del intervalo de concentraciones de interés clínico reportado en saliva. El segundo lote se empleó para una curva en el rango de 0.5 a 20 ng/mL, con el propósito de evaluar el comportamiento del biosensor tanto en concentraciones cercanas al límite inferior de detección como en niveles superiores al rango fisiopatológico esperado.

Este segundo lote fue también utilizado para los experimentos de reactividad cruzada y evaluación en saliva artificial, dado que el primer lote no contó con suficientes sensores remanentes para estas pruebas y no fue posible obtener posteriormente un lote con características electroquímicas suficientemente similares para garantizar comparaciones directas.

6.4.3. Caracterización inicial y criterios de preselección

Antes de su uso en etapas posteriores, todos los sensores fueron sometidos a una caracterización electroquímica inicial mediante EIS en presencia de la solución redox ferricianuro/ferrocianuro. A partir de esta caracterización se obtuvo la R_{ct} , empleada como parámetro principal para evaluar el comportamiento del electrodo.

Con base en esta caracterización y en la inspección visual de cada sensor, se aplicaron los siguientes criterios de exclusión:

- Valores atípicamente bajos de R_{ct} , asociados a cortocircuitos parciales, discontinuidades estructurales o diferencias significativas en el área electroactiva.

- Coloración excesivamente oscura o superficie con apariencia escamosa o irregular, indicativas de carbonización heterogénea y menor reproducibilidad electroquímica.

Los sensores que superaron la preselección fueron distribuidos según los objetivos experimentales de cada lote, tal como se describe en las secciones correspondientes.

6.4.4. Proceso de funcionalización química

Previo a la funcionalización, los sensores fueron sometidos a un proceso de limpieza electroquímica mediante voltametría cíclica en solución de NaOH 1 M, utilizando una ventana de potencial de -0.3 V a 0.3 V. Las mediciones se realizaron con una velocidad de barrido de 0.1 V/s y un incremento de potencial de 0.01 V. Se registraron 5 ciclos por cada medición, precedidos por un tiempo de equilibrio de 3 s con el fin de estabilizar el sistema electroquímico. Posteriormente, se realizó un enjuague con agua tipo I y secado a temperatura ambiente bajo condiciones controladas del laboratorio.

Con el fin de monitorear la evolución del sistema durante el proceso de funcionalización, para cada lote se seleccionaron tres bionanosensores de manera aleatoria, los cuales fueron caracterizados en cada etapa mediante EIS en presencia de una solución redox de ferricianuro/ferrocianuro 1 mM, en un rango de frecuencias comprendido entre 0.02 Hz y 10 kHz, con 39 puntos distribuidos logarítmicamente (6.7 puntos por década). Se aplicó una perturbación sinusoidal de 10 mV de amplitud alrededor del potencial de circuito abierto (OCP), utilizando un potencial de corriente continua de 0 V respecto a este.

El OCP fue monitoreado durante un tiempo máximo de 60 s previo a cada medición, con el fin de garantizar la estabilidad del sistema. Adicionalmente, se estableció un tiempo de equilibrio de 15 s antes de la adquisición de los espectros. Obteniendo valores de resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) como parámetro de seguimiento.

Posteriormente, se depositaron 3 μ L PBA a una concentración de 20 mM sobre el electrodo de trabajo, seguido de incubación durante 1 hora a 4 °C en caja de Petri. Luego, se realizó un lavado con agua tipo I y secado a temperatura ambiente, seguido de caracterización electroquímica.

A continuación, se llevó a cabo la activación química de la superficie mediante la deposición de 3 μ L de una solución de EDC/NHS (200 mM: 50 mM), incubando durante 20 minutos. Posteriormente, los bionanosensores fueron lavados con solución tampón MES y agua tipo I.

Seguidamente, se inmovilizó el anticuerpo anti-14-3-3 eta mediante la deposición de 4.5 μ L de una solución de anticuerpo a una concentración de 50 μ g/mL, incubando durante aproximadamente 18 horas en cámara húmeda. Tras la incubación, se realizó un lavado con PBS y agua tipo I, seguido de secado y caracterización electroquímica.

Posteriormente, se llevó a cabo el bloqueo de sitios no específicos mediante la deposición de 3 μL de BSA al 1 %, incubando durante 1 hora a 4 °C en cámara húmeda. Luego, los bionanosensores fueron lavados, secados y caracterizados mediante EIS.

Finalmente, se realizó la interacción con el analito mediante la deposición de 4.5 μL de proteína 14-3-3 eta sobre el electrodo de trabajo, incubando durante 20 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado final, secado y caracterización electroquímica mediante EIS en solución de ferricianuro/ferrocianuro.

Las mediciones correspondientes a la interacción con el analito se realizaron de acuerdo con la distribución establecida para cada lote, permitiendo la construcción de curvas de calibración independientes y la evaluación de la capacidad de cuantificación del bionanosensor tanto en condiciones controladas como en presencia de matriz de saliva.

6.4.5. Procesamiento de datos

Los datos electroquímicos obtenidos en cada etapa del proceso fueron exportados en formato Excel y posteriormente analizados mediante la herramienta computacional desarrollada en este trabajo.

6.5. Análisis de datos mediante herramienta computacional A&M EIS Studio

Con el objetivo de garantizar un procesamiento estandarizado, reproducible y coherente con el enfoque experimental del estudio, se desarrolló una herramienta computacional en Python para el análisis integral de los espectros de EIS.

La aplicación fue diseñada para automatizar el flujo de análisis desde la adquisición de los datos hasta la cuantificación del biomarcador, permitiendo reducir la variabilidad asociada al procesamiento manual y asegurar la consistencia en la interpretación de los resultados. En particular, la herramienta permite: (i) la importación de datos experimentales, (ii) el ajuste de espectros mediante modelos de circuitos equivalentes, (iii) la construcción de curvas de calibración y (iv) la cuantificación del analito basada en dichas curvas.

La herramienta recibe como entrada archivos en formato Excel (.xlsx) exportados directamente de los equipos PalmSens, los cuales contienen la información de frecuencia, componente real (Z') y componente imaginaria ($-Z''$) de la impedancia. Estos datos son procesados automáticamente, verificando la integridad de las columnas requeridas y eliminando valores no válidos.

El desarrollo de la aplicación se realizó empleando librerías científicas como NumPy, Pandas, SciPy y Matplotlib, junto con una interfaz gráfica desarrollada en Flet. El código completo de la herramienta se encuentra disponible en el archivo fuente desarrollado en Python.

6.5.1. Ajuste de espectros de impedancia

Los espectros EIS fueron ajustados mediante modelos de circuitos equivalentes previamente descritos en el marco teórico. La aplicación implementa diferentes configuraciones del circuito de Randles y sus extensiones, permitiendo representar los fenómenos electroquímicos asociados a la interfaz del sensor.

El ajuste se realizó mediante optimización no lineal por mínimos cuadrados, minimizando la diferencia entre los valores experimentales y los valores estimados por el modelo. La función objetivo empleada corresponde a:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-p} \sum \left(\frac{|Z_{exp} - Z_{fit}|}{|Z_{exp}|} \right)^2 \quad (6.1)$$

Adicionalmente, la calidad del ajuste fue evaluada mediante el coeficiente de determinación:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (y - y_{fit})^2}{\sum (y - \bar{y})^2} \quad (6.2)$$

A partir de este proceso, se obtuvo la respuesta simulada del sistema y los parámetros electroquímicos asociados a cada medición.

6.5.2. Extracción de parámetros electroquímicos

De los modelos ajustados se extrajeron los parámetros electroquímicos relevantes, particularmente la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}), la cual fue utilizada como variable analítica principal.

En el contexto de este trabajo, el valor de referencia o blanco corresponde al bionanosensor funcionalizado hasta la etapa de bloqueo con BSA, es decir, antes de la interacción con el analito. Este valor permite establecer una línea base que representa el estado inicial del sistema sin presencia del biomarcador.

6.5.3. Selección y validación del circuito equivalente

Con el fin de garantizar una interpretación adecuada de los espectros de impedancia electroquímica (EIS), se realizó una comparación sistemática de diferentes circuitos equivalentes utilizando los mismos espectros experimentales obtenidos durante las distintas etapas de funcionalización y detección del bionanosensor. El objetivo de este análisis fue identificar el modelo que ofreciera el mejor equilibrio entre calidad de ajuste, estabilidad numérica, interpretación física y comparabilidad

con la literatura.

Se evaluaron cuatro configuraciones de circuitos equivalentes: (i) circuito de Randles con capacitor ideal (Randles (C)), (ii) circuito de Randles modificado con un elemento de fase constante (Randles (CPE)), (iii) circuito de Randles con capacitor ideal y elemento de Warburg (Randles (C) + Warburg), y (iv) circuito de Randles con CPE y elemento de Gerischer (Randles (CPE) + Gerischer). Los ajustes se realizaron mediante algoritmos de optimización no lineal implementados en la aplicación desarrollada en Python, minimizando la diferencia entre los valores experimentales y los valores predichos por cada modelo.

La calidad del ajuste se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el estadístico χ^2 . El coeficiente de determinación permitió cuantificar la proporción de la variabilidad experimental explicada por el modelo, mientras que el estadístico χ^2 se utilizó como indicador del error residual global del ajuste. En general, valores de R^2 cercanos a 1 y valores bajos de χ^2 indican un ajuste adecuado.

Adicionalmente, se analizaron los diagramas de Nyquist y Bode, así como la estabilidad de los parámetros obtenidos, con el fin de verificar la consistencia física de cada modelo. La selección final del circuito equivalente se basó no solo en el desempeño estadístico, sino también en la interpretabilidad del parámetro de (R_{ct} , utilizado como señal analítica principal del biosensor).

Aunque se evaluaron modelos más complejos que incorporan elementos difusionales como Warburg y Gerischer, el circuito de Randles modificado con un elemento de fase constante (CPE) fue seleccionado como modelo principal para el análisis del biosensor. Esta decisión se fundamentó en que dicho modelo proporcionó una calidad de ajuste adecuada, una convergencia numérica robusta y una interpretación física directa del parámetro R_{ct} , manteniendo al mismo tiempo una estructura suficientemente simple para su aplicación sistemática en el procesamiento automatizado de los espectros.

6.6. Definición de la señal analítica y normalización

Esta sección define la variable de respuesta utilizada en todas las etapas posteriores del estudio. Es importante establecer estos conceptos antes de describir la construcción de las curvas de calibración, ya que todas las métricas analíticas del trabajo dependen de las definiciones aquí presentadas.

6.6.1. Fundamento de la señal: cambios en R_{ct}

El proceso de reconocimiento molecular entre el anticuerpo inmovilizado y la proteína 14-3-3 *eta* modifica las propiedades interfaciales del electrodo, alterando la transferencia electrónica del par redox ferricianuro/ferrocianuro y produciendo cambios cuantificables en R_{ct} . Si bien el valor absoluto de R_{ct} es altamente sensible a estos eventos de unión, su uso directo para comparar sensores presenta

limitaciones debido a las diferencias basales entre dispositivos LIG descritas en la Sección 6.4.1.

6.6.2. Señal analítica normalizada

Para reducir el efecto de la variabilidad intrínseca entre sensores, la señal primaria se definió como la variación relativa de R_{ct} respecto al valor del mismo sensor inmediatamente después del bloqueo con BSA. Este estado de referencia fue seleccionado porque representa la condición final del biosensor antes de la exposición al analito, incorporando ya todas las etapas de modificación superficial, activación química, inmovilización del anticuerpo y bloqueo de sitios de adsorción no específica.

La señal normalizada se calculó mediante:

$$\Delta R_{ct, \text{norm}} = \frac{R_{ct, \text{analito}} - R_{ct, \text{BSA}}}{R_{ct, \text{BSA}}} \quad (6.3)$$

donde:

- $R_{ct, \text{BSA}}$: resistencia de transferencia de carga medida inmediatamente después del bloqueo con BSA.
- $R_{ct, \text{analito}}$: resistencia de transferencia de carga medida después de la incubación con PBS, con la proteína 14-3-3 eta o con un interferente.

Esta normalización expresó la respuesta como un cambio relativo al comportamiento basal de cada sensor, reduciendo el impacto de las diferencias intrínsecas entre electrodos y facilitando la comparación entre réplicas dentro de un mismo lote.

6.6.3. Construcción y normalización de blancos

Para determinar el ruido basal del sistema, se construyó un conjunto de blancos procesados bajo condiciones equivalentes a las muestras con proteína. Dado que la incubación del analito se realizó depositando 4.5 μL de solución durante 20 minutos a 4 °C, los sensores blanco fueron sometidos al mismo tiempo de incubación pero con una gota de PBS sobre el electrodo de trabajo. Esto permitió evaluar la variación de la señal atribuible al tiempo de incubación, el manejo experimental y la exposición a la matriz tampón, sin presencia del biomarcador.

Para cada sensor blanco se realizaron dos mediciones consecutivas:

- Una medición inicial inmediatamente después del bloqueo con BSA ($R_{ct, \text{BSA}}$).
- Una segunda medición después de incubar PBS durante 20 minutos a 4 °C ($R_{ct, \text{PBS}, 20\text{min}}$).

Las señales del blanco se calcularon con las mismas expresiones definidas anteriormente:

$$\Delta R_{ct, \text{blanco}} = \frac{R_{ct, \text{PBS}, 20\text{min}} - R_{ct, \text{BSA}}}{R_{ct, \text{BSA}}} \quad (6.4)$$

$$\Delta R_{ct,blancoabs} = R_{ct,PBS,20min} - R_{ct,BSA} \quad (6.5)$$

donde $\Delta R_{ct,blanco}$ corresponde a la señal normalizada y $\Delta R_{ct,blancoabs}$ a la señal absoluta.

Estos valores constituyeron la población de referencia utilizada en los análisis estadísticos posteriores para estimar la media y la desviación estándar del ruido experimental del sistema.

6.7. Construcción de las curvas de calibración

Una vez definida la señal analítica (Sección 6.6) y seleccionados los sensores mediante los criterios de preselección (Sección 6.4.3), se procedió a construir las curvas de calibración. Dado que cada lote presentó características particulares asociadas a la heterogeneidad estructural del LIG, cada curva fue tratada como un sistema analítico independiente con su propia ecuación de calibración.

6.7.1. Protocolo de medición

Para cada concentración nominal se emplearon múltiples sensores independientes del mismo lote. Cada sensor fue funcionalizado según el protocolo establecido y caracterizado electroquímicamente mediante EIS antes y después de la incubación con la proteína. Los valores de R_{ct} se obtuvieron ajustando los espectros a modelos de circuitos equivalentes implementados en la herramienta computacional desarrollada en este trabajo. La señal analítica se calculó utilizando la expresión normalizada definida en la Sección 6.6.2.

6.7.2. Rangos de calibración evaluados

Se construyeron dos curvas de calibración independientes:

- **Curva 1 (Lote 1):** rango de 1 a 4 ng/mL, seleccionado por corresponder al intervalo de concentraciones de interés clínico reportado en saliva para la proteína 14-3-3 eta.
- **Curva 2 (Lote 2):** rango de 0.5 a 20 ng/mL, con el propósito de evaluar el comportamiento del biosensor en concentraciones cercanas al límite inferior de detección y en niveles superiores al rango fisiopatológico esperado.

6.7.3. Ajuste lineal y evaluación de la calidad del modelo

Para cada concentración se calcularon el valor promedio de la señal analítica, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV %). Los valores promedio fueron graficados en función de la concentración nominal y ajustados mediante regresión lineal simple:

$$y = mx + b \quad (6.6)$$

donde:

- y : señal analítica normalizada ($\Delta R_{ct, \text{norm}}$).
- x : concentración nominal de la proteína 14-3-3 eta (ng/mL).
- m : pendiente de la recta; representa la sensibilidad analítica del biosensor.
- b : intercepto de la curva.

La calidad del ajuste lineal fue evaluada mediante el coeficiente de determinación (R^2), el análisis visual de los residuos y la coherencia de la tendencia con el comportamiento esperado del sistema. La pendiente de cada curva fue posteriormente utilizada para determinar el LOD y el LOQ.

6.7.4. Análisis estadístico complementario

Con el fin de fortalecer la evaluación estadística del desempeño analítico del biosensor, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para cada curva de calibración. Este análisis permitió determinar si la concentración de la proteína 14-3-3 η tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta electroquímica normalizada del sensor.

El ANOVA se aplicó utilizando los valores individuales de $\Delta R_{ct, \text{norm}}$ obtenidos para cada sensor, y no los promedios por concentración, debido a que las réplicas individuales representan la unidad experimental del análisis. Para cada curva se compararon los grupos correspondientes al blanco y a las concentraciones evaluadas. Se empleó un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Adicionalmente, para cada concentración se calcularon la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación porcentual (CV %) y el error estándar de la media (SEM), definido como:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (6.7)$$

donde SD corresponde a la desviación estándar y n al número de sensores evaluados por concentración. Estos parámetros permitieron describir la dispersión experimental, la repetibilidad de la respuesta y la incertidumbre asociada al valor promedio reportado.

6.8. Determinación del LOD y el LOQ

El límite de detección (LOD) corresponde a la concentración más baja del analito que puede diferenciarse de manera confiable del blanco, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja que puede medirse con precisión y exactitud suficientes para ser reportada cuantitativamente [91, 92].

Debido a la variabilidad intrínseca de los sensores LIG, no se consideró adecuado depender de un único criterio para estimar estos parámetros. En su lugar, se implementaron cuatro metodologías complementarias que evaluaron la sensibilidad analítica desde diferentes perspectivas. Todas las

metodologías se aplicaron de manera independiente a las dos curvas de calibración, utilizando la pendiente y el intercepto específicos de cada lote.

6.8.1. Método 1: Relevancia estadística

Este método comparó estadísticamente el grupo blanco con cada concentración de la curva de calibración. Cada concentración fue comparada con el blanco mediante una prueba t de Student de dos colas para muestras independientes con varianzas desiguales (prueba de Welch), con las siguientes hipótesis:

- H_0 : la media de la concentración evaluada es igual a la media del blanco.
- H_1 : la media de la concentración evaluada es diferente a la media del blanco.

Se adoptó un nivel de significancia $\alpha = 0,05$. El LOD correspondió a la concentración más baja con $p < 0,05$; el LOQ a la concentración más baja con $p < 0,05$ y $CV \leq 20\%$.

6.8.1.1. Criterios operativos de detectable y cuantificable

Como complemento a los métodos de cálculo, se establecieron criterios operativos para clasificar cada concentración de la curva:

- **Detectable:** $p < 0,05$ en la comparación frente al blanco.
- **Cuantificable:** $p < 0,05$ y $CV \leq 20\%$.

El umbral de $CV \leq 20\%$ se seleccionó de acuerdo con recomendaciones ampliamente aceptadas en validación bioanalítica para concentraciones cercanas al límite inferior del rango de trabajo (FDA, 2018; EMA, 2011). Bajo estos criterios, el LOD experimental se definió como la concentración más baja clasificada como detectable, y el LOQ experimental como la más baja clasificada como cuantificable.

6.8.2. Método 2: Blancos normalizados (ICH Q2)

Siguiendo el enfoque de la guía ICH Q2(R2), el LOD y el LOQ se calcularon a partir de la desviación estándar de los blancos normalizados y la pendiente de la curva de calibración [93]:

$$y_{\text{LOD}} = \bar{x}_{\text{blanco,norm}} + 3\sigma_{\text{blanco,norm}} \quad (6.8)$$

$$y_{\text{LOQ}} = \bar{x}_{\text{blanco,norm}} + 10\sigma_{\text{blanco,norm}} \quad (6.9)$$

Transformando a unidades de concentración con la ecuación de calibración:

$$x = \frac{y - b}{m} \quad (6.10)$$

se obtuvieron las siguientes expresiones:

$$LOD = \frac{\bar{x}_{\text{blanco,norm}} + 3\sigma_{\text{blanco,norm}} - b}{m} \quad (6.11)$$

$$LOQ = \frac{\bar{x}_{\text{blanco,norm}} + 10\sigma_{\text{blanco,norm}} - b}{m} \quad (6.12)$$

Este enfoque es especialmente adecuado para biosensores con alta variabilidad intersensor, ya que considera el ruido experimental después de corregir las diferencias basales entre dispositivos.

6.8.3. Método 3: Desviación estándar residual de la regresión

En este método, la desviación estándar de la respuesta (σ) se estimó a partir de los residuos de la regresión lineal, calculados como la diferencia entre los valores experimentales y los valores predichos por la curva de calibración. Posteriormente, los límites de detección y cuantificación se calcularon mediante:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{m} \quad (6.13)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad (6.14)$$

Este enfoque incorpora la incertidumbre asociada al ajuste de la curva de calibración mediante la desviación estándar de los residuos, reflejando la concordancia entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo. De esta manera, la estimación del LOD y LOQ se fundamenta en el desempeño global de la regresión y no únicamente en la variabilidad del blanco.

6.8.4. Interpretación comparativa de los tres métodos

Los tres métodos descritos deben entenderse como complementarios, no como procedimientos mutuamente excluyentes. Cada uno evalúa un aspecto distinto del desempeño analítico:

- **Método 1 (relevancia estadística):** estimación experimental directa basada en los datos observados; vincula significancia estadística con precisión experimental.
- **Método 2 (blancos normalizados):** refleja la sensibilidad del sistema una vez controlada la principal fuente de dispersión (variabilidad basal entre sensores).
- **Método 3 (Residual de la regresión):** incorpora la incertidumbre global del modelo lineal; útil para comparar curvas con distintas pendientes o rangos.

La comparación entre metodologías evidencia que el LOD y el LOQ no son parámetros absolutos, sino métricas que dependen del modelo matemático empleado, del tratamiento de la señal, de la dispersión del blanco y de la incertidumbre de la curva. Esta estrategia multifactorial es consistente con

las recomendaciones de la IUPAC y la ICH, que reconocen la validez de múltiples enfoques y señalan que la selección del método debe responder a las características particulares del sistema analítico.

En el presente trabajo, las tres metodologías fueron aplicadas para obtener una visión integral del desempeño del biosensor, no para seleccionar arbitrariamente el valor más favorable.

6.9. Evaluación de especificidad: reactividad cruzada

La especificidad constituye uno de los parámetros más relevantes en la validación de biosensores, ya que refleja la capacidad del elemento de reconocimiento biológico para responder preferentemente frente al analito objetivo, minimizando la interferencia de otras moléculas presentes en la muestra (ICH, 2023; FDA, 2018).

6.9.1. Selección de interferentes y protocolo

La evaluación de reactividad cruzada se llevó a cabo con cuatro interferentes: albúmina sérica bovina (BSA), empleada como control de adsorción no específica, y proteínas asociadas a los virus del dengue, SARS-CoV-2 y Epstein-Barr (EBV). Estos analitos fueron seleccionados con base en su disponibilidad experimental y su capacidad para representar moléculas biológicas potencialmente presentes en matrices complejas.

Para cada interferente se emplearon tres sensores independientes ($n = 3$), número definido en función de la disponibilidad limitada de estas proteínas y de los sensores remanentes en el lote. Todos los sensores pertenecieron al Lote 2 (curva 0.5–20 ng/mL). Cada interferente fue preparado y aplicado siguiendo el mismo protocolo utilizado para la proteína 14-3-3 eta: 4.5 μ L de solución depositados sobre el electrodo de trabajo e incubados durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, los sensores fueron lavados, secados y caracterizados mediante EIS. La señal analítica se calculó con la misma metodología descrita en la Sección 6.6.

6.9.2. Criterio de comparación e interpretación

La respuesta de cada interferente fue comparada con la señal generada por la proteína 14-3-3 eta a 3.8 ng/mL, concentración asociada a pacientes con artritis reumatoide activa según la literatura. Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar. Una respuesta significativamente menor para los interferentes respecto al biomarcador fue interpretada como evidencia de especificidad del bionanosensor y de baja reactividad cruzada.

6.10. Prueba de concepto en saliva artificial

Con el propósito de evaluar preliminarmente la capacidad del bionanosensor para mantener su desempeño analítico en una matriz compleja, se realizaron experimentos de detección de la proteína

14-3-3 eta en saliva artificial.

La saliva artificial utilizada en este estudio se preparó con el fin de simular las condiciones iónicas y químicas de la saliva humana, permitiendo evaluar el desempeño del bionanosensor en una matriz compleja bajo condiciones controladas. La formulación se basó en una composición reportada en la literatura con pH 7.2 [94].

La solución estuvo compuesta por NaCl (4.29 mM), KCl (17.98 mM), CaCl₂ (1.10 mM), MgCl₂ (0.08 mM), H₂SO₄ (0.50 mM), NaHCO₃ (3.27 mM) y urea (3.33 mM), todos disueltos en agua tipo I. Debido a que no se disponía de Na₃PO₄ (3.90 mM), este fue reemplazado por una mezcla equimolar de NaH₂PO₄·H₂O y Na₂HPO₄, ambos a 1.95 mM, con el fin de mantener la capacidad amortiguadora del sistema fosfato.

Los reactivos fueron disueltos bajo agitación magnética y el pH se ajustó a 7.2 cuando fue necesario. La solución se almacenó a 4 °C hasta su utilización en la preparación de muestras fortificadas con la proteína 14-3-3 η .

6.10.1. Concentraciones evaluadas y protocolo

Se evaluaron dos concentraciones de la proteína 14-3-3 eta en saliva artificial: 1 ng/mL, por encontrarse cercana al límite inferior del rango de interés, y 3.8 ng/mL, por corresponder al valor clínicamente relevante reportado en la literatura para pacientes con artritis reumatoide activa.

Para cada concentración se preparó saliva artificial dopada con la cantidad correspondiente de proteína recombinante. Se depositaron 4.5 μ L de muestra sobre cada bionanosensor funcionalizado y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C, reproduciendo las condiciones de las etapas anteriores. Después de la incubación, los bionanosensores fueron lavados, secados y caracterizados por EIS. La señal analítica se calculó con la misma estrategia de normalización descrita en la Sección 6.6.2.

Todas las pruebas se realizaron con sensores del Lote 2, dado que el Lote 1 no contó con sensores suficientes para experimentos adicionales. Las concentraciones fueron estimadas empleando la ecuación de calibración de la Curva 2.

6.10.2. Criterios de evaluación

Para cada nivel de concentración se calcularon el promedio, la desviación estándar y el error relativo respecto al valor nominal esperado. La cercanía entre la concentración teórica y la cuantificada fue interpretada como evidencia preliminar de la capacidad del biosensor para operar en una matriz compleja y estimar concentraciones clínicamente relevantes del biomarcador. Esta etapa constituyó una prueba de concepto y no una validación clínica formal.

6.11. Limitaciones del estudio

A pesar de las estrategias implementadas para reducir la variabilidad y fortalecer la robustez del método analítico, el estudio estuvo sujeto a diversas limitaciones experimentales que deben considerarse al interpretar los resultados y al extrapolar el desempeño del biosensor a escenarios clínicos.

La variabilidad estructural del LIG, aunque mitigada mediante preselección y normalización, no pudo eliminarse completamente. En consecuencia, los parámetros analíticos obtenidos, incluyendo la pendiente de las curvas de calibración y los valores de LOD y LOQ, deben interpretarse como estimaciones dependientes del lote y de las condiciones experimentales específicas evaluadas.

La disponibilidad limitada de sensores funcionales condicionó el diseño experimental. La fabricación y funcionalización de sensores LIG presenta una tasa de descarte considerable, lo que restringió el número de réplicas disponibles para los experimentos de reactividad cruzada ($n = 3$ por interferente) y concentró las pruebas complementarias en el Lote 2. No fue posible obtener un lote adicional con características electroquímicas suficientemente similares para realizar comparaciones directas con el Lote 1.

La disponibilidad limitada de algunas proteínas interferentes redujo el número de réplicas en los ensayos de reactividad cruzada. Estudios futuros deberán ampliar tanto el número de repeticiones como la diversidad de proteínas potencialmente interferentes evaluadas.

La evaluación en saliva artificial constituyó una prueba de concepto y no una validación clínica. Esta matriz no incorpora la variabilidad biológica, la complejidad proteómica ni los posibles efectos de degradación presentes en muestras reales. Los resultados de esta etapa deben interpretarse como evidencia preliminar de viabilidad técnica.

Finalmente, los valores de LOD y LOQ reportados no deben considerarse constantes universales del sistema. Estos parámetros dependen del lote de sensores, del rango de calibración, del método de procesamiento de la señal y de la metodología empleada para su estimación, característica especialmente relevante en biosensores basados en materiales heterogéneos como el LIG.

Nota. A pesar de estas limitaciones, el diseño experimental implementado proporcionó una base metodológica sólida para evaluar el desempeño analítico del bionanosensor y demostrar su capacidad preliminar para detectar y cuantificar la proteína 14-3-3 ϵ en condiciones controladas y en matrices complejas.

Resultados y Discusión

7.1. Revisión bibliográfica y selección del biomarcador y matriz biológica

Cuadro 7.1: Matriz de decisión para la selección del biomarcador y la matriz biológica para el desarrollo del bionanosensor.

Criterio		Orina						Sudor				Saliva			
Parámetro	Peso	CTX-II	Glc-Gal-PYD	sCD14	IL-6	ORM2	miRNA-146a	PCR	IL-6	Calprotectina	Vimentina	14-3-3	ETA	GRP78/BiP	Anti-CCP
Especificidad	22.0 %	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	3	3	3
Sensibilidad	22.0 %	1	1	3	2	3	1	1	1	1	3	3	2	3	1
Matriz	18.67 %	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3
Disponibilidad de anticuerpos	18.67 %	0	0	3	3	3	0	3	3	2	3	3	1	1	0
Disponibilidad comercial	18.67 %	0	0	3	2	3	0	1	2	1	1	2	1	1	0
Puntaje total		0.62666	0.62666	2.40662	1.99996	2.40662	0.62666	1.55996	1.74662	1.37330	2.40662	2.59328	2.03330	1.43998	

Cuadro 7.2: Comparación multicriterio de matrices biológicas para la selección de la muestra más apropiada.

Criterio	Orina	Sudor	Saliva
Fácil adquisición (11.67 %)	2	1	3
Proteínas interferentes (25.00 %)	2	1	3
Enzimas degenerativas (20.00 %)	2	3	1
pH (11.67 %)	1	2	3
Metabolitos y contaminantes (20.00 %)	1	2	3
Dieta e hidratación (11.67 %)	1	2	3
Puntaje total	1.57	1.83	2.60

La evaluación comparativa de las matrices biológicas mostró que la saliva obtuvo el mayor puntaje ponderado (2.60), superando al sudor (1.83) y a la orina (1.57) (Cuadro 7.2). Este resultado se atribuye a su carácter no invasivo, facilidad de recolección y compatibilidad con el monitoreo frecuente, características que la convierten en una matriz adecuada para el seguimiento de pacientes con artritis reumatoide.

Posteriormente, la matriz de decisión para biomarcadores indicó que la proteína 14-3-3 ϵ en saliva presentó el puntaje total más alto (2.59328), por encima de otros candidatos evaluados (Cuadro 7.1). Este biomarcador destacó por su relevancia clínica, su presencia en saliva y la disponibilidad de anticuerpos y reactivos comerciales para su detección.

En conjunto, estos resultados sustentaron la selección de la combinación saliva-14-3-3 ϵ como la alternativa más adecuada para el desarrollo del bionanosenso electroquímico propuesto.

7.2. Proceso de fabricación y funcionalización de los bionanosensores

La Figura 7.1 presenta los bionanosensores de grafeno inducido por láser fabricados y empleados durante el desarrollo experimental. Se observa la configuración de tres electrodos, la cual permitió realizar las etapas de funcionalización superficial y las mediciones electroquímicas necesarias para la detección de la proteína 14-3-3 ϵ .



Figura 7.1: Bionanosensores de grafeno inducido por láser (LIG).

7.3. Caracterización fisicoquímica

La caracterización estructural del grafeno inducido por láser (LIG) se realizó mediante espectroscopía Raman en 3 sensores del lote 1 con el fin de evaluar el grado de defectos, el número de

capas y la calidad estructural del material obtenido.

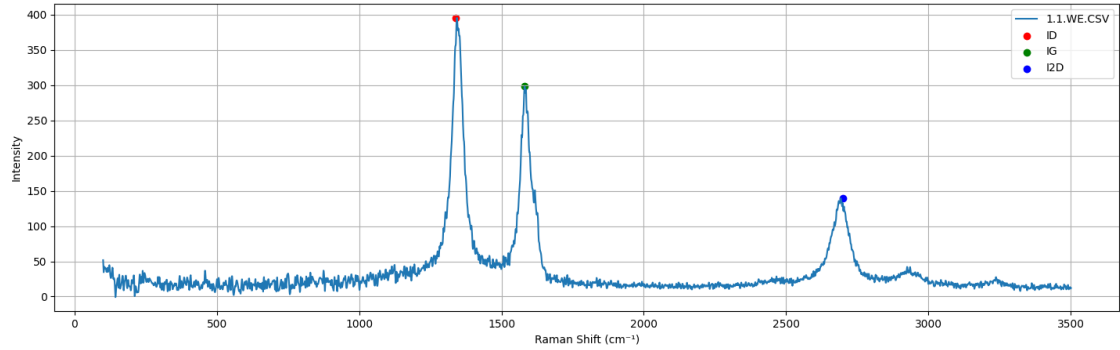


Figura 7.2: Espectro Raman de los bionanosensores LIG.

En el espectro se identificaron las bandas D, G y 2D, típicas de materiales grafénicos. La banda D se asocia con defectos estructurales y bordes del material, la banda G corresponde a la vibración de los enlaces sp^2 , y la banda 2D proporciona información sobre el número de capas y el grado de orden estructural.

Cuadro 7.3: Parámetros Raman promedio obtenidos para tres bionanosensores LIG.

Sensor	I_D	I_G	I_{2D}	I_D/I_G	I_{2D}/I_G	L_a (nm)
1.1	$296,01 \pm 140,66$	$270,39 \pm 39,29$	$119,81 \pm 27,93$	$1,07 \pm 0,37$	$0,44 \pm 0,04$	$19,11 \pm 6,54$
1.2	$273,05 \pm 9,50$	$221,90 \pm 25,58$	$98,56 \pm 7,69$	$1,24 \pm 0,19$	$0,45 \pm 0,02$	$15,66 \pm 2,35$
1.3	$230,60 \pm 16,89$	$253,54 \pm 22,54$	$113,64 \pm 20,39$	$0,91 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,04$	$21,12 \pm 0,33$
Promedio global	$266,55 \pm 70,09$	$248,61 \pm 32,01$	$110,67 \pm 18,62$	$1,07 \pm 0,24$	$0,44 \pm 0,03$	$18,63 \pm 3,97$

Los parámetros obtenidos se resumen en la Tabla 7.3. La relación I_D/I_G presentó un valor promedio de 1.07 ± 0.24 , indicando una elevada densidad de defectos, característica típica del grafeno inducido por láser. La relación I_{2D}/I_G fue de 0.44 ± 0.03 , lo que sugiere la formación de grafeno multicapa. A partir de estos resultados se estimó un tamaño promedio de cristalito lateral (L_a) de 18.63 ± 3.97 nm.

La desviación estándar observada entre los 3 bionanosensores evidencia una variabilidad inherente al proceso de fabricación, atribuible a pequeñas diferencias locales en la distribución de energía del láser y en la carbonización de la poliimida. Sin embargo, los valores se mantuvieron dentro de rangos consistentes, indicando que los bionanosensores presentan una estructura fisicoquímica comparable.

7.4. Caracterización electroquímica inicial

La caracterización electroquímica inicial de los bionanosensores LIG se realizó mediante voltametría cíclica con el fin de evaluar su capacidad de almacenamiento de carga, el área electroactiva y la eficiencia en la transferencia electrónica antes del proceso de funcionalización. Para ello, se analizaron los bionano sensores en solución tampón PBS y en presencia del sistema redox ferricianuro/ferrocianuro a diferentes velocidades de barrido.

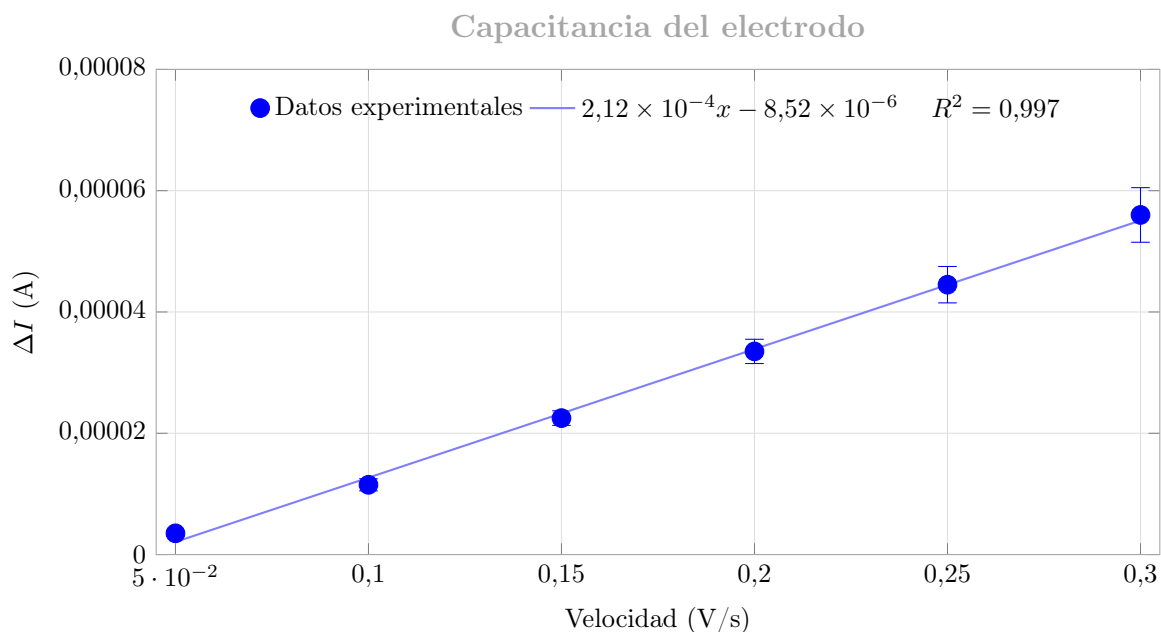


Figura 7.3: Relación entre la diferencia de corriente capacitiva (ΔI) y la velocidad de barrido utilizada para la estimación de la capacitancia de doble capa del electrodo.

En PBS, la diferencia entre las corrientes anódica y catódica mostró una relación lineal con la velocidad de barrido (Figura 7.3), con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,997$. La pendiente de la regresión lineal fue $2,12 \times 10^{-4} \text{ A V}^{-1} \text{ s}$, a partir de la cual se calculó una capacitancia de doble capa de 0.212 mF. Este valor confirma la presencia de una interfaz electrodo-electrolito con alta capacidad de acumulación de carga, consistente con la estructura tridimensional porosa del LIG.

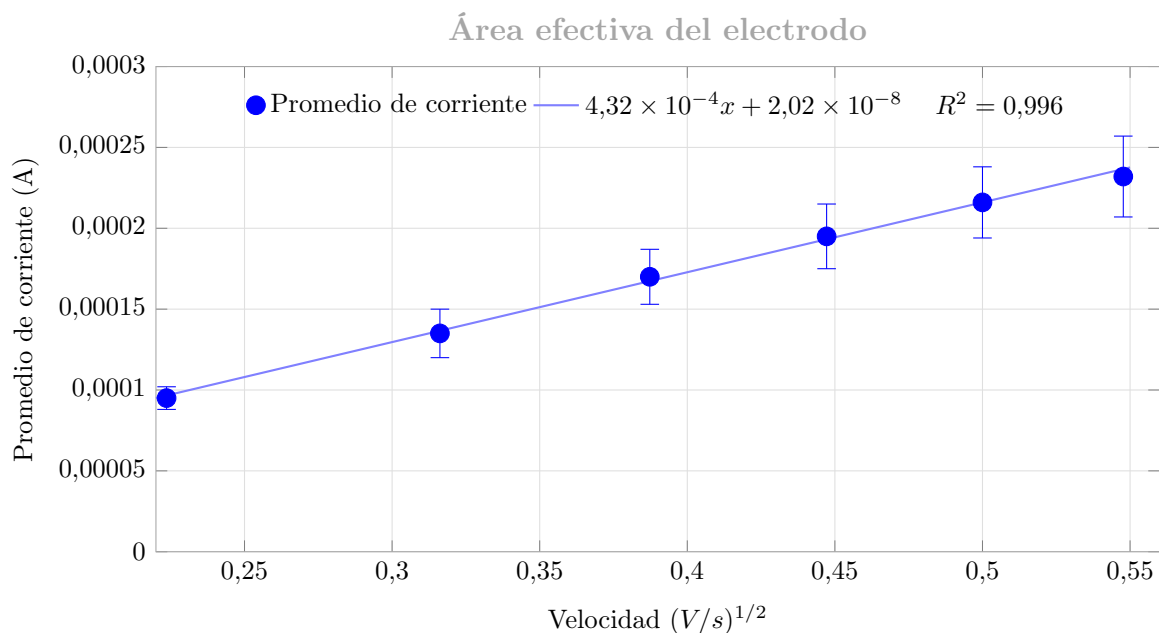


Figura 7.4: Relación entre la corriente de pico de oxidación y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido utilizada para la estimación del área electroactiva del electrodo mediante la ecuación de Randles–Sevcik.

Cuadro 7.4: Valores de área efectiva y área geométrica de los sensores LIG

Parámetro	Valor
Área electroactiva	0.291 cm ²
Área geométrica	0.175 cm ²

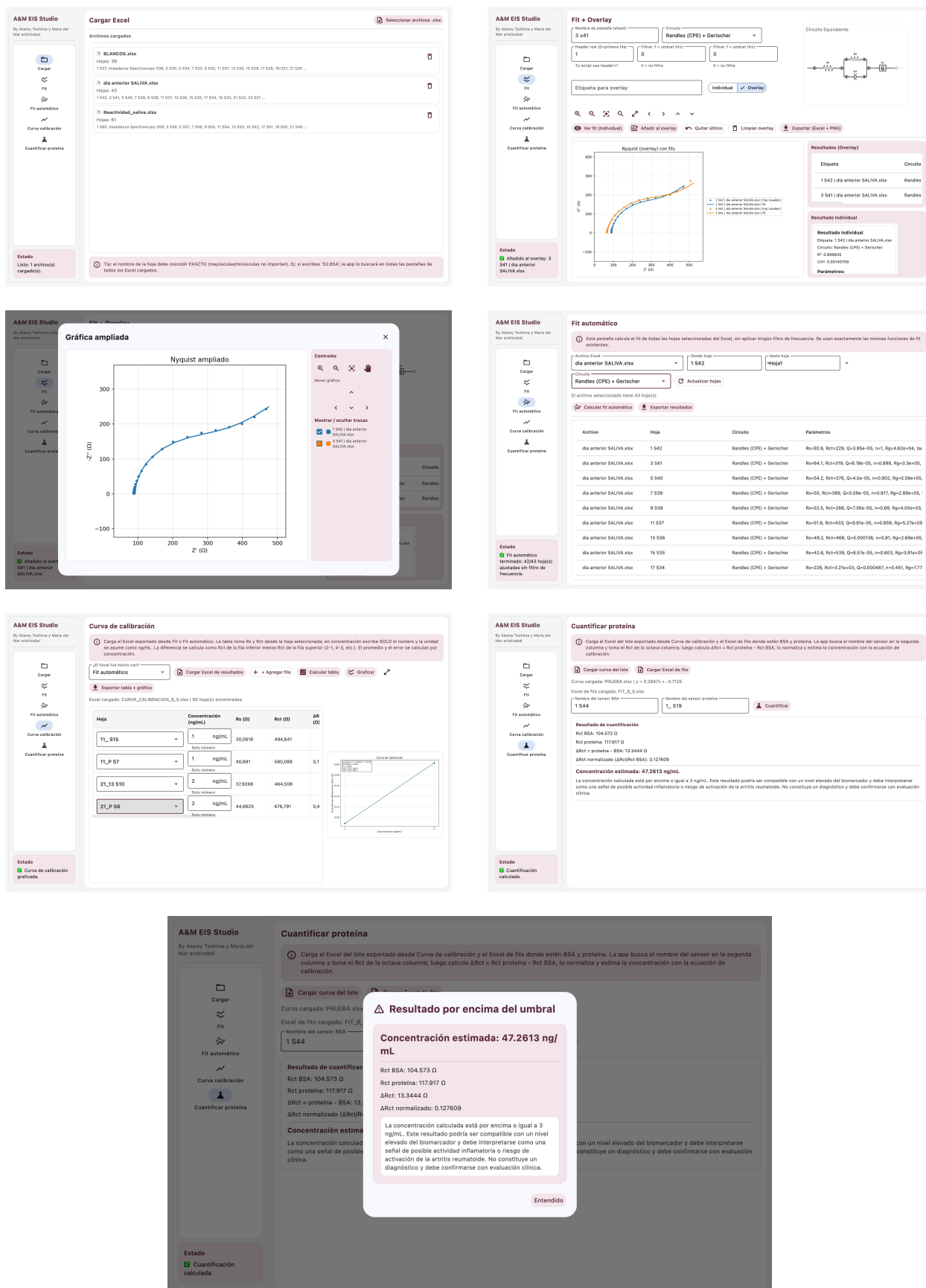
En presencia del par redox ferricianuro/ferrocianuro, la corriente de pico aumentó linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 7.4), con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,996$. A partir de la pendiente de esta relación y de la ecuación de Randles–Sevcik, se estimó un área electroactiva de 0.291 cm², aproximadamente 1.66 veces mayor que el área geométrica del electrodo (0.175 cm²). Este resultado evidencia que la estructura porosa del LIG incrementa significativamente la superficie disponible para la transferencia electrónica y para la inmovilización de biomoléculas.

Cuadro 7.5: Separación entre potenciales de oxidación y reducción y relación entre corrientes de pico para diferentes velocidades de barrido en presencia del sistema ferricianuro/ferrocianuro.

Velocidad de barrido (V/s)	ΔE_p (mV)	$ I_{pa}/I_{pc} $
0.05	173.53	0.99
0.10	234.78	0.97
0.15	285.81	0.96
0.20	326.64	0.95
0.25	367.47	0.94
0.30	387.89	0.94

La separación entre los potenciales de oxidación y reducción (ΔE_p) aumentó desde 173.53 mV hasta 387.89 mV al incrementar la velocidad de barrido de 0.05 a 0.30 V/s. Estos valores son superiores al valor teórico esperado para un sistema reversible, lo que indica un comportamiento cuasirreversible. A pesar de ello, la relación entre las corrientes de pico anódico y catódico se mantuvo cercana a la unidad en magnitud ($|I_{pa}/I_{pc}| = 0,94\text{--}0,99$), lo que confirma una respuesta electroquímica estable y reproducible.

En conjunto, estos resultados demuestran que los sensores de grafeno inducido por láser presentan una elevada capacitancia interfacial, un área electroactiva significativamente superior al área geométrica y una transferencia electrónica eficiente frente al sistema ferricianuro/ferrocianuro.

Figura 7.5: Interfaces principales de la aplicación *A&M EIS Studio*.

7.4.1. Desarrollo de la aplicación para el análisis automatizado de datos electroquímicos

Como complemento al desarrollo experimental del biosnanoensensor, se diseñó una aplicación de escritorio denominada *A&M EIS Studio*, desarrollada en Python con el objetivo de automatizar el procesamiento de datos de EIS, reducir errores asociados al análisis manual y facilitar la interpretación de los resultados obtenidos durante la investigación.

La aplicación integra diferentes módulos que permiten realizar de manera secuencial las etapas principales del análisis electroquímico. En primer lugar, incluye una interfaz para la carga y organización de archivos en formato Excel provenientes del potenciostato. Posteriormente, permite la visualización de diagramas de Nyquist y el ajuste de los datos experimentales a distintos circuitos equivalentes, entre ellos Randles, Randles con elemento de fase constante (CPE), Randles con Warburg y Randles con Gerischer. Asimismo, incorpora un módulo de ajuste automático que procesa múltiples archivos de manera simultánea y extrae parámetros electroquímicos como la R_s , R_{ct} , el parámetro del CPE (Q), el exponente n y los parámetros asociados al elemento de Gerischer.

Adicionalmente, la aplicación cuenta con un módulo para la construcción de curvas de calibración, en el cual se calculan automáticamente los promedios, desviaciones estándar, regresión lineal, R^2 , pendiente, intercepto, LOD y LOQ. Finalmente, se desarrolló un módulo de cuantificación que permite estimar la concentración del biomarcador 14-3-3 eta en muestras desconocidas a partir de la ecuación de calibración correspondiente al lote de sensores analizado. Este módulo compara la respuesta del sensor incubado con proteína frente a su respectivo blanco con BSA y genera una interpretación preliminar del resultado.

La Figura 7.4 presenta las principales interfaces de la aplicación, incluyendo el (1) Módulo de carga de archivos Excel. (2–4) Herramientas para ajuste individual, superposición y procesamiento automático de datos de espectroscopía de impedancia electroquímica. (5–6) Visualización detallada de resultados y parámetros electroquímicos. (7) Módulo de cuantificación del biomarcador 14-3-3 η a partir de la curva de calibración del lote correspondiente.

El desarrollo de esta herramienta constituyó un aporte adicional del presente trabajo, ya que permitió estandarizar el análisis de datos electroquímicos, disminuir significativamente el tiempo de procesamiento y facilitar la implementación de una metodología reproducible para la caracterización y cuantificación del biomarcador propuesto.

7.4.2. Selección del circuito equivalente

Con el fin de justificar el modelo electroquímico empleado para el ajuste de los espectros de impedancia electroquímica, se compararon cuatro circuitos equivalentes utilizando los mismos espectros experimentales obtenidos a lo largo del estudio: Randles (C), Randles (CPE), Randles (C) + Warburg y Randles (CPE) + Gerischer. Para cada modelo se evaluó la calidad del ajuste mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el estadístico χ^2 .

El circuito Randles (C) presentó el desempeño más limitado, con un R^2 promedio de 0.910 y un χ^2 promedio de 0.0319, lo que evidencia que un capacitor ideal no describe adecuadamente la naturaleza altamente porosa y heterogénea del grafeno inducido por láser (LIG). La incorporación

de un elemento de fase constante (CPE) mejoró significativamente la calidad del ajuste, alcanzando un R^2 promedio de 0.976 y un χ^2 promedio de 0.0073, lo cual confirma el comportamiento capacitivo no ideal del material.

Los modelos que incorporaron elementos difusionales mostraron el mejor desempeño estadístico. El circuito Randles (C) + Warburg alcanzó un R^2 promedio de 0.9968 y un χ^2 promedio de 0.0053. No obstante, el mejor ajuste global se obtuvo con el circuito Randles (CPE) + Gerischer, que presentó un R^2 promedio de 0.9980 y el valor más bajo de χ^2 (0.0014). Estos resultados indican que este modelo fue el más adecuado para describir el comportamiento electroquímico del sistema, al incorporar simultáneamente el comportamiento capacitivo no ideal de la interfaz y los procesos acoplados de transferencia de carga y difusión característicos de materiales porosos como el LIG.

Con base en estos resultados, el circuito Randles (CPE) + Gerischer fue seleccionado como modelo principal para el procesamiento de los espectros EIS y la extracción del parámetro de R_{ct} , utilizado como variable analítica para la construcción de las curvas de calibración y la cuantificación de la proteína 14-3-3 eta. La superioridad de este modelo sugiere que la respuesta electroquímica del biosensor no puede describirse únicamente mediante un circuito de Randles convencional, sino que requiere considerar la complejidad estructural y los fenómenos de transporte presentes en la arquitectura tridimensional del grafeno inducido por láser.

Cuadro 7.6: Comparación del desempeño de los circuitos equivalentes evaluados para el ajuste de los espectros EIS.

Circuito equivalente	n	R^2 promedio	χ^2 promedio	Selección
Randles (C)	37	0.9100	0.0319	No
Randles (CPE)	37	0.9764	0.0073	No
Randles (C) + Warburg	37	0.9968	0.0053	No
Randles (CPE) + Gerischer	74	0.9980	0.0014	Sí

7.5. Funcionalización de la superficie LIG

7.5.1. Seguimiento electroquímico del proceso de funcionalización

Con el propósito de verificar la correcta modificación superficial de los electrodos y monitorear la evolución electroquímica del sistema durante las distintas etapas de funcionalización, en cada lote se seleccionaron aleatoriamente tres bionanosensores de control. Estos sensores fueron caracterizados mediante EIS después de cada etapa crítica del protocolo, incluyendo la adsorción del PBA, la inmovilización del anticuerpo monoclonal anti-14-3-3 eta y la etapa de bloqueo con BSA.

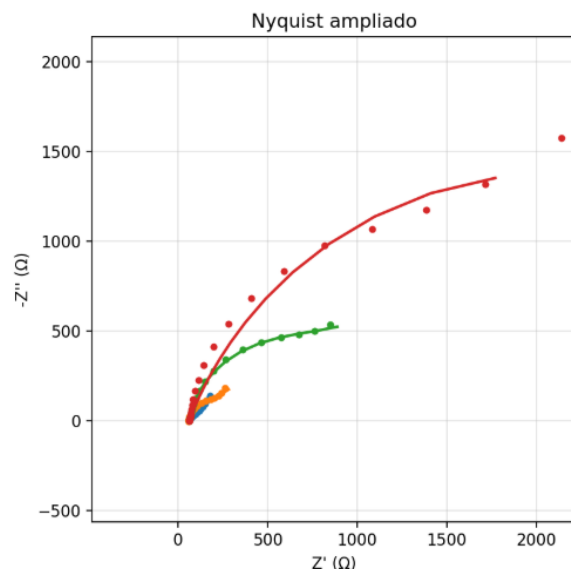


Figura 7.6: Diagramas de Nyquist representativos obtenidos durante el seguimiento electroquímico

La Figura 7.6 presenta diagramas de Nyquist representativos correspondientes a las etapas de funcionalización evaluadas. Los espectros se identifican mediante un código de color, donde el azul corresponde al sensor desnudo, el naranja a la modificación con PBA, el verde a la inmovilización del anticuerpo monoclonal (MAb) y el rojo a la etapa de bloqueo con BSA. En todos los casos se observó un incremento progresivo en el diámetro del semicírculo, lo cual indica un aumento de la R_{ct} . Este comportamiento es consistente con la incorporación secuencial de capas orgánicas y biomoleculares sobre la superficie del LIG, las cuales dificultan el intercambio electrónico entre la sonda redox ferri/ferrocianuro y el electrodo.

El incremento inicial registrado tras la adsorción del PBA confirma la interacción no covalente entre el grupo pireno y la superficie gráfica del LIG mediante apilamiento π - π , proporcionando grupos carboxilo disponibles para la posterior activación química. Posteriormente, la inmovilización del anticuerpo produjo un aumento adicional de R_{ct} , atribuible a la formación de una capa proteica sobre la superficie del electrodo. Finalmente, la etapa de bloqueo con BSA generó el mayor incremento en la señal, lo cual evidencia la ocupación de sitios no específicos remanentes y la formación de una barrera adicional al transporte de carga.

Cuadro 7.7: Valores promedio de $\Delta R_{ct, \text{norm}}$ obtenidos durante el seguimiento electroquímico del proceso de funcionalización utilizando tres bionanosensores de control.

Etapas de funcionalización	Promedio $\Delta R_{ct, \text{norm}}$	DE	CV (%)
Desnudo–PBA	0.575980793	1.426831	247.722
PBA–MAb	1.005295788	0.691202	68.75606
MAb–BSA	2.004756946	1.57257	78.44191

Con el fin de cuantificar estos cambios, se calculó el valor promedio de $\Delta R_{ct,norm}$ para los tres sensores de control en cada etapa (Cuadro 7.7). El cambio entre la superficie desnuda y la etapa posterior a la inmovilización de PBA fue de $0,576 \pm 1,427$, mientras que la inmovilización del anticuerpo generó un incremento promedio de $1,005 \pm 0,691$. La transición desde la superficie funcionalizada con anticuerpo hasta la etapa de bloqueo con BSA produjo el mayor aumento, con un valor de $2,005 \pm 1,573$.

Aunque se observaron coeficientes de variación elevados (247.7 %, 68.8 % y 78.4 %, respectivamente), atribuibles a la variabilidad intrínseca de los sensores de grafeno inducido por láser, en todos los casos se mantuvo una tendencia consistente de incremento en la resistencia de transferencia de carga. Este comportamiento fue utilizado como criterio experimental para considerar exitosa cada etapa del proceso de funcionalización.

No obstante, es importante señalar que este seguimiento electroquímico constituye una validación funcional del proceso de modificación superficial, pero no proporciona evidencia fisicoquímica directa de la inmovilización del anticuerpo ni de la eficiencia de la activación química con EDC/NHS. Una caracterización más exhaustiva de la morfología, porosidad, homogeneidad y química superficial del LIG, así como de los cambios inducidos durante la funcionalización, requeriría el empleo de técnicas complementarias como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), mediciones de ángulo de contacto y mapeo Raman. Estas técnicas permitirían confirmar de manera directa la formación de enlaces químicos, la distribución homogénea de las capas depositadas y la inmovilización efectiva del anticuerpo sobre la superficie del sensor, constituyendo una línea de trabajo relevante para el fortalecimiento fisicoquímico de esta plataforma en estudios futuros.

7.6. Curva de calibración de 0,5 - 20 ng/ml

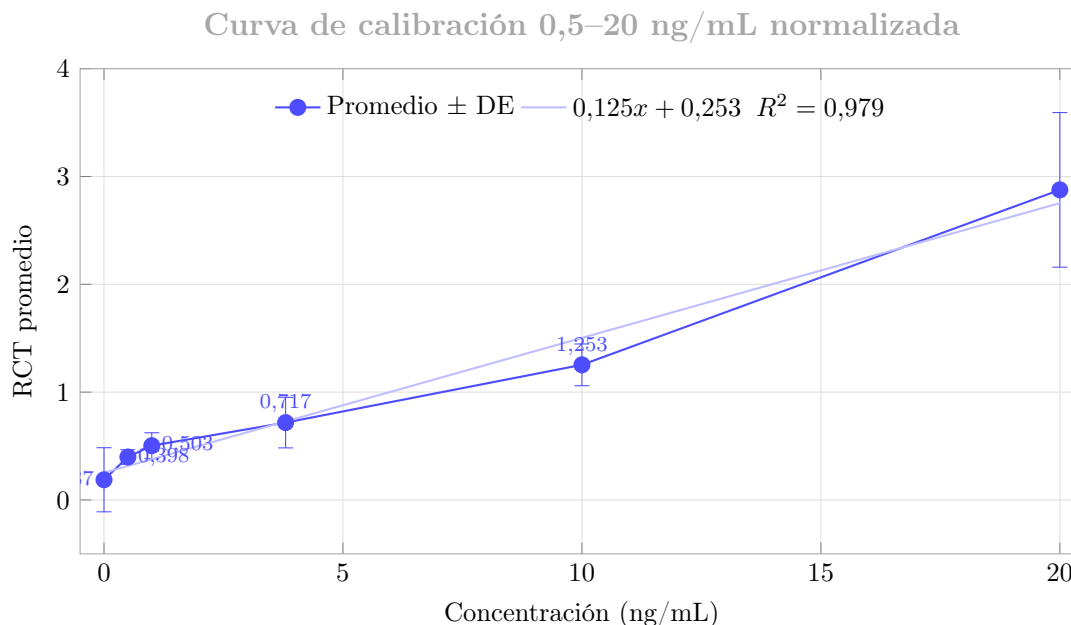


Figura 7.7: Curva de calibración normalizada para el rango de 0,5–20 ng/mL. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes para cada concentración.

Cuadro 7.8: Resultados del ANOVA y SEM para la curva de calibración en el rango de 0,5–20 ng/mL.

Grupo	n	Suma	Promedio	Varianza	SEM
Blanco	20	3.739448	0.1869724	0.07803987932	0.06436943869
0,5 ng/mL	3	1.195051894	0.3983506312	0.004547150057	0.03893220628
1 ng/mL	3	1.509365231	0.5031217437	0.01436963542	0.06920894792
3,8 ng/mL	3	2.151975004	0.7173250014	0.05504418598	0.1354550183
10 ng/mL	2	2.5060766	1.2530383	0.03751542867	0.1369588052
20 ng/mL	3	8.627759314	2.875919771	0.5142555687	0.4140272007

Cuadro 7.9: Resultados del análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la curva de calibración en el rango de 0,5–20 ng/mL.

Fuente de variación	SS	gl	MS	F	Valor p
Entre grupos	19.98240978	5	3.996481955	41.49561939	< 0,0001
Dentro de grupos	2.696706216	28	0.09631093628	–	–
Total	22.67911599	33	–	–	–

Cuadro 7.10: Curva de calibración del bionanosensor en el rango de 0.5 a 20 ng/mL de proteína 14-3-3 eta.

Concentración (ng/mL)	Promedio $\Delta R_{ct, norm}$	Desviación Estandar
0	0.1869724	0.2793561872
0.5	0.3983506312	0.06743255933
1	0.5031217437	0.1198734141
3.8	0.7173250014	0.2346149739
10	1.2530383	0.1936889999
20	2.875919771	0.7171161473

Cuadro 7.11: Parámetros de la regresión lineal y valores estimados LOD y LOQ calculados mediante el método de la desviación estándar del blanco para la curva de calibración normalizada en el rango de 0,5–20 ng/mL.

Pendiente	Intercepto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
0.125	0.256	6.704548493	22.34849498

Cuadro 7.12: Datos utilizados para el cálculo del error residual de la regresión en el rango 0,5-20 ng/mL.

Concentración (ng/mL)	Señal real	Señal predicha	Delta	Error
0.5	0.3983506312	0.3185	0.07985063125	0.08742708707
1	0.5031217437	0.3810	0.1221217437	
3.8	0.7173250014	0.7310	0.0136749986	
10	1.2530383	1.5060	0.2529617002	
20	2.875919771	2.7560	0.1199197715	

Cuadro 7.13: Estimación del LOD y LOQ mediante el método del error estándar residual de la regresión en el rango de 0,5–20 ng/mL.

Pendiente	Intercepto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
0.125	0.256	2.09825009	6.994166965

Cuadro 7.14: Evaluación de la relevancia estadística de cada concentración frente al blanco y su clasificación como detectable y cuantificable en el rango de 0,5–20 ng/mL.

Concentración (ng/mL)	Promedio	DE	CV (%)	p vs blanco	Detectable	Cuantificable
Blanco	0.1869724	0.2793561872	149.4104	–	–	–
0.5	0.3983506312	0.0674325593	16.9279	0.0116	Sí	Sí
1	0.5031217437	0.1198734141	23.8259	0.0093	Sí	No
3.8	0.7173250014	0.2346149739	32.7069	0.2526	No	No
10	1.2530383	0.1936889999	15.4575	0.0421	Sí	Sí
20	2.875919771	0.7171161473	24.9352	0.0209	Sí	No

7.6.1. Análisis de la curva de calibración de 0,5–20 ng/mL

La curva de calibración construida en el rango de 0,5 a 20 ng/mL mostró una relación lineal positiva entre la concentración de la proteína 14-3-3 eta y la respuesta electroquímica normalizada del bionanosensor ($\Delta R_{ct,norm}$). A medida que aumentó la concentración del analito, se observó un incremento progresivo de la señal, desde un valor promedio de 0,398 en 0,5 ng/mL hasta 2,876 en 20 ng/mL. Esto evidencia la capacidad del sistema para responder de manera dependiente de la concentración.

La regresión lineal obtenida, descrita por la ecuación $y = 0,125x + 0,256$, presentó un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,979$, lo que indica una adecuada correlación lineal dentro del intervalo evaluado. Este comportamiento confirma que el bionanosensor mantiene una tendencia consistente frente al aumento de la concentración de proteína 14-3-3 η .

A pesar de la linealidad observada, el análisis de la variabilidad experimental reveló limitaciones importantes. El blanco presentó una desviación estándar de 0,279 y un coeficiente de variación de 149,4 %, lo que refleja una alta dispersión de la señal basal. Esta variabilidad impactó directamente la estimación de los parámetros analíticos del bionanosensor.

Mediante el método basado en la desviación estándar del blanco se obtuvo un LOD de 6,70 ng/mL y un LOQ de 22,35 ng/mL. Bajo este criterio conservador, únicamente las concentraciones superiores a aproximadamente 7 ng/mL podrían considerarse detectables de manera robusta, mientras que la cuantificación confiable requeriría concentraciones superiores a 22 ng/mL.

Por otro lado, el método basado en el error estándar residual de la regresión produjo valores menos restrictivos, con un LOD de 2,10 ng/mL y un LOQ de 6,99 ng/mL. Esta diferencia entre métodos evidencia que la estimación de los límites analíticos depende fuertemente del criterio empleado y de la variabilidad del blanco.

La comparación estadística frente al blanco mostró que las concentraciones de 0,5, 1, 10 y 20 ng/mL presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Sin embargo, la concentración de 3,8 ng/mL no mostró una diferencia significativa frente al blanco ($p = 0,2526$). Este resultado es relevante, ya que 3,8 ng/mL corresponde a una concentración de interés clínico para el monitoreo de la artritis reumatoide.

Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando los valores individuales de la respuesta electroquímica normalizada correspondientes al blanco y a las concentraciones evaluadas en el rango de 0,5 a 20 ng/mL. El análisis evidenció diferencias estadísticamente

significativas entre los grupos ($F = 41,50$, $p < 0,0001$), confirmando que la señal del biosensor depende de la concentración de la proteína 14-3-3 ϵ ta. Este resultado proporciona evidencia estadística global complementaria a la regresión lineal, al cálculo de LOD/LOQ y a las comparaciones individuales frente al blanco.

En conjunto, estos resultados demuestran que el bionanosensor presenta una respuesta lineal adecuada y dependiente de la concentración de proteína 14-3-3 ϵ ta en el rango de 0,5–20 ng/mL. No obstante, la alta variabilidad del blanco y la falta de significancia estadística en 3,8 ng/mL evidencian que la reproducibilidad del sistema debe optimizarse para mejorar la robustez analítica y permitir una detección más confiable en concentraciones clínicamente relevantes.

7.7. Curva de calibración de 1 - 4 ng/ml

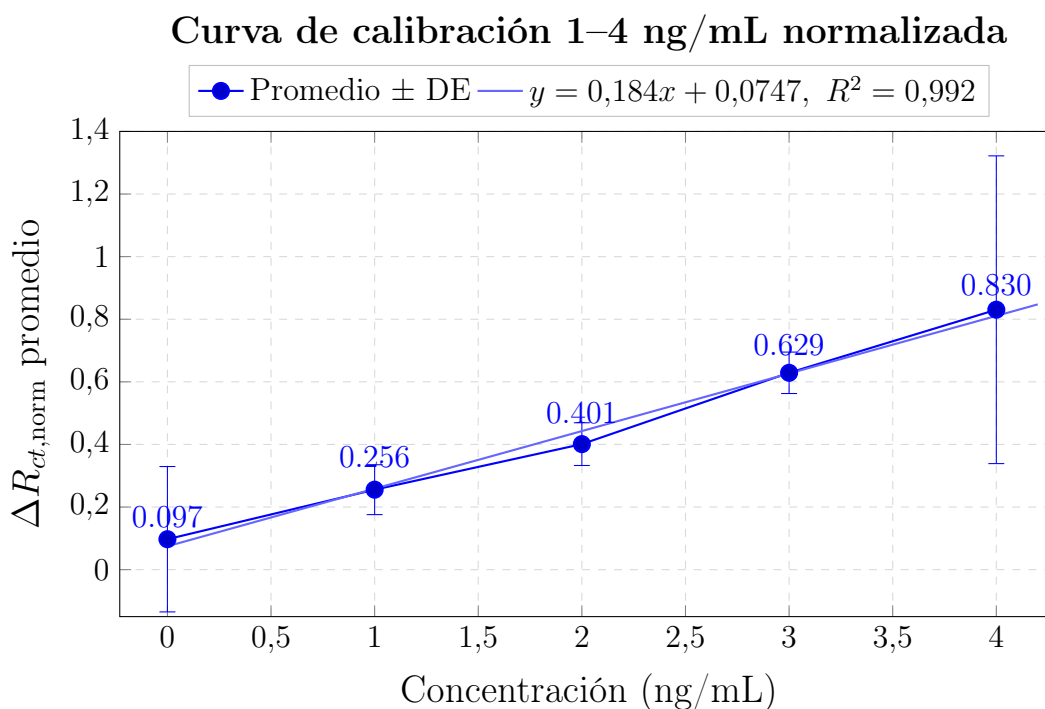


Figura 7.8: Curva de calibración normalizada para las concentraciones de 1-4 ng/ml.

Cuadro 7.15: Resultados del ANOVA y SEM para la curva de calibración en el rango de 1–4 ng/mL.

Grupo	n	Suma	Promedio	Varianza	SEM
Blanco	16	1.556017000	0.0972510625	0.05390581385	0.0580440640
1 ng/mL	2	0.5110135766	0.2555067883	0.006346902146	0.05633339217
2 ng/mL	2	0.8020644900	0.4010322450	0.004657266272	0.04825591296
3 ng/mL	2	1.2577602830	0.6288801415	0.004380205412	0.04679853316
4 ng/mL	2	1.6608146350	0.8304073176	0.2416537579	0.3476016095

Cuadro 7.16: Resultados del análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la curva de calibración en el rango de 1–4 ng/mL.

Fuente de variación	SS	gl	MS	F	Valor p
Entre grupos	1.377965064	4	0.3444912661	6.142247011	0.002394612988
Dentro de grupos	1.065625339	19	0.05608554418	–	–
Total	2.443590404	23	–	–	–

Cuadro 7.17: Curva de calibración del bionanosensor en el rango de 1 a 4 ng/mL de proteína 14-3-3 eta.

Concentración (ng/mL)	Promedio $\Delta R_{ct,norm}$	Desviación estándar
0	0.0972510625	0.2321762566
1	0.2555067883	0.0796674472
2	0.4010322450	0.0682441666
3	0.6288801415	0.0661831203
4	0.8304073176	0.4915829105

Cuadro 7.18: Parámetros de la regresión lineal y valores estimados del LOD y LOQ calculados mediante el método de la desviación estándar del blanco para la curva de calibración normalizada en el rango de 1–4 ng/mL.

Pendiente	Intercepto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
0.184	0.0747	3.785482435	12.618274780

Cuadro 7.19: Datos utilizados para el cálculo del error estándar residual de la regresión en el rango de 1–4 ng/mL.

Concentración (ng/mL)	Señal real	Señal predicha	Delta	Error
1	0.2555067883	0.2587	0.0031932117	0.01849046334
2	0.4010322450	0.4427	0.0416677550	
3	0.6288801415	0.6267	0.0021801415	
4	0.8304073176	0.8107	0.0197073176	

Cuadro 7.20: Estimación del LOD y LOQ mediante el método del error estándar residual de la regresión en el rango de 1–4 ng/mL.

Pendiente	Intercepto	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
0.184	0.0747	0.3014749457	1.0049164860

Cuadro 7.21: Evaluación de la relevancia estadística de cada concentración frente al blanco y su clasificación como detectable y cuantificable en el rango de 1–4 ng/mL.

Concentración (ng/mL)	Promedio	DE	CV (%)	p vs blanco	Detectable	Cuantificable
Blanco	0.0972510625	0.2321762560	238.7390431	–	–	–
1	0.2555067883	0.0796674472	31.1801685	0.1710389901	Sí	Sí
2	0.4010322450	0.0682441666	17.0171270	0.0131030273	Sí	Sí
3	0.6288801415	0.0661831203	10.5239641	0.0077165027	Sí	Sí
4	0.8304073176	0.4915829105	59.1978057	0.2831424210	No	No

7.7.1. Análisis de la curva de calibración de 1–4 ng/mL

Con el propósito de evaluar el desempeño del bionanosensor en un intervalo más cercano a las concentraciones clínicamente relevantes de la proteína 14-3-3 eta, se construyó una curva de calibración en el rango de 1 a 4 ng/mL. La respuesta electroquímica normalizada del bionanosensor ($\Delta R_{ct, \text{norm}}$) mostró un incremento progresivo con el aumento de la concentración del analito, pasando de un valor promedio de 0,256 en 1 ng/mL a 0,830 en 4 ng/mL. Este comportamiento confirma que el bionanosensor conserva una respuesta dependiente de la concentración dentro del intervalo de mayor interés para el monitoreo de la artritis reumatoide.

La regresión lineal obtenida estuvo descrita por la ecuación $y = 0,184x + 0,0747$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,992$. Este valor, superior al observado en la curva de 0,5–20 ng/mL, evidencia una excelente linealidad y sugiere que el bionanosensor presenta un comportamiento más consistente cuando se analiza en un intervalo reducido. Adicionalmente, la pendiente de la recta fue mayor que la obtenida en la curva de rango amplio (0,184 frente a 0,125), lo que indica una mayor sensibilidad analítica en este rango, ya que pequeños cambios en la concentración producen variaciones más pronunciadas en la señal electroquímica.

El cálculo del LOD y del LOQ mediante el método basado en la desviación estándar del blanco arrojó valores de 3,79 ng/mL y 12,62 ng/mL, respectivamente. Estos resultados reflejan el impacto de la elevada variabilidad del blanco, cuyo coeficiente de variación alcanzó 238,7%. Debido a esta dispersión, este método proporciona una estimación conservadora que podría subestimar la capacidad real del bionanosensor para detectar concentraciones bajas.

En contraste, el método basado en el error estándar residual de la regresión produjo valores considerablemente más favorables, con un LOD de 0,30 ng/mL y un LOQ de 1,00 ng/mL. Estos resultados indican que el bionanosensor posee la capacidad teórica de detectar concentraciones inferiores a 1 ng/mL y de cuantificar de manera confiable a partir de aproximadamente 1 ng/mL. Este hallazgo es especialmente relevante, ya que las concentraciones de interés clínico del biomarcador se encuentran dentro de este intervalo.

La evaluación estadística frente al blanco mostró que las concentraciones de 2 ng/mL y 3 ng/mL presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0131$ y $p = 0,0077$, respectivamente). La concentración de 1 ng/mL no alcanzó significancia estadística ($p = 0,1710$), aunque fue clasificada como detectable y cuantificable con base en el método del error estándar residual de la regresión. Por otra parte, la concentración de 4 ng/mL tampoco mostró diferencia significativa frente al blanco ($p = 0,2831$), lo cual se explica por la elevada desviación estándar observada en este punto y su consecuente coeficiente de variación de 59,2%.

De manera complementaria, se realizó un análisis de ANOVA para la curva de 1–4 ng/mL, utilizando los valores individuales de $\Delta R_{ct, \text{norm}}$ del blanco y de cada concentración evaluada. El análisis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F = 6,14$, $p = 0,0024$), lo que confirma que la respuesta electroquímica del biosensor presenta una dependencia significativa con la concentración de la proteína 14-3-3 eta dentro del intervalo de mayor interés clínico.

En conjunto, los resultados obtenidos en la curva de 1–4 ng/mL demuestran que el bionanosensor presenta un desempeño analítico superior al observado en el rango amplio de 0,5–20 ng/mL, con mayor linealidad, mayor sensibilidad y límites de detección más favorables. Asimismo, el intervalo evaluado incluye concentraciones cercanas al rango fisiopatológico de la proteína 14-3-3 eta asociado con la actividad de la artritis reumatoide.

7.8. Discusión

Estos resultados evidencian que el valor del LOD depende de manera importante del método matemático utilizado. El método de blancos normalizados, altamente influenciado por la variabilidad basal entre sensores de grafeno LIG, produjo estimaciones conservadoras incompatibles con el rango clínico del biomarcador. En contraste, el método del error estándar residual de la regresión proporcionó valores más favorables, aunque basados en un escenario ideal derivado del modelo de regresión.

Desde la perspectiva clínica, la ventana de concentración del biomarcador 14-3-3 eta es relativamente estrecha. Concentraciones cercanas a 1 ng/mL pueden encontrarse en individuos sanos, mientras que valores alrededor de 3,8 ng/mL se han reportado en pacientes con artritis reumatoide activa. Debido a esta proximidad, cualquier aumento del LOD hacia valores superiores a 1 ng/mL

compromete la capacidad del bionanosensor para discriminar adecuadamente pacientes con niveles bajos o moderados del biomarcador.

Bajo el escenario más conservador, representado por el método de blancos normalizados, el bionanosensor no sería capaz de detectar de forma confiable concentraciones clínicamente relevantes, incluyendo 3,8 ng/mL. Incluso en la curva de 1–4 ng/mL, el LOD de 3,78 ng/mL se sitúa prácticamente sobre el valor medio asociado con enfermedad activa, lo que implica un riesgo considerable de falsos negativos.

Por el contrario, el método del error estándar residual de la regresión sugiere que, en condiciones analíticas ideales, el sistema podría detectar concentraciones tan bajas como 0,30 ng/mL y cuantificar de manera confiable a partir de 1,00 ng/mL. Sin embargo, este escenario no refleja completamente la variabilidad experimental observada, por lo que debe interpretarse como una estimación teórica del potencial del bionanosensor y no como una garantía de desempeño clínico.

En consecuencia, no es apropiado concluir que el bionanosensor se encuentra listo para pruebas clínicas o validación diagnóstica. Los resultados obtenidos demuestran una prueba de concepto técnicamente sólida y metodológicamente consistente, pero también evidencian que la variabilidad intersensor constituye actualmente la principal limitación del sistema.

Se recomienda que futuros trabajos se enfoquen en optimizar el proceso de fabricación del grafeno inducido por láser, estandarizar la funcionalización superficial, incrementar el número de réplicas experimentales y validar el bionanosensor en saliva humana real. Estas mejoras serán fundamentales para reducir la dispersión analítica y establecer límites de detección robustos y clínicamente relevantes.

Además del ajuste lineal y los cálculos de LOD y LOQ, se incorporó un análisis estadístico complementario que incluyó coeficiente de variación (%CV), error estándar de la media (SEM), intervalos de confianza del 95 %, análisis de varianza (ANOVA) y pruebas *post hoc* de Tukey. Estas herramientas permiten evaluar de manera más rigurosa la precisión, repetibilidad y selectividad del bionanosensor.

En conjunto, los resultados confirman que el bionanosensor basado en electrodos de grafeno inducido por láser posee un potencial prometedor para el monitoreo no invasivo de la artritis reumatoide. No obstante, su desempeño actual debe interpretarse como evidencia preliminar de factibilidad técnica y no como validación clínica definitiva.

Cuadro 7.22: Bionanosensores electroquímicos reportados para la detección de biomarcadores asociados con artritis reumatoide.

Biomarcador	Tipo de sensor/electrodo	Método de detección	Rango lineal	Límite de detección	Matriz	Ref.
Factor reumatoide (FR) y anticuerpos anti-CCP						
IgM-RF	Matriz de microelectrodos de onda entrelazada (IDW μ E)	EIS	1–200 UI/mL	0.22 UI/mL	Suero	[95]
FR y CCP	Microesferas magnéticas + electrodos serigrafiados (SPE)	H ₂ O ₂ /hidroquinona	–	FR: 0.8 UI/mL; CCP: 2.5 UI/mL	Suero	[96]
CCP	SPE modificado con MoS ₂ /polianilina/AuNPs	Electroquímica	0.25–1500.0 UI/mL	PBS: 0.16 UI/mL; suero: 0.22 UI/mL	Suero	[84]
CCP	Grafeno dopado con nitrógeno + nanopartículas de oro	Inmunosensor electroquímico libre de marcadores	0.125–2000 pg/mL	–	Suero	[97]
CCP	IDW μ E con sistema avidina-biotina	Electroquímica basada en impedancia	1–800 UI/mL	PBS: 0.60 UI/mL; suero: 0.82 UI/mL	Suero	[85]
Interleucina-1β (IL-1β)						
IL-1 β	Poli(ácido 2-tiofen-3-il-malónico) sobre ITO	Impedancia electroquímica	0.01–3 pg/mL	3 fg/mL	Suero y saliva humana	[98]
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)						
TNF- α	Capas antibioincrustantes	Inmunosensor para sangre completa	0.01–500 ng/mL	10 pg/mL	Sangre completa	[99]
TNF- α	SAM de ácido bismutiosuccinilpropiónico sobre Au	EIS	1–100 pg/mL	–	–	[100]
TNF- α	Sistema de perlas magnéticas	EIS	1–1000 pg/mL	1 pg/mL	Suero	[101]
Otros biomarcadores de artritis reumatoide						
MIF	Nanopartículas de oro (AuNPs) + nanopartículas de TiO ₂	Electroquímica	0.03–230 ng/mL	0.02 ng/mL	Suero	[82]
CXCL7 y MMP3	Microesferas magnéticas carboxiladas + SPE dual	Amperométrico	CXCL7: 1–75 ng/mL; MMP3: 2.0–2000 pg/mL	CXCL7: 0.8 ng/mL; MMP3: 1.2 pg/mL	Suero	[86]
RANKL	SPE injertado con estreptavidina/ácido 4-aminobenzoico	Amperométrico	10.4–1000 pg/mL	3.1 pg/mL	Suero	[102]
Proteína 14-3-3η						
14-3-3 η	Grafeno inducido por láser (LIG) funcionalizado con anti-14-3-3 η sobre sustrato flexible de poliimida	Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	1–4 ng/mL	3.79 ng/mL ^a	Saliva artificial	Este trabajo

^a LOD calculado mediante el método basado en la desviación estándar del blanco utilizando la curva de calibración de 1–4 ng/mL.

En el cuadro 7.22 [103] presenta una comparación del bionanosensor desarrollado en este trabajo con inmunosensores electroquímicos reportados recientemente para la detección de biomarcadores asociados con artritis reumatoide. Para esta comparación se seleccionó exclusivamente el LOD correspondiente a la curva de calibración de 1–4 ng/mL, dado que este intervalo coincide con el rango clínicamente más relevante de concentración de la proteína 14-3-3 η . Asimismo, se reportó el valor obtenido mediante el método de blancos normalizados (3,78 ng/mL), ya que este enfoque constituye el criterio más conservador y es conceptualmente el más comparable con la metodología empleada en la mayoría de los estudios descritos en la literatura, los cuales estiman el límite de detección a partir de la desviación estándar del blanco y la pendiente de la curva de calibración, de acuerdo con las recomendaciones de la guía ICH Q2(R2).

Desde esta perspectiva, el valor de 3,78 ng/mL representa la estimación más rigurosa del desem-

peño analítico del bionanosensor y, por tanto, el escenario más exigente para evaluar su potencial clínico. Este valor se sitúa prácticamente sobre la concentración media reportada en saliva para pacientes con artritis reumatoide activa (3,8 ng/mL), lo que implica que aproximadamente la mitad de los pacientes podría presentar concentraciones iguales o inferiores al límite de detección, asumiendo una distribución aproximadamente simétrica alrededor del valor promedio. En otras palabras, aun cuando el bionanosensor lograra detectar pacientes con concentraciones superiores al promedio, existiría un riesgo considerable de falsos negativos en individuos con niveles bajos o moderados del biomarcador, incluyendo pacientes con actividad inflamatoria temprana o con respuesta parcial al tratamiento.

La comparación con los inmunosensores incluidos en la Tabla 7.22 muestra que numerosos sistemas electroquímicos para biomarcadores de artritis reumatoide alcanzan límites de detección en el rango de pg/mL e incluso fg/mL. Por ejemplo, sensores para IL-1 β , TNF- α , MIF y RANKL presentan sensibilidades varios órdenes de magnitud superiores a la obtenida en este trabajo. Expresado en unidades equivalentes, el LOD de 3,78 ng/mL corresponde a 3780 pg/mL, valor que es entre tres y seis órdenes de magnitud mayor que los mejores resultados reportados en la literatura científica. Este análisis evidencia que, aunque el bionanosensor desarrollado logró demostrar capacidad de detección en saliva artificial, su sensibilidad actual aún se encuentra por debajo del estado del arte en inmunosensores electroquímicos para artritis reumatoide.

No obstante, esta comparación debe interpretarse en el contexto del objetivo y alcance del presente estudio. Muchos de los sistemas reportados emplean nanomateriales híbridos altamente optimizados, estrategias de amplificación de señal y extensos procesos de validación experimental. En contraste, el presente trabajo constituye una prueba de concepto desarrollada en el contexto de un proyecto de pregrado, cuyo principal aporte consiste en demostrar la viabilidad de utilizar electrodos flexibles de grafeno inducido por láser y espectroscopía de impedancia electroquímica para la detección no invasiva de la proteína 14-3-3 η en saliva artificial.

En consecuencia, aunque los resultados obtenidos son prometedores y confirman la factibilidad técnica de la plataforma, no es apropiado concluir que el bionanosensor se encuentra listo para pruebas clínicas o validación diagnóstica. La proximidad entre el LOD conservador y la concentración media asociada con enfermedad activa, junto con la elevada variabilidad intersensor observada, indican que aún se requieren optimizaciones sustanciales para reducir el riesgo de falsos negativos y garantizar una cobertura adecuada del rango clínico real del biomarcador.

7.9. Prueba de concepto en saliva artificial

Cuadro 7.23: Resultados de la prueba de concepto del bionanosensor en saliva artificial utilizando concentraciones clínicamente relevantes de proteína 14-3-3 η .

Concentración real (ng/mL)	Promedio	DE	Valor predicho (ng/mL)
1.0	0.379585	0.1947105812	0.98868
3.8	0.6524236667	0.2129347458	3.171392

7.9.1. Análisis de prueba de concepto en saliva artificial

Con el fin de evaluar la aplicabilidad del bionanosensor en una matriz biológica simulada, se realizó una prueba de concepto empleando saliva artificial suplementada con proteína 14-3-3 eta a concentraciones de 1,0 y 3,8 ng/mL, correspondientes a valores cercanos al rango de interés clínico para el monitoreo de la actividad de la artritis reumatoide.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando la curva de calibración construida en el rango de 0,5–20 ng/mL, debido a que este fue el lote experimental seleccionado para la validación en matriz. Aunque la curva de 1–4 ng/mL presentó un mejor desempeño analítico, no se dispuso de un número suficiente de sensores con características equivalentes para repetir la prueba de concepto en ese intervalo, por lo que se empleó la curva de rango amplio como referencia para la estimación de las concentraciones en saliva artificial.

Los resultados obtenidos mostraron que la muestra preparada a 1,0 ng/mL fue estimada por el bionanosensor en 0,989 ng/mL, lo que corresponde a un error relativo de aproximadamente 1,1 %. Por su parte, la muestra preparada a 3,8 ng/mL fue cuantificada en 3,171 ng/mL, con un error relativo de 16,5 %.

Estos resultados demuestran que el bionanosensor fue capaz de detectar y cuantificar la proteína 14-3-3 eta en una matriz compleja que simula las características fisicoquímicas de la saliva, manteniendo una buena concordancia entre las concentraciones reales y las concentraciones predichas. La elevada exactitud observada para la concentración de 1,0 ng/mL confirma que el sistema puede generar estimaciones confiables incluso en concentraciones bajas.

Aunque en la concentración de 3,8 ng/mL se observó una subestimación moderada, el valor predicho permaneció dentro del mismo orden de magnitud y conservó una adecuada aproximación al valor real. Esta diferencia puede atribuirse a efectos de matriz, variaciones en la interacción antígeno-anticuerpo o a la variabilidad experimental inherente al proceso de fabricación y funcionalización de los sensores.

En conjunto, la prueba de concepto en saliva artificial confirma la viabilidad del biosnanoensensor electroquímico para detectar y estimar la concentración de la proteína 14-3-3 eta en una matriz que reproduce de manera aproximada algunas de las características fisicoquímicas de la saliva. Estos resultados respaldan el potencial del dispositivo como herramienta para el monitoreo no invasivo de la actividad de la artritis reumatoide; sin embargo, deben interpretarse dentro del alcance de una validación preliminar en condiciones controladas de laboratorio.

Para avanzar hacia niveles superiores de madurez tecnológica y evaluar su aplicabilidad clínica real, será necesario validar el sistema en muestras de saliva humana obtenidas de pacientes con artritis reumatoide y de individuos sanos, incorporando además el efecto de interferentes y condiciones propias de la matriz biológica, tales como proteínas salivales endógenas, mucinas, enzimas, variaciones en la viscosidad, fenómenos de biofouling, metabolitos y otros componentes inmunológicamente relevantes. Asimismo, será indispensable realizar estudios clínicos en una cohorte representativa que permitan determinar parámetros de desempeño diagnóstico como la sensibilidad y especificidad clínica, establecer curvas de calibración en muestras reales y comparar los resultados con métodos de referencia ampliamente utilizados, como ELISA.

En este contexto, el presente trabajo debe considerarse como una prueba de concepto que de-

muestra la factibilidad técnica del enfoque y establece una base experimental sólida para el desarrollo futuro de un sistema *point-of-care* orientado al monitoreo no invasivo de la actividad de la artritis reumatoide.

7.10. Prueba de reactividad cruzada en saliva artificial

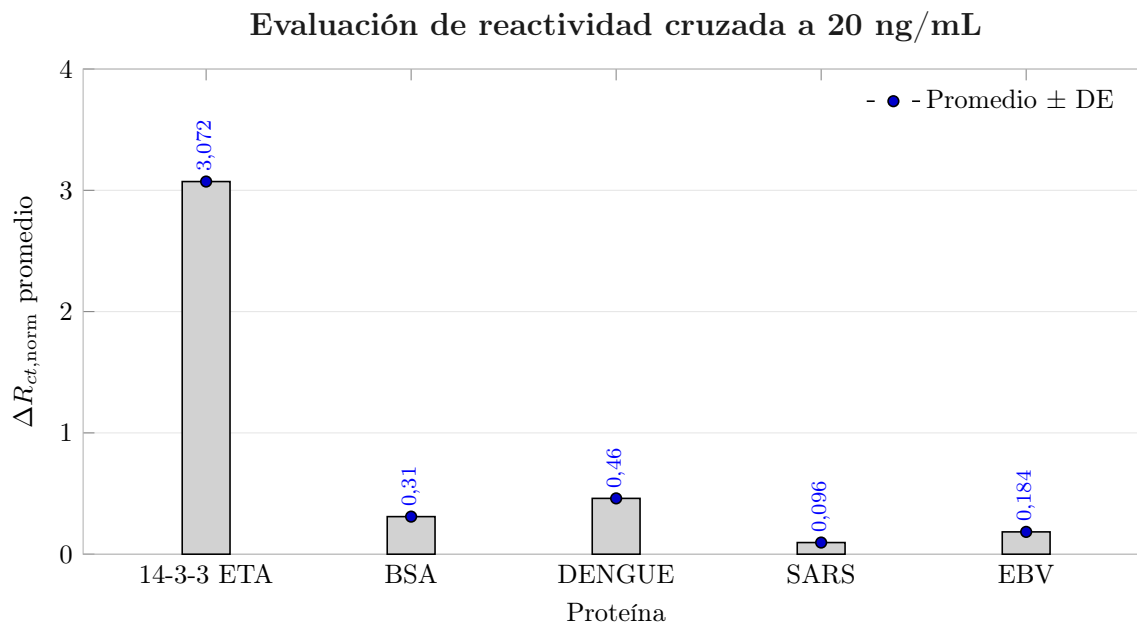


Figura 7.9: Evaluación de la reactividad cruzada del bionanosensor.

7.10.1. Evaluación de la reactividad cruzada

Con el objetivo de determinar la selectividad del bionanosensor, se evaluó su respuesta frente a proteínas potencialmente interferentes a una concentración de 20 ng/mL. Se analizaron BSA, proteínas asociadas al virus del dengue, al SARS-CoV y al virus EBV, las cuales fueron seleccionadas debido a que eran los únicos antígenos disponibles al momento del estudio. Para cada interferente se emplearon tres sensores independientes, y los resultados se compararon con la respuesta obtenida para la proteína objetivo 14-3-3 eta bajo las mismas condiciones experimentales.

La proteína 14-3-3 eta generó una respuesta promedio de $\Delta R_{ct, \text{norm}} = 3,07 \pm 0,72$, significativamente superior a la observada para todos los interferentes evaluados. En contraste, BSA presentó una señal de $0,31 \pm 0,04$, dengue de $0,46 \pm 0,15$, SARS-CoV de $0,10 \pm 0,42$ y EBV de $0,18 \pm 0,22$. Estos valores representan respuestas entre aproximadamente 3% y 15% de la señal obtenida para la proteína objetivo.

Entre los interferentes, la proteína asociada al dengue produjo la respuesta más alta; sin embargo, esta correspondió únicamente al 15% de la señal observada para 14-3-3 eta. BSA, utilizada como

control negativo y agente bloqueante del sensor, mostró una respuesta cercana al nivel basal, lo que confirma que el bloqueo superficial fue efectivo y que la señal del bionanosensor no se debe a adsorción inespecífica significativa. De igual manera, las proteínas virales evaluadas generaron respuestas considerablemente menores que la proteína objetivo, evidenciando una baja reactividad no específica del sistema.

En conjunto, estos resultados demuestran que el bionanosensor posee una adecuada selectividad hacia la proteína 14-3-3 *eta*, ya que la respuesta obtenida para el biomarcador fue entre 6 y 32 veces mayor que la registrada para los interferentes evaluados. La baja reactividad cruzada observada respalda la especificidad del anticuerpo inmovilizado y confirma que la señal electroquímica está dominada por el reconocimiento molecular específico del biomarcador de interés.

La evaluación de reactividad cruzada constituye una evidencia importante del desempeño analítico del bionanosensor, ya que demuestra su capacidad para discriminar la proteína 14-3-3 *eta* frente a otras proteínas no relacionadas presentes en matrices biológicas complejas.

No obstante, estos resultados deben interpretarse dentro del alcance de una validación preliminar. Aunque se evaluaron interferentes relevantes como proteínas asociadas a dengue, SARS-CoV y virus de Epstein-Barr, la selectividad del sistema no puede considerarse completamente validada debido a que no se dispuso de proteínas recombinantes adicionales con secuencias peptídicas semejantes en la región específica reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-14-3-3 *eta*. La identificación y evaluación sistemática de proteínas salivales potencialmente homólogas requeriría un análisis bioinformático detallado de las secuencias primarias y de los epítomos presentes en las proteínas expresadas en saliva, lo cual excede el alcance del presente trabajo de grado.

Esta consideración es particularmente importante, dado que la reactividad cruzada constituye una de las principales fuentes de interferencia y de resultados falsamente positivos en inmunosensores basados en reconocimiento antígeno-anticuerpo. En consecuencia, aunque los resultados obtenidos proporcionan evidencia favorable de selectividad analítica, será necesario realizar estudios futuros con un panel más amplio de proteínas estructuralmente relacionadas y con muestras de saliva humana real para confirmar de manera más robusta la especificidad del bionanosensor en condiciones clínicamente relevantes.

Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un biosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser (LIG) funcionalizado con ácido 1-pirenebutírico, química EDC/NHS y anticuerpos anti-14-3-3 eta para la detección de la proteína 14-3-3 eta en saliva como biomarcador de actividad de la artritis reumatoide. La selección de la saliva como matriz biológica y de la proteína 14-3-3 eta como biomarcador se realizó mediante un proceso estructurado de revisión bibliográfica y matrices de decisión, lo que permitió sustentar la pertinencia clínica y experimental de la estrategia propuesta.

Los resultados obtenidos demuestran que la tecnología de grafeno inducido por láser constituye una plataforma altamente prometedora para el desarrollo de biosensores electroquímicos debido a su bajo costo, facilidad de fabricación y elevada área superficial. La caracterización fisicoquímica y electroquímica confirmó la formación de estructuras grafénicas con propiedades adecuadas para aplicaciones de biosensado, mientras que la estrategia de funcionalización permitió inmovilizar exitosamente el anticuerpo y generar una respuesta electroquímica sensible frente al biomarcador de interés.

No obstante, uno de los hallazgos más importantes de este trabajo fue la confirmación de la alta variabilidad intrínseca de los sensores LIG. A pesar de mantenerse constantes los parámetros de fabricación, se observaron diferencias significativas en la resistencia de transferencia de carga y en la respuesta analítica entre sensores aparentemente idénticos. Esta variabilidad representa actualmente la principal limitación de la tecnología y evidencia que, en su estado actual, la fabricación de sensores LIG aún no ofrece el nivel de reproducibilidad requerido para una producción estandarizada a gran escala.

Para enfrentar esta limitación, se implementaron estrategias metodológicas como la fabricación por lotes independientes, la preselección electroquímica de sensores y la normalización de la señal respecto al valor basal después del bloqueo con BSA. Estas estrategias permitieron reducir parcialmente el efecto de la heterogeneidad entre dispositivos y posibilitaron la construcción de curvas de calibración funcionales. Sin embargo, los resultados también muestran que la necesidad de descartar sensores y construir calibraciones específicas para cada lote reduce la eficiencia del proceso y pone de manifiesto que la reproducibilidad del material sigue siendo un reto técnico no resuelto.

La herramienta computacional desarrollada en Python constituyó un aporte significativo del trabajo, ya que automatizó el ajuste de espectros de impedancia, la extracción de parámetros electroquímicos y la cuantificación del analito. Esta herramienta no elimina la variabilidad experimental, pero sí reduce errores asociados al procesamiento manual y garantiza un análisis consistente y reproducible de los datos.

Desde el punto de vista analítico, el biosensor fue capaz de detectar la proteína 14-3-3 eta en rangos de concentración clínicamente relevantes, incluyendo valores cercanos a 3.8 ng/mL, reportados

en saliva de pacientes con artritis reumatoide activa. Las pruebas de reactividad cruzada mostraron una respuesta significativamente menor frente a proteínas interferentes como dengue, SARS-CoV-2 y virus de Epstein-Barr, lo que respalda la especificidad del sistema. Asimismo, la detección en saliva artificial fortificada confirmó que el biosensor conserva su capacidad de reconocimiento en una matriz más compleja que los tampones de laboratorio.

Sin embargo, es importante señalar que la validación experimental presenta limitaciones. Las pruebas de reactividad cruzada y de detección en saliva artificial se realizaron únicamente con uno de los lotes fabricados, debido a la disponibilidad limitada de sensores y a la dificultad para reproducir posteriormente un lote con comportamiento electroquímico comparable. Además, aunque la saliva artificial representa un avance hacia condiciones más realistas, no reproduce completamente la complejidad biológica de muestras clínicas reales, donde pueden existir variaciones en viscosidad, composición proteica y presencia de interferentes no evaluados.

En consecuencia, este trabajo debe considerarse principalmente como una prueba de concepto que demuestra la viabilidad técnica de detectar la proteína 14-3-3 η mediante un biosensor electroquímico basado en LIG, más que como un dispositivo completamente validado para uso clínico. Los resultados obtenidos son suficientemente sólidos para justificar la continuación del proyecto, pero también evidencian que aún es necesario optimizar la reproducibilidad de fabricación, ampliar la validación analítica y realizar estudios con muestras clínicas de pacientes.

En términos generales, esta investigación establece una base metodológica y experimental robusta para el desarrollo de herramientas de monitoreo no invasivo de la artritis reumatoide. El trabajo integra de manera exitosa la selección racional del biomarcador, la fabricación de sensores, la funcionalización química, el análisis electroquímico y el procesamiento computacional de datos. Aunque persisten limitaciones importantes, el biosensor desarrollado representa un avance significativo hacia la creación de dispositivos portátiles y accesibles que, en el futuro, podrían facilitar el seguimiento continuo de la actividad de la enfermedad y contribuir a prevenir daño articular irreversible y discapacidad en pacientes con artritis reumatoide.

Trabajos futuros

El presente trabajo constituye una prueba de concepto que demuestra la viabilidad de detectar la proteína 14-3-3 en saliva mediante un bionanosensor electroquímico basado en grafeno inducido por láser (LIG). La principal contribución de esta investigación radica en la innovación conceptual de emplear un biomarcador asociado con la actividad de la artritis reumatoide en una matriz no invasiva como la saliva, utilizando una plataforma electroquímica portátil con potencial para el monitoreo clínico. No obstante, para transformar esta prueba de concepto en una tecnología con aplicación real en el entorno asistencial, será necesario avanzar en múltiples etapas de validación, escalamiento y maduración tecnológica.

En primer lugar, es fundamental optimizar el proceso de fabricación del grafeno inducido por láser con el fin de reducir la variabilidad intrínseca observada entre sensores y mejorar la reproducibilidad del sistema. Esto incluye la evaluación sistemática de parámetros de fabricación, el desarrollo de criterios de control de calidad automatizados y la implementación de protocolos estandarizados que permitan obtener dispositivos con propiedades electroquímicas más homogéneas y compatibles con procesos de manufactura reproducibles a mayor escala.

En segundo lugar, será necesario ampliar la validación analítica del bionanosensor de acuerdo con lineamientos internacionalmente aceptados para dispositivos de diagnóstico *in vitro*. Esto implica incrementar el número de lotes independientes y de réplicas experimentales, así como evaluar de manera exhaustiva parámetros como sensibilidad, especificidad, precisión intra e interlote, repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad durante el almacenamiento, robustez y resistencia frente a interferentes presentes en matrices biológicas complejas. Estas etapas permitirán establecer con mayor solidez el desempeño analítico y la confiabilidad del sistema.

Posteriormente, será indispensable realizar estudios de validación clínica con muestras de saliva de pacientes con artritis reumatoide y de individuos sanos. Estos estudios deberán incluir cohortes suficientemente amplias y representativas para determinar la sensibilidad y especificidad clínica del bionanosensor, establecer puntos de corte diagnósticos y analizar la correlación de los niveles de la proteína 14-3-3 con índices clínicos de actividad de la enfermedad, tales como DAS28-PCR, así como con otros biomarcadores inflamatorios y hallazgos clínicos relevantes. Esta etapa permitirá determinar el verdadero valor clínico del dispositivo como herramienta de monitoreo de la enfermedad.

De manera complementaria, será importante explorar estrategias avanzadas de funcionalización y nuevos materiales que incrementen la estabilidad del reconocimiento biológico, reduzcan la adsorción no específica y prolonguen la vida útil del bionanosensor. Asimismo, la miniaturización del sistema electrónico, la integración con potenciostatos portátiles de bajo consumo, el desarrollo de interfaces móviles y la incorporación de algoritmos automatizados para el análisis de datos representan pasos

esenciales para consolidar un sistema autónomo y fácil de usar por parte del paciente o del personal de salud.

Desde la perspectiva de maduración tecnológica, este trabajo puede ubicarse en un nivel de preparación tecnológica (Technology Readiness Level, TRL) cercano a TRL 3, correspondiente a la demostración experimental de una prueba de concepto en condiciones controladas de laboratorio. Las etapas futuras deberán orientarse a avanzar hacia TRL 4 y TRL 5 mediante la validación del prototipo en entornos de laboratorio más representativos y en matrices biológicas reales, para posteriormente alcanzar niveles superiores de madurez tecnológica mediante la integración del hardware, el software y la interfaz de usuario en un sistema funcional completamente portátil.

A largo plazo, el objetivo es evolucionar hacia un dispositivo *point-of-care* capaz de realizar mediciones rápidas, cuantitativas y no invasivas en el hogar, en consultorios médicos o en entornos con recursos limitados. Este sistema podría proporcionar información en tiempo real sobre la actividad inflamatoria de la artritis reumatoide y facilitar la toma de decisiones clínicas oportunas. Además, permitiría estudiar la relación entre las variaciones del biomarcador y factores desencadenantes como estrés, dieta, calidad del sueño, infecciones, actividad física y adherencia al tratamiento, contribuyendo al desarrollo de estrategias de medicina personalizada orientadas a prevenir brotes inflamatorios y optimizar el manejo terapéutico.

En conjunto, estas líneas de investigación permitirán consolidar la presente prueba de concepto, validar rigurosamente su desempeño analítico y clínico, aumentar su nivel de madurez tecnológica y acercar el bionanosensor desarrollado a una futura aplicación como herramienta portátil, accesible y no invasiva para el monitoreo continuo de la artritis reumatoide.

CAPÍTULO 10

Anexos

Declaración sobre el uso de inteligencia artificial

Durante la elaboración de este trabajo de grado se utilizó *ChatGPT* de OpenAI como herramienta de apoyo para la corrección de estilo, revisión gramatical, organización del documento y conversión de tablas y figuras a formato $\text{\LaTeX}$.

El uso de esta herramienta se limitó a tareas de asistencia en la redacción y presentación del manuscrito. El diseño experimental, la ejecución de los experimentos, el análisis e interpretación de los resultados y las conclusiones fueron desarrollados íntegramente por las autoras bajo la dirección del profesor asesor.

Las autoras revisaron y validaron todo el contenido generado con apoyo de inteligencia artificial y asumen plena responsabilidad por la exactitud, originalidad e integridad del presente trabajo.

Tablas complementarias

Tabla de normalización de blancos 1-4 ng/mL

Cuadro 10.1: Valores individuales empleados para la estimación de la señal basal del sistema (0 ng/mL) en la curva de calibración normalizada.

Hoja	Concentración (ng/mL)	R_s	R_{ct}	ΔR_{ct}	$\Delta R_{ct,norm}$	Promedio	Desviación estándar
3 S35	0	51.59123	385.2520	0.306241	0.306241	0.0972510625	0.232176256
3_S13	0	36.48072	503.2322				
9 S32	0	44.22371	392.7291	0.366299	0.366299		
9_S8	0	28.68187	536.5853				
13 S30	0	50.00442	350.2365	0.041240	0.041240		
13_S11	0	33.02640	364.6803				
15 S29	0	47.85695	243.3351	0.336560	0.336560		
15_S10	0	31.63653	325.2321				
19 S27	0	52.34717	363.7638	0.274437	0.274437		
19_S2	0	36.37059	463.5942				
21 S26	0	45.78376	384.9828	0.395128	0.395128		
21_S3	0	30.30042	537.1003				
23 S25	0	46.54640	439.4615	0.030739	0.030739		
23_S9	0	30.61770	452.9701				
25 S24	0	48.77178	416.3693	-0.407110	-0.407110		
25_S10	0	26.02516	246.8598				
27 S23	0	42.87215	362.2761	0.173006	0.173006		
27_S7	0	27.66815	424.9522				
33 S20	0	47.36457	324.7789	0.234599	0.234599		
33_S6	0	32.70468	400.9715				
35 S19	0	30.89182	411.0642	0.196926	0.196926		
35_S6	0	29.79630	492.0134				
37 S18	0	34.63602	407.2419	0.055014	0.055014		
37_S7	0	33.14346	429.6458				
39 S17	0	34.13769	459.8974	-0.031140	-0.031140		
39_S3	0	36.09775	445.5747				
41 S16	0	29.05961	479.0562	0.001588	0.001588		
41_S5	0	29.30443	479.8170				
43 S15	0	29.86847	618.4405	-0.164310	-0.164310		
43_S2	0	28.79100	516.8218				
45 S14	0	28.94052	477.4089	-0.253200	-0.253200		
45_S1	0	29.86965	356.5301				

Tabla de normalización de blancos 0,5-20 ng/mL

Cuadro 10.2: Valores individuales empleados para la estimación de la señal basal del sistema (blancos) utilizados en la curva de calibración normalizada de 0.5–20 ng/mL.

Hoja	R_s	R_{ct}	ΔR_{ct}	$\Delta R_{ct, \text{norm}}$	Promedio	Desviación estándar
3 S35	51.59123	385.2520	0.306241	0.306241	0.1869724	0.2793561872
3_S13	36.48072	503.2322				
7_S33	45.48266	347.6395	0.659806	0.659806		
7_S8	29.72606	577.0141				
9_S32	44.22371	392.7291	0.366299	0.366299		
9_S8	28.68187	536.5853				
11_S31	46.44228	412.2889	0.465684	0.465684		
11_S4	30.13831	604.2850				
13_S30	50.00442	350.2365	0.041240	0.041240		
13_S11	33.02640	364.6803				
15_S29	47.85695	243.3351	0.336560	0.336560		
15_S10	31.63653	325.2321				
17_S28	113.12480	326.0653	0.457575	0.457575		
17_S5	32.58752	475.2647				
19_S27	52.34717	363.7638	0.274437	0.274437		
19_S2	36.37059	463.5942				
21_S26	45.78376	384.9828	0.395128	0.395128		
21_S3	30.30042	537.1003				
23_S25	46.54640	439.4615	0.030739	0.030739		
23_S9	30.61770	452.9701				
25_S24	48.77178	416.3693	-0.407110	-0.407110		
25_S10	26.02516	246.8598				
27_S23	42.87215	362.2761	0.173006	0.173006		
27_S7	27.66815	424.9522				
31_S21	44.58099	362.3416	0.600366	0.600366		
31_S1	30.32351	579.8790				
33_S20	47.36457	324.7789	0.234599	0.234599		
33_S6	32.70468	400.9715				
35_S19	30.89182	411.0642	0.196926	0.196926		
35_S6	29.79630	492.0134				
37_S18	34.63602	407.2419	0.055014	0.055014		
37_S7	33.14346	429.6458				
39_S17	34.13769	459.8974	-0.031140	-0.031140		
39_S3	36.09775	445.5747				
41_S16	29.05961	479.0562	0.001588	0.001588		
41_S5	29.30443	479.8170				
43_S15	29.86847	618.4405	-0.164310	-0.164310		
43_S2	28.79100	516.8218				
45_S14	28.94052	477.4089	-0.253200	-0.253200		
45_S1	29.86965	356.5301				

Cuadro 10.3: Parámetros electroquímicos obtenidos para los sensores blanco

Sensor	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	R^2	χ^2
S37	49.709	172.843	0.998282	0.001645
S35	51.591	385.252	0.998821	0.001837
S34	49.940	167.684	0.967366	0.009030
S33	45.483	347.640	0.999295	0.000530
S32	44.223	392.729	0.997349	0.002421
S31	46.442	412.289	0.999600	0.000427
S30	50.044	350.237	0.999578	0.000389
S29	47.857	243.335	0.999838	0.000043
S28	113.125	326.065	0.999906	0.000004
S27	52.347	363.764	0.999948	0.000007
Promedio	55.076	316.584	0.995998	0.001633
Desv. estándar	20.336	88.620	0.010234	0.002938
CV (%)	36.92	27.99	1.03	179.89

Bibliografía

- [1] P. Studenic, Y. Meissner, L. Kearsley-Fleet, and D. D. Cock, “Role of rheumatoid arthritis registries worldwide: What have they taught us?” *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 39, no. 1, p. 102017, 2025, [Online]. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.berh.2024.102017>
- [2] T. Asprilla. (2023, Oct) Artritis reumatoide: enfermedad que impacta a colombianos. [Online]. [Online]. Available: <https://consultorsalud.com/artritis-reumatoide-impacta-a-colombianos/CONSULTORSALUD>
- [3] Cuenta de Alto Costo. (2023) Día mundial de la artritis reumatoide. [Online]. [Online]. Available: <https://cuentadealtocosto.org/artritis/dia-mundial-de-la-artritis-reumatoide/>
- [4] C. R. K. *et al.*, “The utility and limitations of crp, esr and das28-crp in appraising disease activity in rheumatoid arthritis,” *Frontiers in Medicine*, vol. 5, p. 185, 2018, [Online]. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00185/full>
- [5] S. M. *et al.*, “Review—bio-nanosensors: Fundamentals and recent applications,” *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 169, no. 3, p. 037506, 2021, [Online]. [Online]. Available: <https://iopscience.iop.org/article/10.1149/1945-7111/ac2972/meta>
- [6] Mayo Clinic. (2023) Rheumatoid arthritis – symptoms and causes. [En línea]. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/rheumatoid-arthritis/symptoms-causes/syc-20353648>
- [7] Organización Mundial de la Salud. (2023) Artritis reumatoide - hoja informativa. [En línea]. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/rheumatoid-arthritis>
- [8] GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators, “Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020: a systematic analysis of the global burden of disease study 2021,” *The Lancet Rheumatology*, vol. 5, no. 10, pp. e623–e632, Oct 2023, [Online]. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37795020/>
- [9] Organización Mundial de la Salud, “Rehabilitación 2030: un llamado a la acción,” 2017.
- [10] S. H. Kim, J. H. Lee, J. S. Kim, and H. C. Jung, “Prevalence and risk factors of functional dyspepsia in health check-up population: a nationwide multicenter prospective study,” *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 23, no. 6, pp. 946–950, Jun 2008.
- [11] F. Wolfe and K. Michaud, “Importancia clínica y de investigación de la velocidad de sedimentación globular,” *J. Reumatol.*, vol. 21, no. 7, pp. 1227–1237, jul 1994.

- [12] Cuenta de Alto Costo. (2023) Artritis reumatoide, una enfermedad que afecta la productividad laboral. [En línea]. [Online]. Available: <https://cuentadealtocosto.org/artritis/artritis-reumatoide-una-enfermedad-que-afecta-la-productividad-laboral/>
- [13] M. F. Marengo and M. E. Suarez-Almazor, "Improving treatment adherence in patients with rheumatoid arthritis: what are the options?" *International Journal of Clinical Rheumatology*, vol. 10, no. 5, pp. 345–356, Oct 2015.
- [14] S. de Achaval and M. E. Suarez-Almazor, "Improving treatment adherence in patients with rheumatologic disease," *Journal of Musculoskeletal Medicine*, vol. 27, no. 10, pp. 1691–1476, Oct 2010.
- [15] C. A. Waimann, M. F. Marengo, S. de Achaval, V. L. Cox, A. Garcia-Gonzalez, J. D. Reveille, M. N. Richardson, and M. E. Suarez-Almazor, "Electronic monitoring of oral therapies in ethnically diverse and economically disadvantaged patients with rheumatoid arthritis: consequences of low adherence," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 65, no. 6, pp. 1421–1429, Jun 2013.
- [16] A. Yang, B. Wang, G. Zhu, Z. Jiao, Y. Fang, F. Tang, C. Ma, Y. Zhao, C. Cheng, and M. Zhong, "Validation of chinese version of the morisky medication adherence scale in patients with epilepsy," *Seizure*, vol. 23, no. 4, pp. 295–299, Apr 2014.
- [17] B. J. van den Bemt, H. E. Zwikker, and C. H. van den Ende, "Medication adherence in patients with rheumatoid arthritis: a critical appraisal of the existing literature," *Expert Review of Clinical Immunology*, vol. 8, no. 4, pp. 337–351, May 2012.
- [18] J. R. R. Rincón, D. A. J. Fernández, J. C. G. Casallas, A. Beltrán, A. Téllez, D. G. Fernández-Ávila, and C. M. Karam, "Métodos para la medición de la adherencia a medicamentos modificadores de la enfermedad orales en artritis reumatoide y factores asociados con baja adherencia farmacológica," *Revista Colombiana de Reumatología*, vol. 25, no. 4, pp. 261–270, 2018, [En línea]. [Online]. Available: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcrc/v25n4/0121-8123-rcrc-25-04-00261.pdf>
- [19] J. Harnett, D. Wiederkehr, R. Gerber, D. Gruben, J. Bourret, and A. Koenig, "Primary nonadherence, associated clinical outcomes, and health care resource use among patients with rheumatoid arthritis prescribed treatment with injectable biologic disease-modifying antirheumatic drugs," *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, vol. 22, no. 3, pp. 209–218, Mar 2016.
- [20] E. Costa, A. Giardini, M. Savin, E. Menditto, E. Lehane, O. Laosa, S. Pecorelli, A. Monaco, and A. Marengoni, "Interventional tools to improve medication adherence: review of literature," *Patient Preference and Adherence*, vol. 9, pp. 1303–1314, Sep 2015.
- [21] T. Koncz, M. Pentek, V. Brodsky, K. Ersek, E. Orlewska, and L. Gulacsi, "Adherence to biologic dmard therapies in rheumatoid arthritis," *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 10, no. 9, pp. 1367–1378, Sep 2010.

- [22] Clínica Universidad de Navarra. (s.f.) Artritis reumatoide. [Online]. Available: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/artritis-reumatoide>
- [23] Mayo Clinic. (2023, feb) Artritis reumatoide. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/rheumatoid-arthritis/symptoms-causes/syc-20353648>
- [24] A. M. Delgado-Vega, J. Martín, J. Granados, and J. M. Anaya, “Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿qué esperar de américa latina?” *Biomédica*, vol. 26, pp. 562–584, 2006.
- [25] ScienceDirect. Synovial joint. [En línea]. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/synovial-joint>
- [26] Ángel Caballero, M. J. Felgueres, E. Vela, and D. Martín, “Estrategias terapéuticas para la artritis reumatoide: hacia las terapias biotecnológicas,” *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, vol. 6, pp. 69–87, 2017.
- [27] Johns Hopkins Arthritis Center, “Ra pathophysiology,” n.d., [En línea]. Consultado el 10 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/ra-pathophysiology-2/>
- [28] E. O. Martínez, D. F. H. Ramírez, C. A. N. nez Álvarez, and J. Cabiedes, “Proteínas citrulinadas en artritis reumatoide,” *Reumatología Clínica (English Edition)*, vol. 6, pp. 68–71, 2011.
- [29] A.-L. Mueller, Z. Payandeh, N. Mohammadkhani, S. M. H. Mubarak, A. Zakeri, A. A. Bahrami, A. Brockmueller, and M. Shakibaei, “Recent advances in understanding the pathogenesis of rheumatoid arthritis: New treatment strategies,” *Cells*, vol. 10, no. 11, p. 3017, 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/11/3017>
- [30] A. N. Colebatch, C. J. Edwards, M. Østergaard *et al.*, “Recomendaciones de la eular para el uso de imágenes articulares en el tratamiento clínico de la artritis reumatoide,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 72, pp. 804–814, 2013.
- [31] M. L. L. Prevoo, M. A. Van’t Hof, H. H. Kuper *et al.*, “Desarrollo y validación de puntuaciones de actividad de la enfermedad modificadas que incluyen recuentos de veintiocho articulaciones en un estudio longitudinal prospectivo de pacientes con artritis reumatoide,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 38, pp. 44–48, 1995.
- [32] G. Wells, J. C. Becker, J. Teng *et al.*, “Validación del índice de actividad de la enfermedad de 28 articulaciones (das28)...” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 68, pp. 954–960, 2009.
- [33] L. Gossec, “Monitoring of disease and treatment of patients with rheumatic disease,” in *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases*, F. Atzeni, I. F. Masala, D. Aletaha, M. Lee, and X. Baraliakos, Eds. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018, vol. 15, pp. 97–125.

- [34] B. Cylwik, L. Chrostek, E. Gindzienska-Sieskiewicz, S. Sierakowski, and M. Szmitkowski, "Relación entre las proteínas séricas de fase aguda y la alta actividad de la enfermedad en pacientes con artritis reumatoide," *Advances in Medical Sciences*, vol. 55, pp. 80–85, 2010.
- [35] K. Yildirim *et al.*, "Asociaciones entre los niveles de reactantes de fase aguda y la puntuación de actividad de la enfermedad (das28) en pacientes con artritis reumatoide," *Annals of Clinical and Laboratory Science*, vol. 34, pp. 423–426, 2004.
- [36] P. H. Dessen, B. I. Joffe, and A. E. Stanwix, "Proteína c reactiva de alta sensibilidad como marcador de actividad de la enfermedad en la artritis reumatoide," *The Journal of Rheumatology*, vol. 31, pp. 1095–1097, 2004.
- [37] L. M. Jansen, D. van Schaardenburg, I. E. van Der Horst-Bruinsma, P. D. Bezemer, and B. A. Dijkmans, "Predictores del estado funcional en pacientes con artritis reumatoide temprana," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 59, pp. 223–226, 2000.
- [38] R. T. Keenan, C. J. Swearingen, and Y. Yazici, "La velocidad de sedimentación globular y los niveles de proteína c reactiva están poco correlacionados con las medidas clínicas de la actividad de la enfermedad en pacientes con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y osteoartritis," *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 26, pp. 814–819, 2008.
- [39] S. G. Madsen, B. Danneskiold-Samsøe, A. Stockmarr, and E. M. Bartels, "Correlaciones entre la fatiga y la duración de la enfermedad, la actividad de la enfermedad y el dolor en pacientes con artritis reumatoide: una revisión sistemática," *Scandinavian Journal of Rheumatology*, vol. 45, pp. 255–261, 2016.
- [40] P. Sarzi-Puttini *et al.*, "Correlación de la puntuación de dolor subjetivo con discapacidad física, puntuaciones clínicas y radiográficas en artritis reumatoide de reciente aparición," *BMC Musculoskeletal Disorders*, vol. 3, p. 18, 2002.
- [41] G. Wells *et al.*, "Validación del das28 y los criterios de respuesta de la liga europea contra el reumatismo basados en pcr frente a la progresión de la enfermedad en pacientes con ar," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 68, pp. 954–960, 2009.
- [42] M. C. Genovese *et al.*, "Sarilumab más metotrexato en pacientes con ar activa y respuesta inadecuada al metotrexato: estudio de fase iii," *Arthritis & Rheumatology*, vol. 67, pp. 1424–1437, 2015.
- [43] J. Merino Romero, "Utilidad diagnóstica de la velocidad de sedimentación globular," *Medicina Integral*, vol. 39, no. 7, pp. 325–329, 2002, [En línea].
- [44] P. L. van Riel and L. Renskers, "The disease activity score (das) and the das28 in the management of rheumatoid arthritis," *Clinical and Experimental Rheumatology*, vol. 34, no. 5 Suppl 101, pp. S40–S44, 2016.

- [45] D. M. van der Heijde, M. van't Hof, P. L. van Riel *et al.*, "Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists," *The Journal of Rheumatology*, vol. 20, pp. 579–581, 1993.
- [46] A. Gnanasakthy, M. Mordin, E. Evans, L. Doward, and C. DeMuro, "A review of patient-reported outcome labeling in the united states (2011–2015)," *Value in Health*, vol. 20, no. 3, pp. 420–429, March 2017, [Epub Dec. 2, 2016].
- [47] J. F. Fries, P. Spitz, R. G. Kraines, and H. R. Holman, "Measurement of patient outcome in arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 23, no. 2, pp. 137–145, 1980.
- [48] P. Katz, "Measures of adult general functional status: the barthel index, katz index of activities of daily living, health assessment questionnaire (haq), mactar patient preference disability questionnaire, and modified health assessment questionnaire (mhaq)," *Arthritis Rheum.*, vol. 49, pp. 15–27, 2003.
- [49] B. Bruce and J. F. Fries, "The health assessment questionnaire (haq)," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 23, no. 5 Suppl 39, pp. S14–S18, 2005.
- [50] J. S. Smolen *et al.*, "Eular recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease modifying antirheumatic drugs: 2016 update," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 76, no. 6, pp. 960–977, 2017, [Epub Mar. 6, 2017].
- [51] V. Devauchelle-Pensec *et al.*, "Performance of hand radiographs in predicting the diagnosis in patients with early arthritis," *J. Rheumatol.*, vol. 33, no. 8, pp. 1511–1515, Aug. 2006.
- [52] A. N. Colebatch *et al.*, "Eular recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 72, no. 6, pp. 804–814, 2013, [Epub Mar. 21, 2013].
- [53] I. Möller *et al.*, "Recommendations for the use of ultrasound and magnetic resonance in patients with rheumatoid arthritis," *Reumatol. Clin.*, vol. 14, no. 1, pp. 9–19, Jan. 2018, [Epub Oct. 29, 2016].
- [54] D. Wang, Y. Cui, H. Lei, D. Cao, G. Tang, H. Huang, T. Yuan, L. Rao, and B. Mo, "Diagnostic accuracy of 14-3-3 eta protein in rheumatoid arthritis: A meta-analysis," *International Journal of Rheumatic Diseases*, vol. 23, pp. 1443–1451, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13921>
- [55] UniProt Consortium. (2025) 14-3-3 protein eta (ywuh) – uniprotkb entry p68510. [En línea]. Consultado el 10 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P68510>
- [56] W. H. Mohammed, N. Fouad, R. H. ElKabarity, S. A. Khalil, and L. Salem, "The role of 14.3.3 eta protein in the diagnosis of patients with early rheumatoid arthritis,"

- The Egyptian Rheumatologist*, vol. 47, no. 1, pp. 26–30, 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S111011642400098X>
- [57] R. Zhou, W. Hu, P. X. Ma *et al.*, “Versatility of 14-3-3 proteins and their roles in bone and joint-related diseases,” *Bone Research*, vol. 12, p. 58, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/s41413-024-00370-4>
- [58] A. J. Mohammed, A. R. Diajil, and F. I. Hassan, “Assessment of serum and salivary 14-3-3 eta protein in rheumatoid arthritis patients,” *Journal of Research in Medical and Dental Science*, vol. 10, no. 10, pp. 177–182, 2022. [Online]. Available: <https://www.jrmds.in/articles/assessment-of-serum-and-salivary-1433-eta-protein-in-rheumatoid-arthritis-patients.pdf>
- [59] M. A. Javaid, A. S. Ahmed, R. Durand, and S. D. Tran, “Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases,” *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 6, no. 1, pp. 67–76, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>
- [60] J. Vozzi, “Biosensor electroquímico en sustrato flexible mediante electrónica impresa funcional,” Buenos Aires, Argentina, 2019.
- [61] V. Perumal and U. Hashim, “Advances in biosensors and optical devices for detection of pathogens,” *J. Appl. Biomed.*, vol. 12, no. 1, pp. –, 2014, [Página específica si está disponible].
- [62] S. Kumar and A. Kalkal, “Nanotechnology in cancer management,” in *Nanotechnology in the Management of Cancer*, K. R. Khondakar and A. K. Kaushik, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2021, ch. 43.
- [63] S. A. Perdomo, J. M. Marmolejo-Tejada, and A. Jaramillo-Botero, “Review—bionanosensors: Fundamentals and recent applications,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 168, no. 10, p. 107506, Oct. 2021.
- [64] B. Zhang, B. Liu, G. Chen, and D. Tang, “Electrochemical biosensor based on nanomaterials (reemplazar por título real si lo tienes),” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 53, pp. 465–471, 2014.
- [65] F. Scholz, “Voltammetric techniques of analysis: the essentials,” *ChemTexts*, vol. 1, no. 4, p. 17, 2015. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40828-015-0016-y>
- [66] M. Galicia, *Modificación de Grafito con CNT y Biopelículas Electroactivas Marinas: Caracterización Electroquímica*. Editorial Académica Española, 2017.
- [67] 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, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/s21196578>
- [68] PalmSens BV, “Bode and nyquist plot,” 2021, [En línea]. Consultado el 10 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.palmsens.com/knowledgebase-article/bode-and-nyquist-plot/>

- [69] P. Ryś, J. Kowalczyk, M. Mroczkowska-Szerszeń *et al.*, “Dispersion phenomena in eis and dis spectra of porous materials and their representation as transmission line bases “diffusion” elements—part i: A case study of lead-acid systems,” *Applied Physics A*, vol. 130, p. 797, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s00339-024-07923-8>
- [70] T.-S. D. Le, H.-P. Phan, S. Kwon, S. Park, Y. Jung, J. Min, B. J. Chun, H. Yoon, S. H. Ko, S.-W. Kim, and Y.-J. Kim, “Recent advances in laser-induced graphene: Mechanism, fabrication, properties, and applications in flexible electronics,” *Advanced Functional Materials*, vol. 32, p. 2205158, 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/adfm.202205158>
- [71] Z. Li, L. Huang, L. Cheng, W. Guo, and R. Ye, “Laser-induced graphene-based sensors in health monitoring: Progress, sensing mechanisms, and applications,” *Small Methods*, vol. 8, p. 2400118, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/smtd.202400118>
- [72] J. Liu, H. Ji, X. Lv *et al.*, “Laser-induced graphene (lig)-driven medical sensors for health monitoring and diseases diagnosis,” *Microchimica Acta*, vol. 189, p. 54, 2022.
- [73] Graphene-Info, “Laser-induced graphene has defects that can be turned into supercapacitors,” Dec. 2014, [En línea]. Publicado el 10 de diciembre de 2014. Consultado el 10 de mayo de 2026. [Online]. Available: <https://www.graphene-info.com/laser-induced-graphene-has-defects-can-be-turned-supercapacitors>
- [74] K. Muzyka and G. Xu, “Laser-induced graphene in facts, numbers, and notes in view of electroanalytical applications: A review,” *Electroanalysis*, vol. 34, no. 4, pp. 574–589, 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/elan.202100425>
- [75] J. Song, Y. Luo, Z. Hao, M. Qu, C. Huang, Z. Wang, J. Yang, Q. Liang, Y. Jia, Q. Song, Q. Zhang, and S. Luo, “Graphene-based wearable biosensors for point-of-care diagnostics: From surface functionalization to biomarker detection,” *Materials Today Bio*, vol. 32, p. 101667, 2025. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101667>
- [76] M. Drobysh, A. Ramanaviciene, R. Viter, and A. Ramanavicius, “Affinity sensors for the diagnosis of covid-19,” *Micromachines*, vol. 12, no. 4, p. 390, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/mi12040390>
- [77] H.-I. Park, S. Lee, Y. Kim, D.-Y. Shin, C. Lee, S. Han, C. Chung, J. K. Chang, and I. B. Seo, “Analytical performance of a new one-step quantitative prostate-specific antigen assay, the frend™ psa plus,” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 52, pp. 715–723, 2014.
- [78] J. H. Koh, S. Lee, H.-S. Kim, K. Lee, C. S. Lee, S.-A. Yoo, N. Lee, and W.-U. Kim, “Development of monitoring system for assessing rheumatoid arthritis within 5 minutes using a drop of bio-fluids,” *Journal of Clinical Medicine*, vol. 9, no. 11, p. 3499, 2020.
- [79] R. Wolkorte, L. Heesink, M. M. A. Kip, H. Koffijberg, M. Tabak, and C. Grünloh, “Monitoring of rheumatoid arthritis: a patient survey on disease insight and possible added value of an

- innovative inflammation monitoring device,” *Rheumatology International*, vol. 42, no. 9, pp. 1565–1572, September 2022.
- [80] N. J. Besselink, P. Van Der Meijde, W. H. J. Rensen *et al.*, “Optical spectral transmission to assess inflammation in hand and wrist joints of rheumatoid arthritis patients,” *Rheumatology*, 2018.
- [81] M. M. A. Verhoeven, A. A. A. Westgeest, A. Schwarting *et al.*, “Development and validation of rheumatoid arthritis disease activity indices including handscan (optical spectral transmission) scores,” *Arthritis Care and Research (Hoboken)*, 2021.
- [82] S. Li, R. Zhang, P. Li, W. Yi, Z. Zhang, S. Chen, S. Su, L. Zhao, and C. Hu, “Development of a novel method to measure macrophage migration inhibitory factor (mif) in sera of patients with rheumatoid arthritis by combined electrochemical immunosensor,” *International Immunopharmacology*, vol. 8, no. 6, pp. 859–865, 2008. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576908000532>
- [83] W.-Y. Tai, T.-L. Chen, H.-M. Wang, and L.-M. Fu, “Rapid microfluidic biosensor for point-of-care determination of rheumatoid arthritis via anti-cyclic citrullinated peptide antibody detection,” *Biosensors*, vol. 14, no. 11, p. 545, 2024. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2079-6374/14/11/545>
- [84] S. P. Selvam, S. R. Chinnadaiyala, and S. Cho, “Electrochemical nanobiosensor for early detection of rheumatoid arthritis biomarker: Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies based on polyaniline (pani)/mos₂-modified screen-printed electrode with pani-au nanomatrix-based signal amplification,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 333, p. 129570, 2021.
- [85] S. R. Chinnadaiyala and S. Cho, “Electrochemical immunosensor for early detection of rheumatoid arthritis biomarker: Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in human serum based on avidin-biotin system,” *Sensors*, vol. 21, no. 1, p. 124, 2021.
- [86] S. Guerrero, E. Sánchez-Tirado, L. Agüí, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, “Simultaneous determination of cxcl7 chemokine and mmp3 metalloproteinase as biomarkers for rheumatoid arthritis,” *Talanta*, vol. 234, p. 122705, 2021.
- [87] D. Nidzworski, K. Siuzdak, P. Niedziałkowski, R. Bogdanowicz, M. Sobaszek, J. Ryl, P. Weiher, M. Sawczak, E. Wnuk, W. A. Goddard, A. Jaramillo-Botero, and T. Ossowski, “A rapid-response ultrasensitive biosensor for influenza virus detection using antibody modified boron-doped diamond,” *Scientific Reports*, vol. 7, p. 15707, 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15806-7>
- [88] 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. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s42823-022-00447-2>

- [89] 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.
- [90] J. Lin, Z. Peng, Y. Liu, F. Ruiz-Zepeda, R. Ye, E. L. G. Samuel, M. J. Yacaman, B. I. Yakobson, and J. M. Tour, “Laser-induced porous graphene films from commercial polymers,” *Nature Communications*, vol. 5, p. 5714, 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/ncomms6714>
- [91] D. A. Armbruster and T. Pry, “Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation,” *The Clinical Biochemist Reviews*, vol. 29, no. Suppl 1, pp. S49–S52, 2008. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556583/>
- [92] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, “Ich q2(r2): Validation of analytical procedures,” <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, 2023, accessed: 2026-05-14.
- [93] International Council for Harmonisation, “Ich harmonised guideline q2(r2): Validation of analytical procedures,” 2023.
- [94] R. E. Bayoumy, N. A. El-Ragehy, N. Y. Hassan, and A. M. Mahmoud, “Development of a biosensor for spectrophotometric determination of lactate in artificial saliva,” *BMC Chemistry*, vol. 20, p. 39, 2026.
- [95] S. R. Chinnadayala, J. Park, M. A. Abbasi, and S. Cho, “Label-free electrochemical impedimetric immunosensor for sensitive detection of igm rheumatoid factor in human serum,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 143, p. 111642, 2019.
- [96] S. Guerrero, E. Sánchez-Tirado, G. Martínez-García, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, and J. M. Pingarrón, “Electrochemical biosensor for the simultaneous determination of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in human serum,” *Analyst*, vol. 145, pp. 4680–4687, 2020.
- [97] J. Ma, D. Li, B. Sun, X. Hou, X. Zhang-Peng, W. Li, Y. Zhang, F. Hu, and X. Shi, “Label-free electrochemical immunosensor for sensitive detection of rheumatoid arthritis biomarker anti-ccp-ab,” *Electroanalysis*, 2021.
- [98] E. B. Aydın, M. Aydın, and M. K. Sezgintürk, “Highly sensitive electrochemical immunosensor based on polythiophene polymer with densely populated carboxyl groups as immobilization matrix for detection of interleukin 1 in human serum and saliva,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 270, pp. 18–27, 2018.
- [99] C. Jiang, M. T. Alam, S. M. Silva, S. Taufik, S. Fan, and J. J. Gooding, “Unique sensing interface that allows the development of an electrochemical immunosensor for the detection of tumor necrosis factor alpha in whole blood,” *ACS Sensors*, vol. 1, no. 12, pp. 1432–1438, 2016.

-
- [100] T. S. Pui, P. Kongsuphol, S. K. Arya, and T. Bansal, "Detection of tumor necrosis factor (tnf- α) in cell culture medium with label free electrochemical impedance spectroscopy," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 181, pp. 494–500, 2013.
- [101] P. Kongsuphol, H. H. Ng, J. P. Pursey, S. K. Arya, C. C. Wong, E. Stulz, and M. K. Park, "Eis-based biosensor for ultra-sensitive detection of tnf- α from non-diluted human serum," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 61, pp. 274–279, 2014.
- [102] A. Valverde, V. Serafín, A. Montero-Calle, A. González-Cortés, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, and J. M. Pingarrón, "Simultaneous determination of chemokine cxcl7 and metalloproteinase mmp3 as biomarkers of rheumatoid arthritis," *ChemElectroChem*, vol. 7, pp. 810–818, 2020.
- [103] E. Egamberdiev, N. Shavazi, M. J. Kadham, S. Kasimova, N. Mamatmusayeva, D. Nabieva, G. Avezova, M. Bekchanova, S. Chuponov, N. Rustamova, F. Oripova, N. Dustova, and G. Ikhtiyarova, "Advances in electrochemical biosensors for early detection of rheumatoid arthritis," *Clinica Chimica Acta*, vol. 578, p. 120547, 2026. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120547>