



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
- UNIDAD IZTAPALAPA -

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
ÁREA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
POSGRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

NANOBIOSENSOR DE ESTRÉS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

I.B. Paulina Hernández Garcés

ASESOR:

Dr. Nikola Batina

Diciembre, 2015

II | Dedicado a...



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00103

Matrícula: 2141801025

NANOBIOSENSOR DE ESTRES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

11 DIC 2015

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En México, D.F., se presentaron a las 13:00 horas del día 9 del mes de diciembre del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA
M. EN C. XIMENA ESTEFANIA OLVERA ROCHA
DR. JOSE JOAQUIN AZPIROZ LEEHAN



PAULINA HERNANDEZ GARCÉS
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: PAULINA HERNANDEZ GARCÉS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

— APROBAR —

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. NIKOLA BATINA SKELEDZIJA

VOCAL

M. EN C. XIMENA ESTEFANIA OLVERA ROCHA

SECRETARIO

DR. JOSE JOAQUIN AZPIROZ LEEHAN

IV | Dedicado a...

Dedicado a...

Mi amado esposo quien siempre está a mi lado amándome y apoyándome. Y a mis padres que me dieron la vida y la determinación para perseguir mis sueños.

«Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas»

- Mary Curie -

VI | Dedicado a...

Agradecimientos

Agradezco el apoyo económico (377893) del CONACyT, otorgado para la realización de la Maestría en Ciencias (Ingeniería Biomédica) del posgrado en Ingeniería Biomédica de la Universidad Autónoma Metropolitana Plantel Iztapalapa.

A mis compañeros en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular:

Al M. en C. Israel Morales por su ayuda en la obtención de las imágenes de AFM, así como su invaluable apoyo y aporte de conocimientos en el laboratorio.

A la M. en C. Karina Velázquez y al M. en C. Carlos Lara, por su ayuda, aporte de conocimientos y paciencia durante la manipulación de la fase inmunológica.

A Alma Pascual, por su exhaustiva colaboración en cuanto a revisiones gramaticales.

Al Dr. Nikola Batina, quien me ha permitido integrarme a su grupo de trabajo, otorgándome la oportunidad de enriquecer mis conocimientos. Quien con su ejemplo me ha impulsando a ser cada día una mejor estudiante, una mejor científica y un mejor ser humano, y que con sus consejos y paciencia me hacen cada día desear crecer más.

Y finalmente, a la M. en C. Ximena Olvera y al Dr. Joaquín Azpiroz por sus amables consejos y ayuda para la culminación de mis estudios de maestría.

Resumen / Abstract

Durante la realización del presente proyecto, se desarrollaron los principios fundamentales para la generación de un Nanobiosensor de Estrés, para uso domestico, en principio de recientes avances en Nanobiotecnología. La meta fue entender el mejor camino para desarrollar un sensor de bajo costo, alta eficiencia, manejo simple y gran accesibilidad en términos de costo/producción. Se desarrollo un Nanobiosensor de estrés en papel, con un diseño específico, se investigaron 5 caminos para la detección de cortisol (hidrocortisona) en muestras de saliva artificial, que presentaran características ópticas (visuales): cambio color y fluorescencia. Los Nanobiosensores, fueron evaluados con saliva artificial y con muestras de saliva humana. Cada opción investigada (diseño, modelo) mostro ventajas y desventajas para el desarrollo futuro, detalles presentados en la tesis. El Nanobiosensor de estrés denominado en la tesis como «ojos de búho (ODB)» con nano-ELISA «sándwich» mostro las mejores características, con una alta sensibilidad, alta eficiencia y gran estabilidad. El sensor fue evaluado en función de diferentes concentraciones de hidrocortisona y diferentes tiempos de respuesta. Su superficie se evaluó en diferentes fases de las modificaciones con un análisis AFM a nivel nanométrico, el cual claramente muestra la reestructuración de la superficie del sensor por presencia de AuNP. Finalmente una serie de sensores, fueron evaluados con saliva de diferentes sujetos, presentando notable diferencia y satisfactoria respuesta.

The fundamental principle for possible design of a stress nanobiosensor is overstated in this work. The objective was to understand and develop a sensor with low cost, high efficiently, simple use and maintenance, to give big accessibility for common population. It is assumed that sensor no requires special skill or special equipment; it's dedicated to personal use. In this thesis several models of stress nanobiosensor were designed and developed. All are based on detection of cortisol (hydrocortisone) in saliva samples. Developed sensors measured changes in color or fluorescence in presence of artificial saliva (model solution) and samples of human saliva. In total, 5 different types of sensors were investigated and each one show different characteristics, disadvantages for the future development, which is detail described in thesis. The stress nanobiosensor named "ojo de búho (ODB)" whit nano-ELISA «sándwich» setup shows the best characteristics in terms of high sensitivity, high efficiency and high stability. This particular sensor was evaluated in function of different concentration of cortisol and different reaction time. Since the design of such sensor is based on recent advantage and knowledge of nanobiotecnology, it's surface was characterized by AFM at the nanometric

level. The obtain results clearly emphasize the special roll of AuNP on formation of nanostructure film, which is crucial for sensor functionality. Finally a set of results of stress evaluation done by our sensor for samples taken from six different are presented. Significant difference and satisfactory response was observed when it was evaluated in 6 different human subjects.

Palabras Clave

Analito	Microscopia de Fuerza Atómica
Antígeno-Anticuerpo	Nano-ELISA
Colorimetría	Nanobiosensor
Cortisol (Hidrocortisona)	Nanopartículas de Au
Fluorescencia	Saliva
Inmunoensayo	Saliva Artificial

Abreviaturas

AFM: Microscopio de Fuerza Atómica	IgG: Inmuno Gama Globulina
aIp: Anticuerpo-IgG-peroxidasa	OBD: Ojos De Búho
ap: Anticuerpo con peroxidasa	SA: Saliva Artificial
AuNP: Nanopartículas De Oro	S-DA: Solución de Difenilamina
HC: Hidrocortisona	S-FH: Solución de Fenilhidrazine
	SH: Saliva Humana

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	XVI
INDICE DE TABLAS.....	XX
CAPÍTULO I.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ESTRÉS EN LA VIDA ACTUAL.....	4
1. Estadísticas sobre estrés en México	6
2. Enfermedades ligadas al estrés.....	8
III. FISIOLOGÍA DEL ESTRÉS.....	9
1. Cortisol.....	9
2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales.....	10
IV. SENSORES	12
1. Biosensores	12
2. Inmunosensores	13
3. Tipos de transductores.....	13
4. Localización del biosensor.....	14
V. BIONANOTECNOLOGÍA	14
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
VII. HIPÓTESIS	15
VIII. OBJETIVOS.....	15
1. Objetivos generales	15
2. Objetivos particulares.....	15
IX. JUSTIFICACIÓN	17
X. DELIMITACIONES.....	17
CAPÍTULO II.....	19
I. MEDICIONES EN SALIVA	19
II. ESTADO DEL ARTE EN MEDICIONES DE CORTISOL	20

1.	<i>Fuente de análisis</i>	20
2.	<i>Tipos de análisis</i>	23
III.	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS SENSORES ACTUALES.....	28
IV.	LIMITANTES DE LOS SENSORES ACTUALES	29
CAPÍTULO III		31
I.	EQUIPO	31
II.	METODOLOGÍA POR OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	32
1.	<i>Diseño y fabricación del sensor analítico en papel</i>	32
2.	<i>Implementación de métodos colorimétricos y fluorescentes, para la detección de cortisol salival</i>	37
3.	<i>Investigar métodos inmunológicos de cortisol, y nanopartículas para su uso con colorimetría y fluorescencia.</i>	40
III.	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).....	42
4.	<i>Caracterización de los sensores en papel con AFM</i>	42
CAPÍTULO IV		45
I.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN POR OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN.....	45
1.	<i>Diseño y fabricación del sensor analítico en papel</i>	45
2.	<i>Implementación de métodos colorimétricos y fluorescentes, para la detección de cortisol salival</i>	49
3.	<i>Investigar métodos inmunológicos para detección de cortisol, con nanopartículas para su uso con colorimetría o fluorescencia.</i>	58
4.	<i>Caracterización de los sensores en papel con AFM</i>	63
II.	CONCLUSIONES.....	72
III.	RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS		77
REFERENCIAS DE FIGURAS		82
I.	CAPITULO I.....	82
II.	CAPITULO II	82

ANEXOS	83
A.I. DESARROLLO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS SENSORES EN PROCESO DE DISEÑO Y FABRICACIÓN	83
.....	83
1. <i>Sensor a)</i>	83
2. <i>Sensor b)</i>	85
3. <i>Sensor c)</i>	87
4. <i>Sensor d)</i>	89
5. <i>Sensor e)</i>	91
6. <i>Sensor f)</i>	93
7. <i>Sensor g)</i>	95
A.II. REACTIVOS, SOLUCIONES UTILIZADAS Y PROTOCOLOS	98
I. REACTIVOS.....	98
II. SOLUCIONES.....	99
1. <i>Saliva Artificial</i>	99
2. <i>Hidrocortisona</i>	99
3. <i>Solución de Fenilhidrazine (S-FH)</i>	100
4. <i>Solución de Difenilamina (S-DA)</i>	100
5. <i>Solución reactiva con AuNP</i>	100
6. <i>Cristal Violeta (1 X 10⁻³ M) (CV)</i>	100
7. <i>Rodamina-b</i>	100
8. <i>Naranja de Metilo (1 X 10⁻³ M) (NM)</i>	101
9. <i>H₂SO₄ (1X10⁻³M)</i>	101
10. <i>Solución amortiguadora de potasio (PBS)</i>	101
11. <i>Reconstitución del anticuerpo</i>	102
12. <i>Reconstrucción de la IgG</i>	102
13. <i>Reconstrucción de la peroxidasa de rábano picante</i>	102
III. PROTOCOLOS.....	102
1. <i>Limpieza de instrumental y cristalería</i>	102
2. <i>Esterilización de material plástico</i>	103
3. <i>Preparación de solución con AuNP</i>	103
4. <i>Preparación del sujeto experimental para la extracción de saliva humana</i>	103
5. <i>Marcación del anticuerpo con la peroxidasa de rábano picante</i> ..	104

A.III.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	105
I.	COLORIMETRÍA Y FLUORESCENCIA.....	106
1.	<i>S-FH</i>	106
2.	<i>S-DA</i>	112
3.	<i>Combinaciones</i>	116
4.	<i>S-Anticuerpos</i>	118

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FI.1	CICLO CIRCADIANO DEL CORTISOL	3
FII.1	CICLO DE ESTRÉS.....	4
FII.2	RELACIÓN ENTRE ESTRÉS Y RENDIMIENTO	5
FII.3	FASES CLÁSICAS DEL ESTRÉS: ALARMA, RESISTENCIA Y AGOTAMIENTO	6
FII.4	NIVEL DE ESTRÉS DE LOS MEXICANOS EN 2012	7
FIII.1	:	
	MOLÉCULA DE CORTISOL A) ESTRUCTURA QUÍMICA Y B) MODELO DE BARRAS Y ESFERAS	10
FIII.2	ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS ADRENALES	11
FIV.1	ESQUEMA DE UN BIOSENSOR.	13

CAPÍTULO II

FI.1	ARTÍCULOS BASADOS EN DIAGNÓSTICO POR SALIVA EN INTERVALOS DE 10 AÑOS	19
FII.1		
	RANGOS DE ANÁLISIS DE LAS MEDICIONES DE CORTISOL (TABLA II.1).....	27
FIII.1	ARTÍCULOS BASADOS EN DETECCIÓN DE CORTISOL (HIDROCORTISONA) EN LOS ÚLTIMOS 10 AÑOS	28

CAPÍTULO III

FII.1	PROPUESTAS DE DISEÑO PARA EL SENSOR.....	32
FII.2	SENSOR CON TRATAMIENTO TÉRMICO Y ACETATO DE CELULOSA CON ADHESIVO.....	34
FII.3	PLANILLA DEL SENSOR «ODB» SELECCIONADO	35
FII.4	ZONA DE REACCIÓN Y CANALES DEL SENSOR «ODB».....	35
FII.5	DIMENSIONES DEL SENSOR «ODB».....	36

CAPÍTULO IV

FI.1	DIAGRAMA DEL SENSOR «OBD» ESPECIFICANDO LAS ZONAS HIDROFÓBICAS E HIDROFÍLICAS	45
FI.2	SENSOR CON DAÑO EN CELULOSA DEBIDO A ALTA TEMPERATURA DURANTE EL TRATAMIENTO TÉRMICO	46
FI.3	PRUEBA DE LA BARRERA HIDROFÓBICA EN EL SENSOR «OJOS DE BÚHO».....	47
FI.4	IMÁGENES OBTENIDAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO NIKON 400X DEL SENSOR «OJOS DE BÚHO» (A) ANTES DEL TRATAMIENTO TÉRMICO. (B) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO (370 x 510 μM).	48
FI.5	IMÁGENES OBTENIDAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO NIKON 400X DE LA PARTE TRASERA DEL SENSOR «OJOS DE BÚHO» (A) ANTES DEL TRATAMIENTO TÉRMICO. (B) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO (370 x 510 μM). 48	
FI.6	SENSOR «ODB» CON SOLUCIÓN DE RODAMINA-B QUE PRESENTA FUGA (A) SENSOR (B) IMAGEN OBTENIDA CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO NIKON 400X DE LA PARTE TRASERA DE LA FUGA (370 x 510 μM).49	
	SENSORES «ODB» MODIFICADO CON S-FH (A) CON ALCOHOL + HC (B) CON H ₂ SO ₄ + HC. DESPUÉS DE 24H.....	49
FI.7	REACCIÓN CORTISOL-FENILHIDRAZINE (A) SIN NP (B) CON NP	50
FI.8	SENSORES «ODB» MODIFICADO CON S-FH (A) CON ALCOHOL + HC (B) CON H ₂ SO ₄ + HC. DESPUÉS DE 24H.	51

FI.9	SENSORES «ODB» MODIFICADO CON S-FH (A) CON ALCOHOL + HC (B) CON H ₂ SO ₄ + HC. DESPUÉS DE 24H.	52
FI.10	SENSOR «ODB» CON S-FH (AUNP) + ALCOHOL Y HC (DEL LADO IZQUIERDO) BAJO LUZ UV.	53
FI.11	SENSORES «ODB» CON S-FH (AUNP) + ALCOHOL Y SALIVA HUMANA (DEL LADO IZQUIERDO) DE DOS SUJETOS EXPERIMENTALES BAJO A) LUZ BLANCA Y B) LUZ UV.	54
FI.12	SENSOR «ODB» CON S-DA + RH-B*10-2 Y HC EN AGUA DEL LADO DERECHO.	55
FI.13	SENSORES «ODB» CON S-DA + DA Y AUNP.	56
FI.14	SENSORES «ODB» CON S-DA + 60 MG DE DA (AUNP) A) CON HC EN EL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR Y B) CON H ₂ O EN EL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR.	56
FI.15	COMBINACIÓN DE S-FH Y S-DA (AUNP) A) CON CV Y HC DEL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR B) CON HC DEL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR Y C) CON H ₂ O DEL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR.	57
FI.16	COMBINACIÓN DE S-FH Y S-DA BAJO LUZ UV DESPUÉS DE AGREGAR HC EN EL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR.	57
FI.17	ESQUEMA DE UNIÓN APAUNP-CORTISO	58
FI.18	ESQUEMA DE UNIÓN APAUNP-CORTISOL EN EL SENSOR «ODB»	59
FI.19	SENSOR «ODB» MODIFICADO CON APAUNP, EN EL LADO IZQUIERDO DE LOS SENSORES A) SA CON HC Y B) SA.	59
FI.20	SENSOR «ODB» CON APAUNP Y HC EN EL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR A) COLOR VERDE Y B) COLOR ROJO. BAJO LUZ UV.	60
FI.21	ESQUEMA DE UNIÓN AAUNP + IPAUNP + CORTISOL EN EL SENSOR «OJOS DE BÚHO» ...	60
FI.22	COMPARACIÓN DE SENSORES «OJOS DE BÚHO» A) APAUNP CON SA E HC Y B) AAUNP + IPAUNP + HC	61
FI.23	RESULTADO DEL ESTUDIO DE 6 SUJETOS CON LOS SENSORES «ODB» MODIFICADOS CON UN NANO-ELISA «SÁNDWICH» Y SH DEL LADO IZQUIERDO DEL SENSOR.	62
FI.24	IMAGEN DE AFM: ALTURA Y FASE DEL PAPEL DEL SENSOR «ODB» DESPUES DEL TRATAMIENTO TERMICO	64
FI.25	IMAGEN 3D DE AFM DE LA SUPERFICIE DEL SENSOR «ODB» (ANTES DE LA MODIFICACION CON ANTICUERPOS Y NP).	65

FI.26 IMAGEN DE AFM: ALTURA Y FASE DEL PAPEL DEL SENSOR «ODB» (MODIFICACIÓN CON COLORANTE VEGETAL + AAUNP +IPAUNP).....	66
FI.27 IMAGEN 3D DE AFM DE LA SUPERFICIE DEL SENSOR «ODB» CON LA MODIFICACIÓN DE ANTICUERPOS Y NP.....	67
FI.28 IMAGEN DE AFM: ALTURA Y FASE DEL PAPEL DEL SENSOR «ODB» (MODIFICACIÓN CON COLORANTE VEGETAL + AAUNP +IPAUNP + HC).....	68
FI.29 IMAGEN 3D DE AFM DE LA SUPERFICIE DEL SENSOR «ODB» CON LA MODIFICACIÓN DE ANTICUERPOS, NP Y HC	69
FI.30 IMAGEN 3D DE AFM DE LA FASE DEL SENSOR «ODB» CON LA MODIFICACIÓN DE ANTICUERPOS, NP Y HC	70

ANEXO A.I

FAI.1. PLANILLA DEL SENSOR A)	84
FAI.2. SENSOR A) CON BARREARA HIDROFÓBICA DIBUJADA CON UN LÁPIZ DE CERA, DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.	85
FIA.3 PLANILLA DEL SENSOR B).....	86
FIA.4 SENSOR B) CON BARREARA HIDROFÓBICA DIBUJADA CON UN LÁPIZ DE CERA, DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO	87
FAI.5 PLANILLA DEL SENSOR C)	88
FIA.6 SENSOR C) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO	89
FIA.7 PLANILLA DEL SENSOR D)	90
FAI.8 SENSOR D) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO	91
FIA.9 PLANILLA DEL SENSOR E)	92
FIA.10 SENSOR E) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	93
FAI.11 PLANILLA DEL SENSOR F)	94
FIA.12 SENSOR F) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	95
FIA.13PLANILLA DEL SENSOR G)	96
FIA.14SENSOR G) DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO	97

ANEXO A.I

FAIII.1. NOMENCLATURA DE LOS SENSORES EXPERIMENTALES.....	84
FAIII.2.EJEMPLO DE APLICACIÓN DE LA SUSTANCIA REACTIVA A) CON PINCEL, SIN AUNP Y B) CON MICROPIPETA, CON AUNP.	85

INDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II

TII.1 TÉCNICAS ACTUALES, TIEMPO DE ANÁLISIS Y RANGO DE DETECCIÓN DE CORTISOL.....	26
---	----

CAPÍTULO III

TII.1 CONCENTRACIONES DE HC.....	39
TII.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS EXPERIMENTALES CON S-FH.	40
TII.3 ANÁLISIS CONCENTRACIÓN DE HC VS. TIEMPO, EN SENSOR «ODB» CON ANTICUERPOS .	42
TII.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS EXPERIMENTALES EVALUADOS CON EL «ODB» MODIFICADO CON NANO-ELISA TIPO «SÁNDWICH».....	42

CAPÍTULO IV

TII.1 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR «ODB» ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.	48
TII.2 ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN VS. TIEMPO DE SENSORES «ODB» MODIFICADOS CON UN NANO-ELISA «SÁNDWICH». VISUALIZADO BAJO LUZ UV.....	62
TII.3 ALTURA Y RUGOSIDAD DE LAS TRES MUESTRAS ANALIZADAS POR AFM.	71

ANEXO I

TAI.1 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR A) ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	84
TAI.2 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR B) ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	86
TAI.3 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR C) ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	88
TAI.4 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR D) ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	90
TAI.5 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR E) ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	92
TAI.6 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR F) ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	94
TAI.7 COMPARACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL SENSOR G) ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	96

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La primera definición de estrés fue generada por el fisiólogo Austrohúngaro Hans Selye en 1950. Él determinó que el estrés «es el proceso iniciado ante un conjunto de demandas ambientales que recibe el individuo y a las cuales debe dar una respuesta adecuada poniendo en marcha sus recursos». En psicología la palabra estrés suele denominar situaciones que implican demandas fuertes para el proceso de adaptación del individuo, las cuales pueden agotar los recursos de afrontamiento (Perez-Guzman, Zonana-Nach, & Valles-Medina, 2009). Cuando la demanda del ambiente es excesiva frente a los recursos de afrontamiento que se poseen, se van a desarrollar una serie de reacciones adaptativas, de movilización de recursos, que implican una activación fisiológica (Cano, 2005).

En la actualidad, cerca de 45% de la población mundial presenta algún tipo de estrés, uno de los principales es el laboral. El tipo de vida que se lleva en las ciudades, ha provocado que el estrés no sea un problema que se presente únicamente en los adultos. Investigaciones en la Universidad de Ghent (Bélgica), y por la OMS (Organización Mundial de la Salud) expresan que si bien el estrés en la infancia y adolescencia es prevalente en el mundo entero, varía según los países. Por ejemplo, la prevalencia del estrés infantil en los Estados Unidos es de 27.5%, y entre un 20% y 24.5% en México. El estrés



*Hans Selye
(1907-1982)*

puede afectar seriamente la fisiología y la salud psicológica de los niños y convertirse en crónico en la adolescencia o la adultez (Michels, y otros, 2012).

Las encuestas de opinión y la mayoría de los estudios psicológicos son subjetivos y arrojan resultados cualitativos, por lo que una herramienta que pudiese cuantificar de forma objetiva el estrés de cada persona resultaría de gran ayuda. El cortisol o hidrocortisona es una hormona esteroidea, o glucocorticoide, producida por la glándula suprarrenal. Se libera como respuesta al estrés y a un nivel bajo de glucocorticoides en la sangre. La secreción de cortisol está gobernada por el ritmo circadiano de la hormona adenocorticotropa (ACTH); aumenta significativamente luego de despertar, debido a la necesidad de generar fuentes de energía luego de largas horas de sueño; aumenta significativamente también al atardecer debido a un factor evolutivo relacionado con la época de las cavernas (Weerth, Zijl, & Buitelaar, 2003).

Existen muchas enfermedades ligadas al estrés o niveles altos de cortisol, los cuales pueden ser medidos en la sangre, la saliva y la orina. Este tipo de estudios se llevan a cabo principalmente en laboratorios clínicos u hospitales para diagnosticar el síndrome de Cushing, causado por hipercortisolismo; y la enfermedad de Addison, causada por hipocortisolismo. Ya que los niveles de cortisol se encuentran íntimamente ligados al ciclo circadiano del sueño (Figura I.1), los niveles deben estudiarse cerca de sus picos principales, es decir, a las 8, 12, 16 y 20h (Nina, Ronkainen, Stanley, & Okon, 2014). Los análisis en saliva y orina han resultado tener una mejor fiabilidad en los resultados, pues la extracción de sangre para su análisis requieren de la realización de una punción venosa, lo que produce un estresor antes o durante la toma de la muestra, enmascarando los niveles normales de cortisol en sangre del individuo (Jessop & Turner-Cobb, 2008).

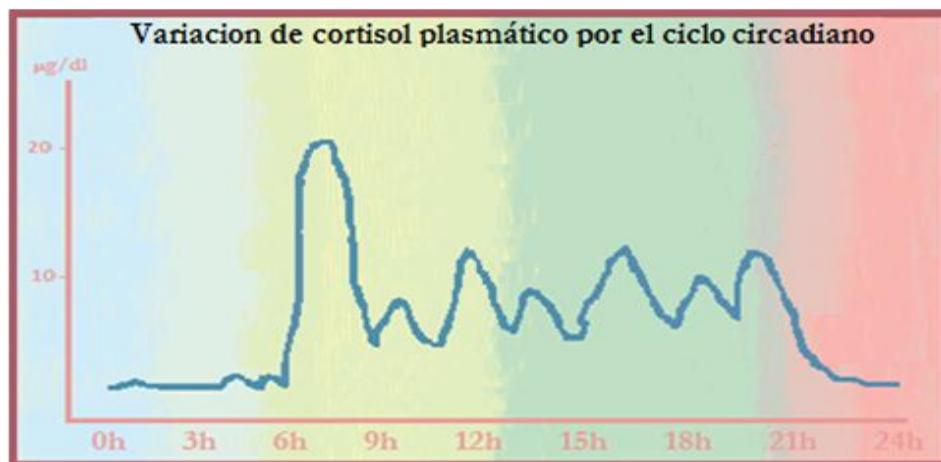


Figura I.1: Ciclo circadiano del cortisol F.1.1.

Es de destacar que los valores de referencia de cortisol pueden variar según la hora, la edad, el sitio de adquisición (sangre, saliva u orina) o por las metodologías de análisis (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas - ELISA; Radioinmunoensayo - RIA, Análisis en flujo - FIA, etc.). A diferencia de algunos otros biomarcadores, con el cortisol existen muchas enfermedades inducidas por el estrés por lo que se requiere de una herramienta de detección en tiempo real. El modelo donde las muestras de fluidos biológicos se recogen primero de pacientes en un laboratorio clínico, con un posterior procesamiento y análisis en laboratorios centralizados con un largo tiempo de espera durante el proceso y la posibilidad de falla en varios puntos del mismo, no funciona. Por lo tanto, un gran esfuerzo en los últimos años ha ido hacia el desarrollo de biosensores fáciles de usar para la medición *in situ* de los niveles de cortisol y el diagnóstico relacionado.

Nanomateriales, tales como nanotubos de carbono y la realización de nanocompuestos de polímero con metal se han utilizado en la detección de cortisol como el transductor químico resistivo y como la matriz de inmovilización de anticuerpos, respectivamente, para mejorar la sensibilidad y la selectividad de inmunosensores de cortisol electroquímicos (Nina, Ronkainen, Stanley, & Okon, 2014).

II. ESTRÉS EN LA VIDA ACTUAL

Actualmente se considera al estrés como el responsable de múltiples patologías, principalmente en aquellas personas que no saben controlarlo. Los estímulos estresantes que provocan una respuesta corporal fisiológica pueden ser físicos o psicológicos. Los estímulos físicos más comunes que producen estrés son: traumatismos, infecciones crónicas, calor o fríos intensos, cirugías, estímulos nociceptivos dolorosos, inmovilizaciones, hemorragias, hipoglucemia severa, alergias y falta de sueño (Figura II.1). Y los psicológicos más comunes son, las emociones fuertes, reacciones amorosas, ansiedad, problemas familiares y hasta situaciones de la vida diaria. Entre los acontecimientos vitales estresantes se indican como los más comunes, la muerte del cónyuge, un problema legal grave, quedarse sin trabajo, ruptura familiar, muerte de un familiar cercano, préstamo o hipoteca, embarazo (deseado o no), matrimonio, jubilación, enamoramiento, promoción laboral, festividades familiares y divorcio.

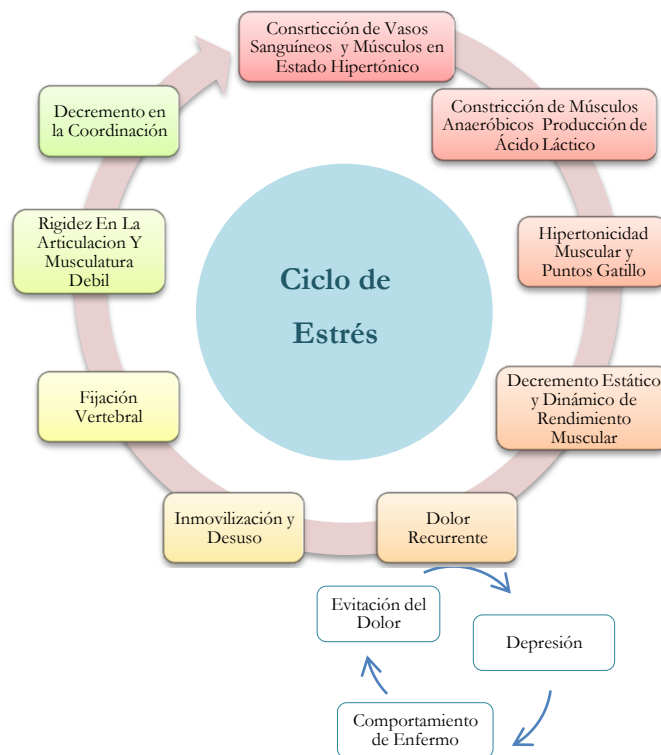


Figura II.1: Ciclo de Estrés F II.1.

Se considera que existen dos tipos de estrés, el Eutrés y el Distrés. El Eutrés se considera «el estrés bueno», el cual es necesario, pues es la cantidad óptima de estrés esencial para la vida, el crecimiento y la sobrevivencia. Este tipo de estrés nos incentiva permitiendo que nos enfrentarnos a los retos y adaptarnos a los cambios. Existe una cantidad de Eutrés óptima la cual permite un rendimiento óptimo de nuestras actividades.

Por otra parte el Distrés se considera un mal estrés, pues es dañino, patológico, destruye al organismo, es acumulable, mata neuronas del hipocampo, contribuye a producir patologías mentales, y acelera el proceso de envejecimiento, entre otros. Los efectos del Distrés se notan aún en etapas prenatales de la vida en las cuales se puede inhibir la androgenización del feto.

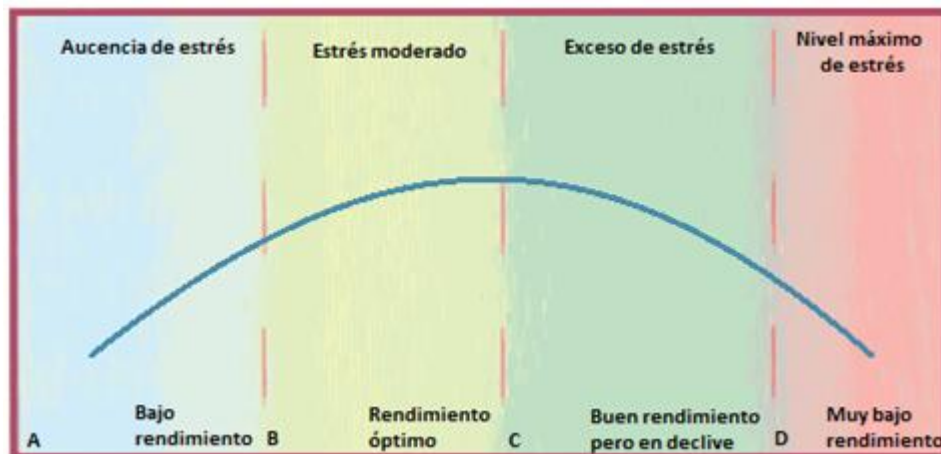
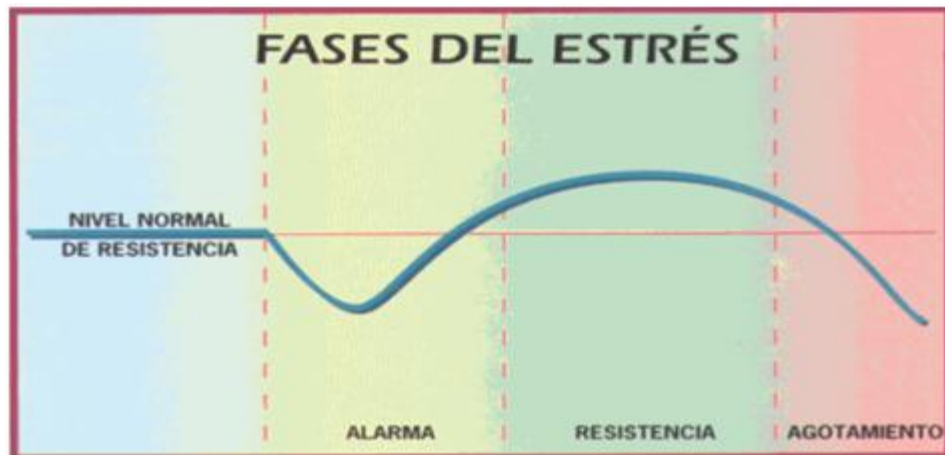


Figura II.2: Relación entre estrés y rendimiento F.II.2.

En la Figura II.2 se presenta la curva que describe la relación entre estrés y rendimiento de los individuos. En la zona A-B el sujeto tiene bajo rendimiento, es apático sin estímulos ni metas, esto indica que el no tener estrés también es malo. La zona B-C es la zona de rendimiento óptimo, el sujeto está motivado y satisfecho. En la zona C-D se percibe un exceso de estrés, el rendimiento del sujeto se encuentra en declive. La zona D-E es la zona de máximo estrés, el rendimiento es muy bajo y generalmente el sujeto está deprimido y/o ansioso (De Camargo, 2004).

Figura II.3: Fases clásicas del estrés: Alarma, Resistencia y Agotamiento
F II.3



Existen 3 fases de adaptación al estrés que pueden observarse en la Figura II.3. La fase de Alarma es inmediata a la percepción del estímulo estresante, la caracterizan la falta de reacción, la activación cortical y manifestaciones faciales o muecas que unidas al congelamiento inicial se denominan estado de shock. En la fase de Resistencia, nuestro organismo mantiene una activación fisiológica máxima tratando de superar la amenaza o adaptarse a ella, esta fase puede durar semanas, meses o años, si es muy larga se le considera como estrés crónico, pero, si el estresor[†] se termina es posible regresar a un estado normal. La fase de Colapso o Agotamiento se produce sólo si el estímulo estresante es continuo o se repite frecuentemente, el organismo agota sus recursos y pierde su capacidad de activación o adaptación (De Camargo, 2004).

1. Estadísticas sobre estrés en México

En Octubre de 2012 consulta Mitofsky realizó una encuesta telefónica para determinar qué tan estresado vive el mexicano promedio. Durante una semana regular el 55% dijo tener dificultades económicas, el 45% padecer problemas de tránsito, el 33% padecer depresión o cansancio excesivo, el 30% tener frecuentemente alguna discusión con familiares (como padres, hermanos o hijos), el 28% dijo sufrir algún dolor de cabeza, el 27% tener diferencias o discusiones con su pareja y solo un 9% declaró tener diferencias

[†]Un estresor es un estímulo estresante que puede ser de tipo físico o psicológico.

con su jefe o sus compañeros de trabajo. De los encuestados, las mujeres parecen ser las más propensas a sufrir de estrés en una semana regular, exceptuando los problemas en el trabajo y los problemas con el jefe o sus compañeros de trabajo. Por otra parte, en cuanto a la edad los jóvenes entre 18 y 29 parecen ser los menos estresados, sin embargo son los que mayormente afirmaron tener una discusión con su familia (Consulta Mitofsky, 2012).

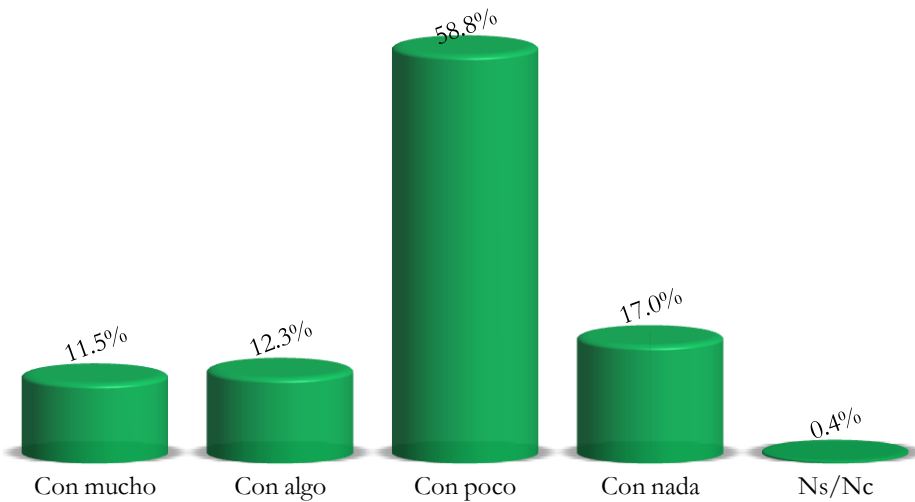


Figura II.4: Nivel de estrés de los mexicanos en 2012 FII.4.

El 76% de los mexicanos consideran que viven con poco o nada de estrés, y solo un 24% menciona tener mucho o algo de estrés (Figura II.4). Algunos de los grupos que destacan, por mencionar algunos que viven con mayor grado de estrés, son aquellos que están entre 30 y 49 años, con un nivel de escolaridad de primaria, secundaria o preparatoria, o aquellos que son casados y con un nivel socioeconómico bajo (Consulta Mitofsky, 2012).

En el año 2012 los mexicanos decían sentirse estresados por problemas económicos, inseguridad y tráfico. Pero de acuerdo a los resultados de la encuesta “Motivaciones de los mexicanos en el trabajo”, realizada por Randstad México (2013), el 57% de los mexicanos encuestados considera que el estrés laboral ha impactado negativamente en su vida. El estrés relacionado con el trabajo se puede definir como: el conjunto de reacciones emocionales, cognitivas, fisiológicas y del comportamiento, a ciertos aspectos adversos o

nocivos del contenido, la organización o el entorno de trabajo. El estrés laboral se caracteriza por generar altos niveles de excitación y angustia, con la frecuente sensación de no poder hacer frente a las situaciones que se presentan.

El 36% de los encuestados dicen sufrir dolores de cabeza, 29% de ansiedad, 19% de insomnio, 18% desgaste físico y psicológico, 17% irritabilidad y 10% depresión. Todo esto repercute en ausentismo, enfermedades psicosomáticas, accidentes laborales, distracción, apatía, errores recurrentes, nula motivación y carencia en las capacidades de innovación y creatividad (Randstad, 2013).

2. Enfermedades ligadas al estrés

Mantener los niveles de cortisol en sangre elevados por largo tiempo genera consecuencias, tanto físicas, psíquicas y organizativas. Las principales alteraciones físicas son: trastornos gastrointestinales, cardiovasculares, respiratorios, endocrinos, dermatológicos, musculares y alteraciones del sistema inmune.

Entre las principales alteraciones psíquicas se encuentran: la preocupación excesiva, confusión, dificultad para mantener la atención, desorientación, olvidos, bloqueos mentales, mal humor, susceptibilidad a sufrir accidentes y consumo de sustancias tóxicas. Si la persona sufre de este tipo de alteraciones por periodos prolongados puede llegar a desarrollar trastornos psicológicos como trastornos de sueño y de ansiedad, fobias, drogodependencia, trastornos sexuales, depresión, trastornos alimenticios y de personalidad o esquizofrénicos. Provocando deterioro en sus relaciones interpersonales, tanto familiares como laborales hasta llevarlas al punto de ruptura (Departamento de prevención de riesgos del trabajo, 2014).

III. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS

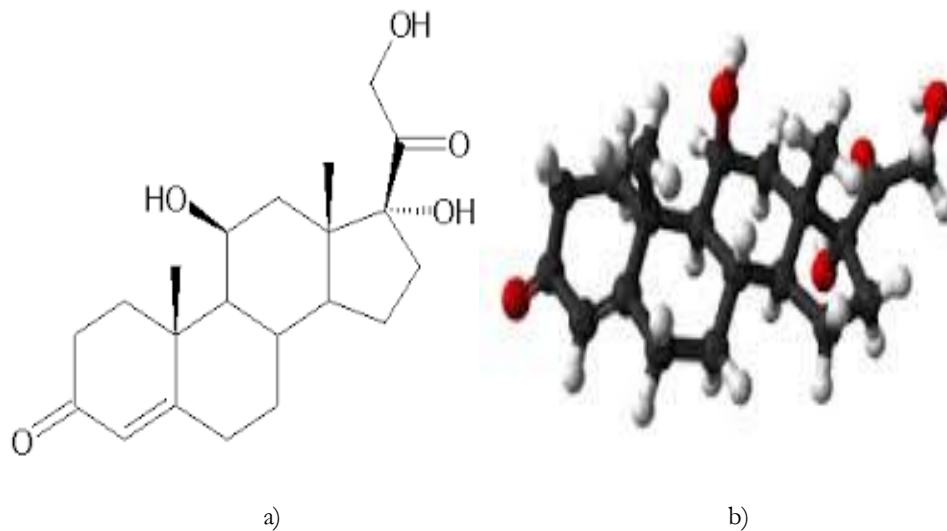
1. Cortisol

El cortisol o hidrocortisona (Figura III.1) es una hormona esteroidea o glucocorticoide producida por la glándula suprarrenal y derivada del colesterol. Tiene un peso molecular de 362.46 g/mol, con un área de 94.8 \AA^2 † (Drug-Bank). Se libera como respuesta al estrés y a un nivel bajo de glucocorticoides en la sangre. Sus funciones principales son incrementar el nivel de azúcar en la sangre a través de la gluconeogénesis, suprimir el sistema inmunológico y ayudar al metabolismo de la grasa, proteínas y carbohidratos. El cortisol desempeña un papel decisivo en la respuesta del organismo a diversos estímulos estresantes. Es inmunosupresor, antiinflamatorio y antialérgico, y posee una débil actividad mineralocorticoide. El cortisol aumenta el tono vascular, posiblemente potenciando los efectos de la catecolaminas, y bloquea los procesos que desembocan en la inflamación de los tejidos lesionados. Actúa en el SNC produciendo euforia, un efecto que podría llegar a mitigar los efectos del estrés (Pocock & Richards, 2004).

† 10 Å equivalen a 1 nm.

El cortisol circula en el plasma unido a una α_2 -globulina llamada transcortina; en condiciones normales esta proteína liga el 77% de esta hormona, mientras que la albumina une el 15% y, el 8% restante viaja libre. La vida media del cortisol en el plasma es de 90 min, en sujetos normales, el cortisol plasmático presenta un ritmo circadiano; se observa un nivel máximo antes de despertarse en la mañana, luego los valores decaen hacia la noche para alcanzar cifras inferiores a los 5 $\mu\text{g/dL}$ a las 22-24 hrs (Kelley, 1993). Recientemente se ha comprobado que los ascensos o descensos no son continuos, sino que el cortisol presenta breves pulsos secretorios de 20 a 100 minutos de duración (Cingolani & Houssay, 1945).

Figura III.1:
Molécula de cortisol a)
Estructura química y
b) Modelo de barras y
esferas F III.1



2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales

Se sabe que la síntesis de cortisol se encuentra bajo el control de la hormona ACTH, secretada por la adenohipófisis como respuesta al factor hipotalámico liberador de corticotropina (CRV). La ACTH interacciona con los receptores de la superficie celular acoplados a la proteína G y estimula la producción de cortisol aumentando su tasa de síntesis a partir del colesterol. La secreción de cortisol está regulada por un sistema de «feedback» negativo típico.

El aumento de cortisol actúa en la adenohipófisis, y probablemente también en el hipotálamo, inhibiendo la liberación de CRH y ACTH, lo que reduce su tasa de secreción (Figura III.2). La secreción de ACTH sigue un ritmo circadiano relacionado con el ciclo de sueño-vigilia, y esto se refleja en el patrón de secreción de cortisol. La concentración de cortisol en plasma es mínima alrededor de las 3 am, luego aumenta hasta un máximo entre las 6 y las 8 am, y vuelve a disminuir lentamente durante el resto del día (Figura I.1) (Pocock & Richards, 2004). Los corticosteroides, una vez sintetizados, no se almacenan en la suprarrenal, sino que se liberan a la circulación. La suprarrenal segrega diariamente 20 mg de cortisol y 0.15 mg de aldosterona.

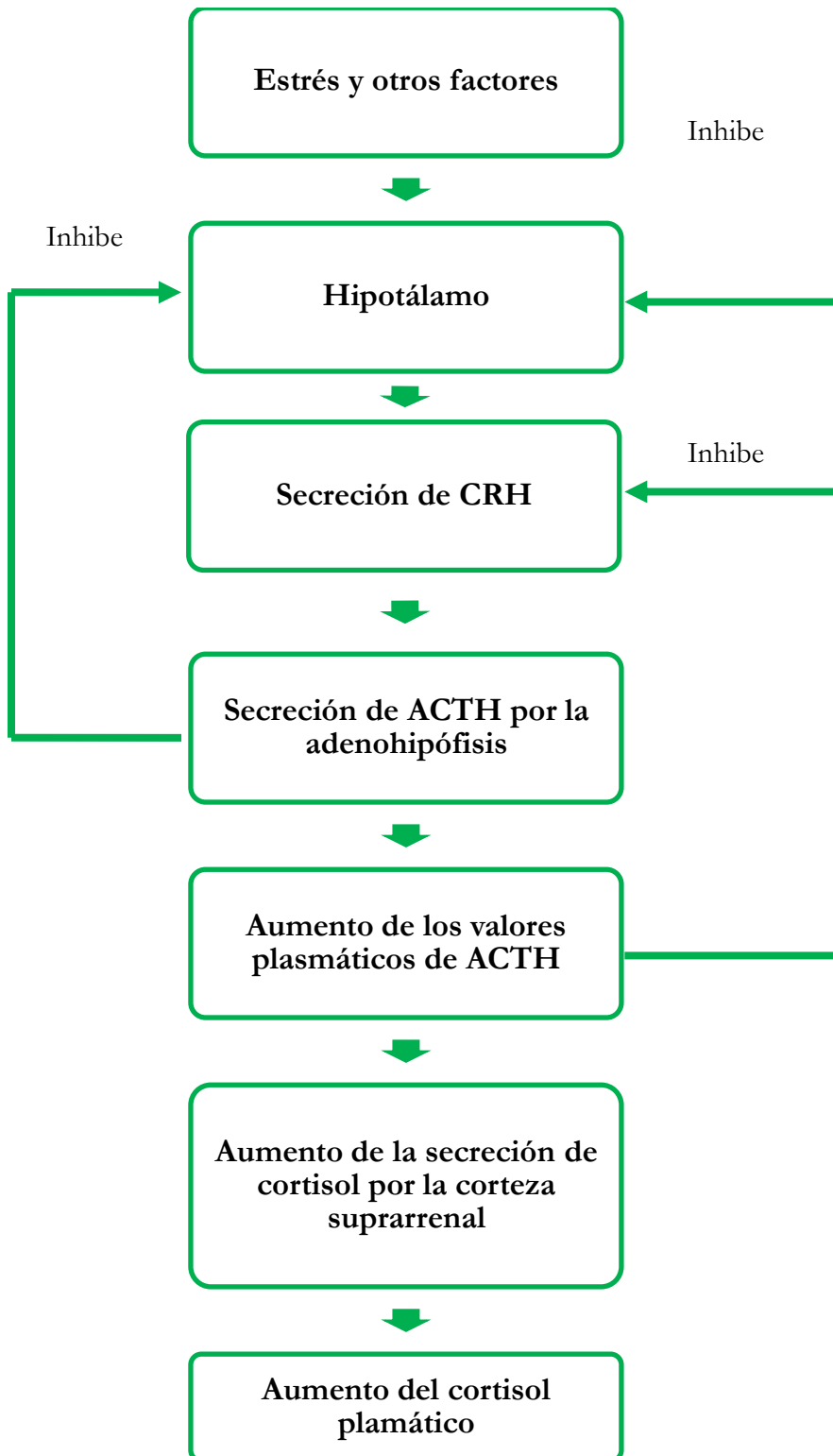


Figura III.2: Activación e Inhibición del eje Hipotálamo Hipófisis Adrenales F III.2

IV. SENSORES

Un sensor es un tipo de transductor que mide una energía que se desea controlar, convirtiéndola en otra de más sencilla cuantificación. Puede tener una indicación directa o puede estar conectado a un indicador, posiblemente a través de un convertidor analógico-digital, un computador y/o un visualizador, de modo que los valores detectados puedan ser leídos con facilidad.

1. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico, que se utiliza para la detección de un analito, que combina un componente biológico con un detector físico-químico (Figura IV.1). El elemento sensible puede ser: tejido, receptores celulares, enzimas, anticuerpos o ácidos nucleicos, o pueden ser creados por la ingeniería biológica. El transductor transforma la señal resultante de la interacción del analito con el elemento biológico en otra señal más fácil de cuantificar (Turner, Wilson, & Kaube, 1987). Un nanobiosensor, utiliza la nanotecnología para inmovilizar el bioreceptor selectivo para los analitos diana. Los Nanomateriales son excelentes sensores químicos y biológicos, su gran área de superficie ayuda a obtener reacciones rápidas y de bajo costo, utilizando una gran variedad de diseños, como nanopartículas de diversos tamaños, nanotubos de carbono o el uso de nanocristales (Urban, 2009).

Aunque el tipo de biomolécula utilizada puede variar ampliamente, los biosensores pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de bioreceptor o la interacción que involucra (Cullum & Vo-Dinh, 2000).

- Anticuerpo-Antígeno
- Enzimas
- Ácidos nucleicos-ADN
- Estructuras celulares-célula

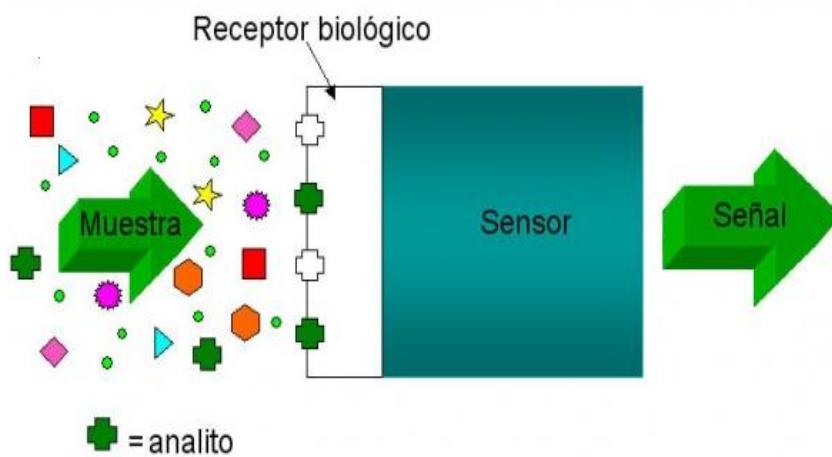


Figura IV.1: Esquema de un biosensor.

2. Inmunosensores

Un inmunosensor utiliza la afinidad de un anticuerpo con un antígeno específico. La interacción antígeno-anticuerpo es análoga a la de una llave con su cerrojo, es decir, el antígeno solo se unirá al anticuerpo si el antígeno tiene la exacta forma del anticuerpo, de otra forma, la unión no se llevara a cabo. La unión antígeno-anticuerpo resultan en un cambio físico-químico, que en combinación con un trazador fluorescente, enzimático, molecular o en unión con radioisótopos, puedan generar una señal medible.

Limitaciones del uso de anticuerpos en biosensores (Marazuela & Moreno-Bondi, 2002).

- La capacidad de unión del anticuerpo es fuertemente dependiente de las condiciones de ensayo, como el pH y la temperatura
- La interacción antígeno-anticuerpo es generalmente irreversible.

3. Tipos de transductores

Los biosensores se pueden clasificar por el tipo de transductor que utilizan, los más comunes son (Lud, Nikolaidis, Haase, Fischer, & Brauch, 2006):

- Biosensores electroquímicos

- Biosensores ópticos
- Biosensores electrónicos
- Biosensores piezoeléctricos
- Biosensores gravimétricos
- Biosensores piroeléctricos

4. Localización del biosensor

Otro tipo de clasificación de los biosensores es por su localización. Los biosensores *in-vivo*, son aquellos que son implantados en el cuerpo y miden de forma continua la molécula diana. Existen preocupaciones por la biocompatibilidad inmediata y a largo plazo. Un ejemplo de un biosensor *in-vivo* es el monitoreo de la insulina en el cuerpo. Los biosensores *in-vitro* son aquellos que tienen lugar en un tubo de ensayo, placa de cultivo u otro lugar fuera del organismo vivo, en este tipo de biosensores se utiliza un elemento biológico como detector y un transductor se utiliza para convertir la señal electroquímica a una cuantificable. Un ejemplo de un biosensor *in-vitro* es un glucómetro (Kotanan, Moussy, Carrara, & Guiseppi-Elie, 2012).

V. BIONANOTECNOLOGÍA

La bionanotecnología es un área multidisciplinaria relativamente nueva. Integra elementos de las ciencias biológicas, con las nanociencias y la nanotecnología, incluyendo áreas tan diferentes como la medicina o la ingeniería. El uso de nanomateriales para la fabricación de dispositivos médicos está basado en el hecho de que su uso, aporta un cambio significativo en las propiedades fisicoquímicas de sus componentes, donde una de las más importantes es el aumento de área ^(Institute, National Nanotechnology).

VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué características debe de tener un Nanobiosensor para obtener mediciones cualitativas de cortisol, que sea de fácil uso y con respuesta inmediata?

VII. HIPÓTESIS

En la actualidad existen numerosos biosensores para determinar la medición de cortisol, los cuales requieren de personal especializado, instalaciones y equipo especial. Por lo anterior, es posible generar un nanobiosensor capaz de determinar el nivel de cortisol salival mediante el uso de métodos colorimétricos o por fluorescencia, sin requerir de personal especializado o equipo especial.

VIII. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

Explorar caminos factibles para el desarrollo de un sensor que sea capaz de medir niveles de cortisol en saliva, mediante el uso de nanotecnología (prueba de concepto).

2. Objetivos particulares

- i. Diseñar y fabricar un sensor analítico en papel
 - Diseño computacional de geometría del sensor en papel.
 - Modificar la superficie del sensor para generar zonas hidrofóbicas e hidrofílicas en la celulosa correspondientes a los canales o paredes del sensor.
 - Diseñar, construir y caracterizar al menos dos tipos de sensores en papel y realizar pruebas con tintas para determinar la integridad y funcionalidad del sensor.

- Caracterizar por Microscopía Óptica el sensor en papel para identificar las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas.
 - ii. Investigar métodos de fluorescencia para la detección de cortisol
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en agua.
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en saliva artificial (SA).
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando saliva humana (SH).
 - iii. Investigar métodos de colorimetría para la detección en presencia de cortisol
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en agua.
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en SA.
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando SH.
 - iv. Investigar métodos de reacciones de cortisol, anticuerpos y nanopartículas de nanomaterial estructurado para su uso con colorimetría y fluorescencia
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en agua.
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en SA.
- Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando SH.

- v. Caracterizar por microscopía AFM los sensores en papel realizados

IX. JUSTIFICACIÓN

El estrés es un fenómeno adaptativo de los seres humanos que contribuye de forma importante a su supervivencia y al buen desempeño de sus actividades y de su vida (De Camargo, 2004). En la actualidad el ritmo de vida en las grandes ciudades atenta contra la salud de los individuos, ya que el sin fin de experiencias estresantes del día a día, repercuten en su salud a largo plazo, y representan una gran amenaza para la salud pública (Michels, y otros, 2012).

Por lo anterior, en la actualidad un dispositivo que sea capaz de medir de forma cualitativa o cuantitativa y no invasiva el nivel de estrés inmediato o crónico de una persona (los niveles de cortisol), de forma rápida, fácil y portable es de crucial importancia (Cohen, Janicki-Deverts, & Miller, 2007).

X. DELIMITACIONES

Debido a limitantes en tiempo y recursos para la realización del presente proyecto, únicamente se pretende evaluar la mejor respuesta de los sustratos utilizados, para determinar cuál de ellos podría ser utilizado como principio activo de un nanobiosensor de estrés comercial (prueba de concepto), el cual podrá ser desarrollado en un proyecto de Doctorado.

CAPÍTULO II

I. MEDICIONES EN SALIVA

En los últimos 50 años, el uso de saliva como solución fisiológica de diagnóstico ha aumentado de forma exponencial (Figura I.1). En un principio la saliva era utilizada como un instrumento para determinar las características de la salud oral. En la actualidad los avances tecnológicos han permitido comparar los componentes moleculares de la saliva con el suero permitiendo de esta forma que la saliva se convierta en un adecuado fluido de diagnóstico general (Streckfus & Bigler, 2002).

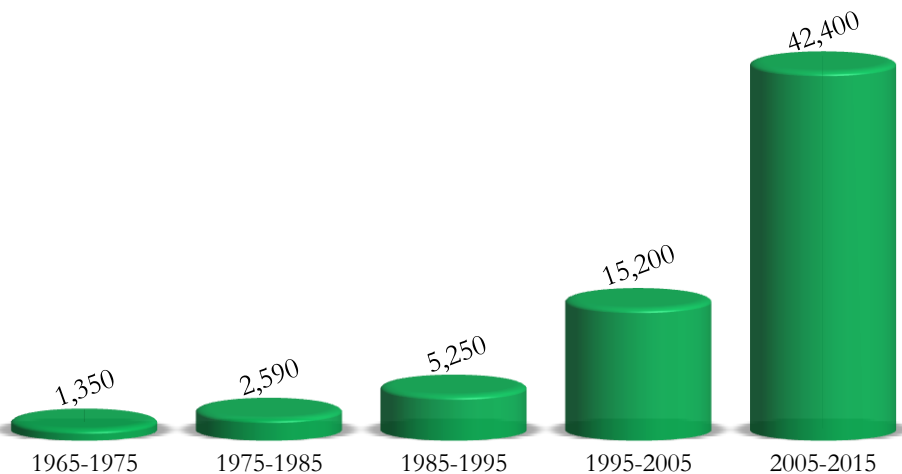


Figura I.1: Artículos basados en diagnóstico por saliva en intervalos de 10 años [F.I.1]

En la actualidad existen muchas áreas en las que se utiliza saliva para determinar un diagnóstico. En particular para la medición de hormonas como el cortisol ha resultado una herramienta muy útil, pues la hormona se encuentra en su forma libre en la saliva, y en el caso del plasma se encuentra libre y unida

a un receptor (IgG) (Read, 1989). Razón por la cual la mayoría de la tecnología actual se enfoca en medir el cortisol libre en saliva.

II. ESTADO DEL ARTE EN MEDICIONES DE CORTISOL

Los sensores químicos y biosensores se están utilizando en la actualidad cada vez con mayor frecuencia ya que resultan ser una atractiva alternativa al uso de los grandes y costosos equipos de los laboratorios y hospitales. Por décadas se han utilizado métodos electroquímicos, ópticos y piezoeléctricos, debido a sus ventajas: alto rendimiento, portabilidad, simplicidad y bajo costo (Bandodkar & Wang, 2014).

El cortisol viaja por el sistema circulatorio. Por ello puede ser cuantificado en diversos tipos de fluidos humano (orina, fluido intersticial, cabello, sudor, sangre y saliva), cada uno de ellos tienen sus ventajas y desventajas.

1. Fuente de análisis

i. Orina

Los niveles de cortisol en orina son medidos a lo largo de 24h y el resultado estaría dado en UFC (cortisol libre en orina, por sus siglas en inglés). En la orina únicamente se encuentra cortisol libre. El rango normal de cortisol en orina es de 1.99-10 $\mu\text{g}/\text{dL}/24\text{h}$ (Kelley, 1993). La orina es un método no invasivo e indoloro para obtener fluido con cortisol libre. El mayor inconveniente está en la recolección de orina por 24h. Ya que se requiere que el paciente realice la recolección de cada orina «sin pérdida» en un recipiente especial durante 24h, convirtiéndose en un inconveniente para la realización de su vida diaria. El recipiente debe ser guardado en refrigeración hasta el momento del análisis. Se pueden alterar los niveles de cortisol libre por medicamentos diuréticos o por embarazo. Debido a todo esto, este tipo de

estudios únicamente se realiza en los hospitales mientras el paciente se encuentra internado (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

ii. Fluido Intersticial

El fluido intersticial es el fluido que circunda las células (líquido extracelular), su composición es parecida al plasma sanguíneo, ya que el flujo es llevado a las células por los capilares. El fluido intersticial puede medirse por debajo de la piel pero la capa queratinizada de la epidermis bloquea el flujo, por lo que para obtener el fluido se requiere de algún tipo de abrasión mínimamente invasiva y dolorosa. Venugopal, y otros (2008), reportan la construcción de un láser abrasivo de baja energía que crea microporos en el estrato corneo (primera capa de la piel hecha de células muertas) del tamaño de un cabello humano. Se requiere de un proceso de vacío para succionar 10 $\mu\text{L}/\text{h}$ de líquido intersticial. Se reporta que el nivel de cortisol libre es de 3 a 4 veces más que en saliva (Vegnugopal, Arya, Chornoku, & Bhansali, 2011) haciéndolo mucho más atractivo para la detección de cortisol, pero limitado por la cantidad de fluido que se obtiene para la muestra y la posible infección por la generación del microporo (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

iii. Cabello

El análisis de cortisol en cabello es un método descubierto en la última década. El cabello humano tiene un rango de crecimiento de 1 cm/mes; el cortisol se encuentra en la médula del cabello pues entra por difusión pasiva desde el flujo capilar del cuero cabelludo. El cabello es usado como un análisis a largo plazo de los niveles de cortisol, basándose en la premisa de que cada centímetro del cabello representa hipotéticamente la acumulación de cortisol en el mes (en relación con la orina de 24h). Para extraer la muestra se requiere cortar el cabello lo más cercano al cuero cabelludo (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014). El primer análisis de cortisol en cabello fue reportado por Koren *et al.* (2002) en damanes[†] salvajes, la detección se realizó usando un protocolo de ELISA para saliva. En humanos el rango de referencia

[†]Damanes o Hyracoidea mamífero placentario originario de Africa

es de $1.7 \cdot 10^{-4}$ - $1.53 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}/\text{dL}$ (Sauvé, Koren, Walsh, Tokmakejian, & Van Uum, 2007). No se encontró correlación entre el cortisol en saliva y plasma y el cortisol del cabello. El mayor problema que presenta este análisis es la degradación del analito (cortisol en la medula) por el lavado del diario, y el uso de productos como lacas o geles a base de alcohol (Stalder & Kirschbaum, 2012).

iv. Sudor

El análisis en sudor es un método bien establecido en el diagnóstico de algunas enfermedades como la fibrosis quística y el abuso de drogas. El cortisol en sudor fue medido por Russell *et al.* (2012), con concentraciones 0.816 - $14.17 \mu\text{g}/\text{dL}$ existe una hipotética relación entre los niveles de sudor y cabello. Pero se requiere acumular una muestra representativa de sudor (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

v. Sangre

Más del 90% del cortisol en sangre está unido a la CBG (globulina unida a corticosteroides) o a albumina en suero. Únicamente el 10% restante se encuentra en su estado activo para inicializar el proceso del cortisol. Los niveles de cortisol en sangre varían de $5 \mu\text{g}/\text{dL}$ a la media noche y hasta $25 \mu\text{g}/\text{dL}$ a las 9 AM (Kelley, 1993). Adquirir la muestra de sangre para su análisis requiere de la realización de una punción venosa para la obtención de sangre, acción la cual contamina la muestra al aumentar los niveles de cortisol por la acción *per se* (Levine, Zagoory-Sharon, Feldman, Lewis, & Weller, 2007). Se requiere de equipo y atención especializada, así como de almacenamiento especializado previo al análisis (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

vi. Saliva

Existe una fuerte y bien documentada correlación entre los niveles de cortisol salival y sanguíneo (Teruhisa, Ryoji, Taisuke, Tatsuya, Fumihito, & Tatsuo, 1981; VanBruggen, Hackney, McMurray, & Ondrak, 2011) La saliva

únicamente contiene cortisol libre ya que éste es filtrado al pasar por los capilares y otros mecanismos fisiológicos para generar la saliva en las glándulas salivales. La toma de muestra es completamente indolora y no invasiva, existe un protocolo muy específico para la adquisición de la muestra (Van Caenegem, y otros, 2011). Pero es un protocolo tan sencillo que puede realizarlo cualquiera en la comodidad de su casa, y sin la contaminación del estrés generado por la adquisición de la muestra, por lo cual se convierte en la mejor opción para análisis en el punto de atención médica o sensores en tiempo real o continuo. Sin embargo existen algunos inconvenientes en cuanto a la medición de cortisol en saliva, pues los niveles normales son mucho menores a los sanguíneos, también existe el problema de que se requiere estabilidad la temperatura del almacenaje y extracción de la muestra. Los niveles normales de cortisol salival son de $6.89 - 199.35 \mu\text{g}/\text{dL}$ (Kelley, 1993), por lo que se requiere de una alta sensibilidad para detectar valores tan pequeños. Otro inconveniente es la presencia de sangre en la saliva elevando los niveles y enmascarando los resultados (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

2. Tipos de análisis

i. Colorimetría y fluorescencia

Los métodos colorimétricos y fluorescentes para determinar las concentraciones de corticosteroides son utilizados desde los años 50 siendo Porter y Silver (1950) de los primeros. El método colorimétrico se basa en el uso de químicos como el Fenilhidrazine, el Difenilamina y ácidos concentrados como el sulfúrico y el acético (Porter & Silver, 1950; Clark, 1955; Schulz & Neuss, 1957), fosfórico (Kalant, 1958) y alcoholes.

ii. Técnicas de Cromatografía

La técnica de cromatografía fue de las primeras técnicas ocupadas para la detección de cortisol. Se ha utilizado cromatografía líquida en conjunto con espectroscopía de masa para la cuantificación de cortisol tanto en saliva,

sangre, orina y cabello. La cromatografía de alto rendimiento en películas delgadas (HPTLC –por sus siglas en ingles) se ha utilizado para detectar la fluorescencia del cortisol en plasma. Este análisis, requiere de métodos complicados como la extracción de fase sólida para evitar detecciones de los componentes que interfieren con su especificidad (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

iii. Detección por Inmunoensayos

Un inmunoensayo, se basa en el principio de que dado un anticuerpo, este reconoce selectivamente a un único antígeno o analito. El RIA (Radioinmunoanálisis) es un método que involucra el uso de radioisótopos. Posteriormente se optó por el uso de marcadores fluorescentes, donde la fluorescencia es proporcional a la concentración del analito marcado.

Otro método utilizado es la electroquimioluminiscencia, que se basa en la excitación eléctrica que provoca una reacción exergónica que produce luz. De esta forma se puede determinar los anticuerpos unidos a cortisol libre (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014). El método de inmunoensayo más utilizado es el de ELISA, pues se ha determinado que es el método más sensible y versátil de la actualidad, se realiza típicamente en un formato sándwich, donde se añade un sustrato enzimático para el anticuerpo secundario que amplifica la señal colorimétrica o fluorescente, proporcionando de esta forma una alta sensibilidad. El uso de detección por ELISA se utiliza a menudo para validar los resultados obtenidos con nuevas técnicas (Small & Davis, 2007). Pero este ensayo se encuentra limitado por la necesidad de muestras de volúmenes altos, múltiples pasos y largos periodos de incubación. La resonancia de plasma superficial (SPR) es un método utilizado para evitar los largos procesos del ELISA sin sacrificar sensibilidad. El SPR funciona en el principio de oscilación de electrones en un sustrato que irradia con la luz, es altamente sensible a la adsorción de moléculas sobre el sustrato, sobre el cual se desplazan las curvas de resonancia. De esta forma mide cuantitativamente la

adsorción del analito en el anticuerpo (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

iv. Detección electroquímica de Inmunoensayos

En los últimos tiempos, la combinación de técnicas electroquímicas y técnicas inmunes ha resultado una buena alternativa para la detección de cortisol libre. Esta técnica se basa en el principio de la medición de las cargas eléctricas que pasan a través de un material conductor funcionalizado con anticuerpos. La variación en la carga una vez que se detectó el analito se relaciona con la concentración del mismo. El uso de microelectrodos y nanotecnología permite alcanzar una alta sensibilidad y muy bajos límites de detección así como menor costo de producción. La voltimetría cíclica es el método más utilizado en electroquímica, pero la impedancia electroquímica ha demostrado ser un método mucho más sensible. Este tipo de sensores tienen sus limitantes pues requieren de factores ambientales muy específicos debido al anticuerpo (temperatura, humedad pH exposición a la luz), hasta que estos problemas se puedan resolver, este tipo de técnicas no se podrán utilizar en puntos de atención (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

v. Detección en el Punto de Atención Médica

La miniaturización de sensores está siendo explorada altamente para la detección «en el punto de atención médica», pues de esta forma se pretende eliminar la probabilidad del error humano y el error por el volumen requerido. Se pretende que este tipo de sensores puedan implementarse en ropa o accesorios para dar seguimiento médico pues son autónomos, generan un monitoreo continuo, guardan datos y los procesan (Glaros & Fotiadis, 2005). Existen sensores microfluídicos, inmunocromatográficos e inmunoelectroquímicos. Estos dispositivos tienen tiempos de respuesta mucho menores, y pueden ser utilizados por el paciente (no requieren de entrenamiento previo) para monitorizar enfermedades crónicas físicas y psicológicas. Aunque ya existen dispositivos de fácil uso, tienen problemas

como la necesidad de un software y hardware especializado lo cual no siempre los hace portable (Kaushik, Vasudev, Arya, Khalid, & Bhansali, 2014).

En la Tabla II.1 se observa un análisis de las técnicas actuales, sus sustratos, fuente de análisis y tiempo aproximado de adquisición. Y en la Figura II.1 se observa de forma gráfica lo reportado en esta tabla.

Nº	Referencias	Tipo	Tiempo (min)	Fluido	Min (µg/dl)	Max (µg/dl)	
1	(Kelley, 1993)	Rangos Médicos	Rango normal de Sangre		5	24.9	
2			Rango normal Orina		1.99	10	
3			Rango normal Saliva		0.068	1.99	
4	(Kumar <i>et al.</i> 2007)	Investigación	Nanocables de Au Modo paralelizable conciente de integración (iAPM)	Sangre	3.6	12	
5	(Moreno-Guzmán <i>et al.</i> 2010)	Investigación	Electrodo de carbono pintado Pulso diferencial de voltametría (DPV)		0.0036		
6	(Liu <i>et al.</i> 2011)	Investigación	AuNP / AuIDµEs Voltametría de onda cuadrada		0.027		
7	(Rowe <i>et al.</i> 2007)	Investigación	Voltametría Cíclica (VC)	saliva	0.0016	0.25	
8	(Sun <i>et al.</i> 2008)	Investigación	Nanopartículas de Au(AuNP) VC		0.1	1	
9	(Shanmugan <i>et al.</i> 2011)	Investigación	Electrodo de AuNP VC		0.01	1	
10	(Yamaguchi <i>et al.</i> 2013)	Investigación	Tira de inmunocromatografía Medición indirecta por glucosa oxidasa (GOD)		25	0.00036	3.624
11	(Yamaguchi <i>et al.</i> 2009)	Investigación	Monocapa de autoensamblado (SAM) AuNP		35	3.60E-05	3.6
12	(Vasudev <i>et al.</i> 2013)	Investigación	SAM modifie IDE		30	0.02	
13	(Arya <i>et al.</i> 2011)	Investigación	AuNP VC			0.0192	
14	(Kirschbaum <i>et al.</i> 1989)	Investigación	Radio inmunoensayo (RIA) AuNP			0.003	
15	(Höferl <i>et al.</i> 2005)	Investigación	FIA Inmuno			0.1	
16	(Salimetrics)	Comercial	ELISA		14h	0.00017	0.015
17	(Aardala & Holm, 1995)	Investigación	Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)	60	0.018		
18	(Saiyudthong <i>et al.</i> 2010)	Investigación	VC		0.027		
19	(Sun <i>et al.</i> 2008)	Investigación	Fosfatasa alcalina / Electrodo de Au VC	50	0.1812		
20	(Michel <i>et al.</i> 2009)	Investigación	Resonancia plasmática de superficie (SPR) Sensor de Au	10	0.0049		

Tabla II.1: Técnicas actuales, tiempo de análisis y rango de detección de cortisol.

21	(Miguel , Pires , & Dong , 2014)		CLIA (inmunoanálisis de quimioluminiscencia altamente sensitivo) Capa de Au Película de Cr	6h		0.1	17.5
22		Investigación	OPD inmune				
		Comercial	ELISA			1.00E-04	0.05
23	(Arya <i>et al.</i> 2010a)	Investigación	AuID μ Es EIS			3.60E-05	36.24
24	(Arya <i>et al.</i> 2010b)	Investigación	AuID μ Es EIS			3.60E-05	36.24
25	(Ueno <i>et al.</i> 2013)	Investigación	rGo/AuIDA VC			0.01	0.08
26	(Pasha <i>et al.</i> 2014)	Investigación	VC			0.001	10
27	(Yamaguchi, <i>et al.</i> 2011)	Investigación	VC			0.1	
28	(BodiTechMedInc., 2010)	Comercial	Mini-ELISA	10		0.00035	15
29	(Sauvé <i>et al.</i> 2007)	Investigación	ELISA		cabello	1.6	
30	(Sauvé <i>et al.</i> 2007)	Investigación	Electrodo de Au CV		orina	2.9	29

rGo= óxido de grafeno reducido, AuIDA= electrodos de oro de matriz integrada, AuID μ Es= inmunosensor basado en microelectrodos de oro de matriz integrada

Técnicas de detección de cortisol

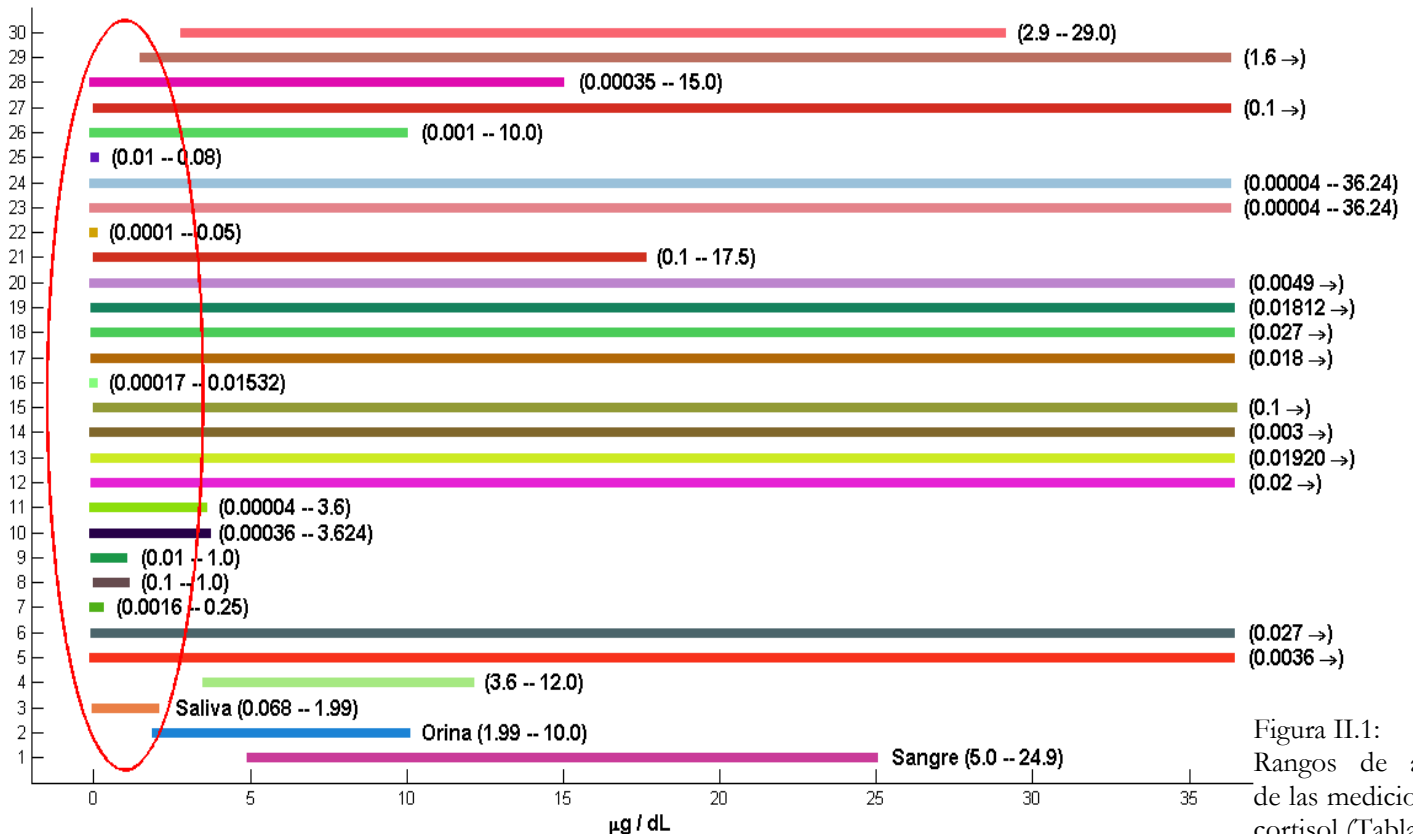


Figura II.1: Rangos de análisis de las mediciones de cortisol (Tabla II.1).

En la Figura II.1 se observa los rangos de medición de algunas técnicas actuales, dentro del óvalo rojo específicamente, se observan los sensores en desarrollo que tienen la sensibilidad para medir niveles de cortisol en saliva.

III. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS SENSORES ACTUALES

En la actualidad, los métodos, y en especial los sensores para medir cortisol (hidrocortisona) pueden ser más rápidos pero al mismo tiempo complejos, es decir, que si bien se siguen utilizando técnicas tan precisas pero laboriosas como el ELISA, también existe dispositivos de punto de atención médica, los cuales tienen tiempos de respuestas cortos pero con la necesidad de un software y hardware especial o métodos de adquisición de la muestra complejos.

Los métodos principales para detectar cortisol son 6, en la Figura III.1 se muestra su popularidad en los últimos 10 años.

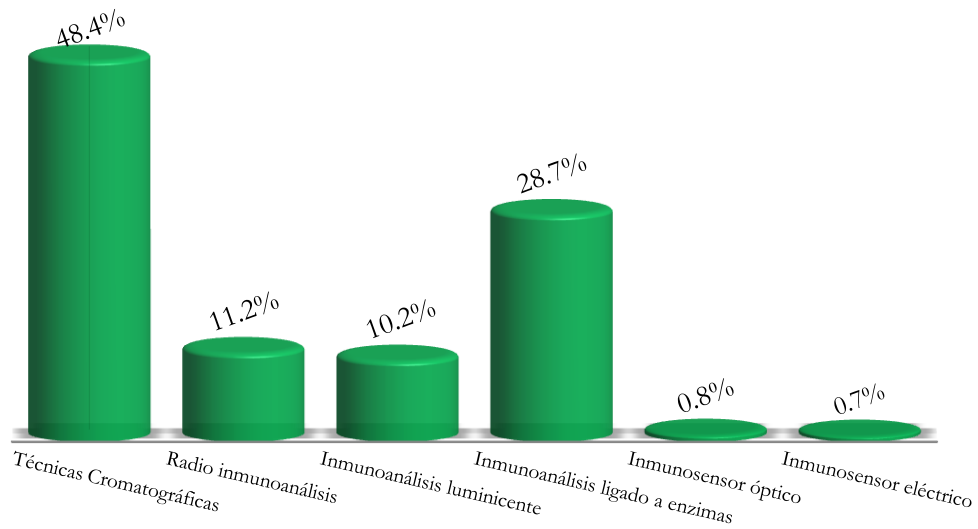


Figura III.1: Artículos basados en detección de cortisol (hidrocortisona) en los últimos 10 años F III.1

Como se ve en la figura anterior los sensores apenas equivalen el 1.5% de la investigación para detectar cortisol en los últimos 10 años y las técnicas cromatográficas son las más socorridas con un 48%. Pero esto no significa que no son de importancia, al contrario los artículos relacionados con

sensores para la detección de cortisol son pocos ya que este tipo de investigación no tiene más de 100 artículos por año pues su implementación es reciente.

Estos sensores, basan su funcionamiento principalmente en la electroquímica, el inmunoanálisis y la cromatografía. El uso de SPR (Michell, Lowe, & Ingram, 2009) e ID μ E (microelectrodos integrados) (Arya, Chornokur, Venugopal, & Bhansali, 2010) son los principales métodos usados en sensores inmuno-modificados. El uso de nanomateriales (Liu, Zhao, Mao, Feng, Liu, & Wong, 2011; Kumar, Aravamudhan, Gordic, Bansali, & Mohapatra, 2007), para amplificar el área de reacción y minimizar el tamaño del sensor también es una parte muy importante de la investigación en el tema. Los sustratos más utilizados para hacer un análisis electroquímico son capas o nanopartículas de Au (Liu, Zhao, Mao, Feng, Liu, & Wong, 2011; Tilli, Myung, Shatty, & Mulchandani, 2011) modificadas con anticuerpos marcados con alguna enzima fotoluminiscente (Pires & Dong, 2014) o no. Estos materiales también son usados para detectar concentraciones con ayuda de electroquímica -voltimetría cíclica (Sun, Ramgir, & Bhansali, 2008)-.

IV. LIMITANTES DE LOS SENSORES ACTUALES

Los sensores que se están desarrollando en la actualidad desean cubrir las necesidades actuales para sensores de detección en punto de atención médica. Más aún, los sensores actuales de cortisol que se están desarrollando para puntos de atención, si bien son de tamaño pequeño y portable, tienen limitantes como el software especializado, volumen de la muestra de análisis tiempo de respuesta y protección del sensor del medio ambiente (luz, temperatura y humedad). Aunque cuentan con estas limitantes, no hay que olvidar que como la mayoría presenta el uso de nanotecnología su sensibilidad es mucho mayor a los métodos del laboratorio (ELISA, RIA etc.) sin sacrificar tiempo de análisis o la necesidad de protocolos complejos.

Como la mayoría de los sensores que se ocupan en el análisis de cortisol se basan en electroquímica, fluorescencia (luminiscencia) o inmunología se requieren de métodos de análisis complejos (intrínsecos en el software) que una persona común no sería capaz de realizar. Por lo que si bien este tipo de sensores son buenos para punto de atención médica, no son para uso domésticos. Un sensor de uso doméstico, además de portátil, requiere ser simple, es decir, que el usuario sea capaz de utilizarlo sin requerir de conocimientos previos, unos ejemplos de estos sensores son: el sensor de glucosa, y un sensor de embarazo.

El futuro para la realización de mediciones en el punto de atención médica más allá de ser una herramienta en el consultorio médico, debería de ser un análisis de rutina para monitoreo de enfermedades crónicas o del mantenimiento de la salud física o psicológica. Por ello, la aportación de un sensor que sea capaz de medir la presencia de cortisol portable, sin la necesidad de equipo especializado, de respuesta inmediata y con la ventaja de ser usado por cualquier persona es de esencial importancia.

CAPÍTULO III

I. EQUIPO

- BioDrop μ LITE (BioDrop)
- Campana de flujo laminar
- Espectrofotómetro de micromuestra Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™)
- Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™)
- Esterilizador eléctrico de vapor a presión 25X (Alfa Medical)
- Impresora de cera Xerox Phaser™ 8560 (Xerox Corporation)
- Lámpara UV (ADIR®), $\lambda = 365$ nm
- Limpiador ultrasónico Branson 2510R-MT (Branson Ultrasonics)
- Microscopio AFM (MultiMode® DI-Instruments, EE.UU.)
- Microscopio óptico VGA 10X (Nikon)
- Sistema de purificación de agua *Milli-Q*® integral (Merck Millipore)

II. METODOLOGÍA POR OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1. Diseño y fabricación del sensor analítico en papel

Se generó el diseño del sensor con la ayuda de un software de diseño asistido por computadora (Sketchup versión 8.0.4810 ®, Google 2010). Se realizó una investigación previa sobre la realización de sensores microfluídicos en papel (Giovindasamy, Potgieter, Land, & Muzenda, 2012; Martinez, Phillips, & Whitesides, 2000; Olvera, Batina, & Cadena, 2013) y se determinó que el tipo de sensor más adecuado para este proyecto sería aquel que tuviese una geometría con canales, zona de reacción y zona de distribución central. Se realizaron varias propuestas para el diseño del sensor, que se muestran en la Figura II.1.

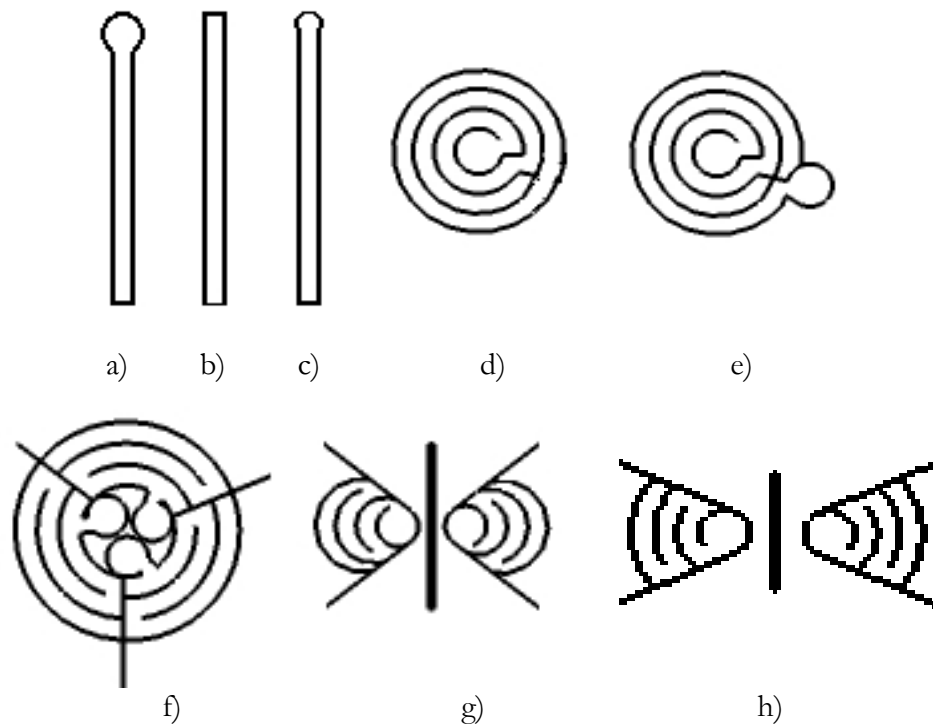


Figura II.1.: Propuestas de diseño para el sensor.

- i. Modificar superficie del sensor para generar zonas hidrofóbicas e hidrofílicas.

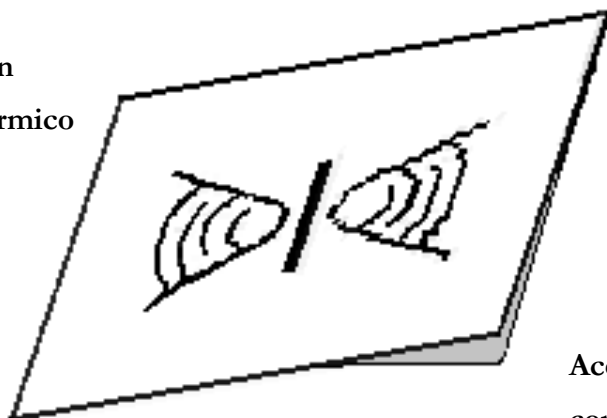
Con base en el procedimiento descrito en la patente MX/a/2013/014704 (Olvera, Batina, & Cadena, 2013), se generaron las barreras hidrofóbicas en la superficie hidrofílicas como se describe a continuación:

- Imprimir el diseño del sensor utilizando la impresora Xerox Phaser 8560, en papel cromatográfico (1 CHR) Whatman.
- Aplicar tratamiento térmico al sensor para homogenizar el material hidrofóbico. Para determinar el tiempo de exposición al calor, se probaron diversos tiempos $t_E = [0.25, 0.3, 0.5, 0.6, 1, 1.5, 2, 3]$ minutos.
- Se deja enfriar el sensor por 10 minutos.
- Con ayuda de una solución coloreada se determinó la funcionalidad del sensor, evaluando la resistencia de la barrera hidrofílica y la velocidad del movimiento del fluido.

El tratamiento térmico derrite el material hidrofóbico, permitiendo que se introduzca e impregne las fibras de celulosa que conforman al papel. Cuando éste se enfría, las fibras antes hidrofílicas ahora se comportan hidrofóbicamente. Esto únicamente le sucede a la superficie que tuvo contacto con el material hidrofóbico (cera), por lo que el resto de la superficie conserva su habilidad para absorber soluciones acuosas.

Una vez realizados los diseños de los sensores y haberles aplicado el tratamiento térmico es necesario probar la funcionalidad de la barrera hidrofóbica. Para ello se les colocó en la parte inferior cinta de acetato de celulosa con adhesivo (cinta adhesiva) convirtiendo la parte inferior en hidrofóbica, para evitar de esta forma fugas del fluido (Figura II.2).

**Sensor con
tratamiento térmico**



**Acetato de celulosa
con adhesivo**

Figura II.2: Sensor con tratamiento térmico y acetato de celulosa con adhesivo.

- ii. Construcción, caracterización y realización de pruebas hidrofílicas al sensor para determinar su correcto funcionamiento usando métodos de microscopía óptica

Se adquirieron las medidas de cada sensor, antes y después del tratamiento térmico (véase A.I[†]), así como imágenes utilizando el microscopio óptico Nikon 400x. A partir de este punto, se trabajara únicamente con el sensor «ojos de búho» («OBD») (Figura II.1h) pues se ajusta más a los parámetros deseados. Esto se explica con mayor detalle en el Capítulo IV.I.1 (este diseño no se encuentra en la literatura, es decir, se trata de un diseño original desarrollado en el LNIM de la UAM-I por Paulina Hernández Garcés y Nikola Batina, en 2015).

Se generaron plantillas de los 8 sensores para realizar diversas pruebas para seleccionar el que mejor satisfaga las necesidades del proyecto. En la Figura II.3 se encuentra la plantilla del sensor «OBD», que cuenta con canales y zona de reacción (Figura II.4). Las dimensiones de la zona de reacción deben de generar un área lo suficientemente grande para ser apreciada con facilidad por el ojo humano, pero lo suficientemente pequeña para ser costeable al ser usado con nanomateriales (Figura II.5).

[†] En A.I se encuentran las caracterizaciones de los sensores de la Figura II.1.

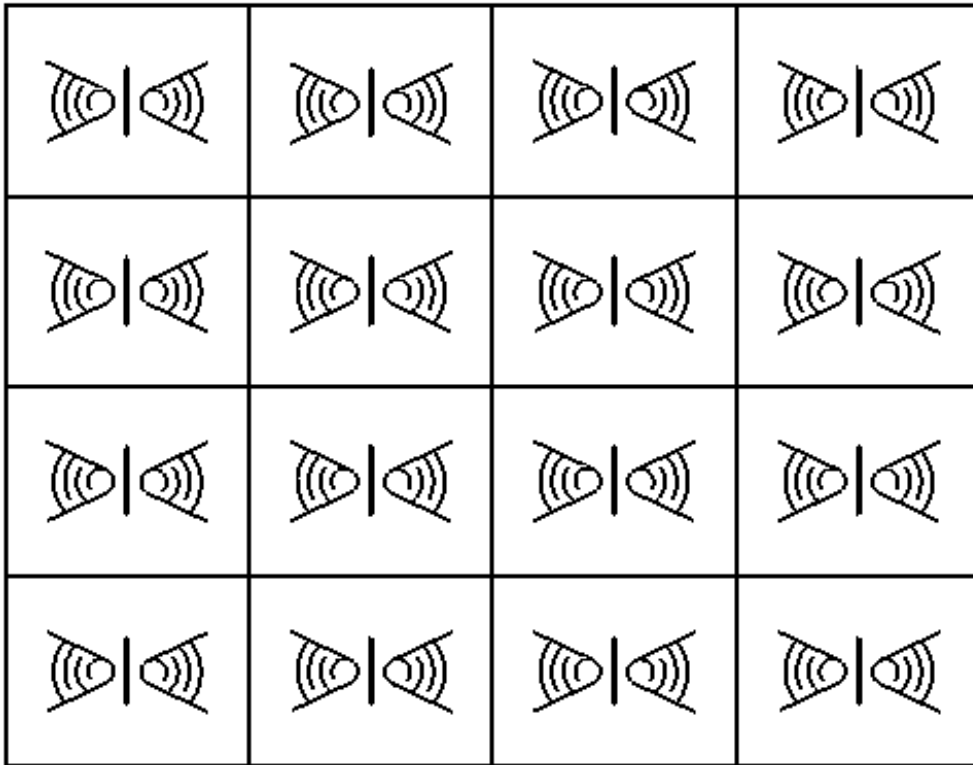


Figura II.3: Planilla del sensor «ODB» seleccionado.

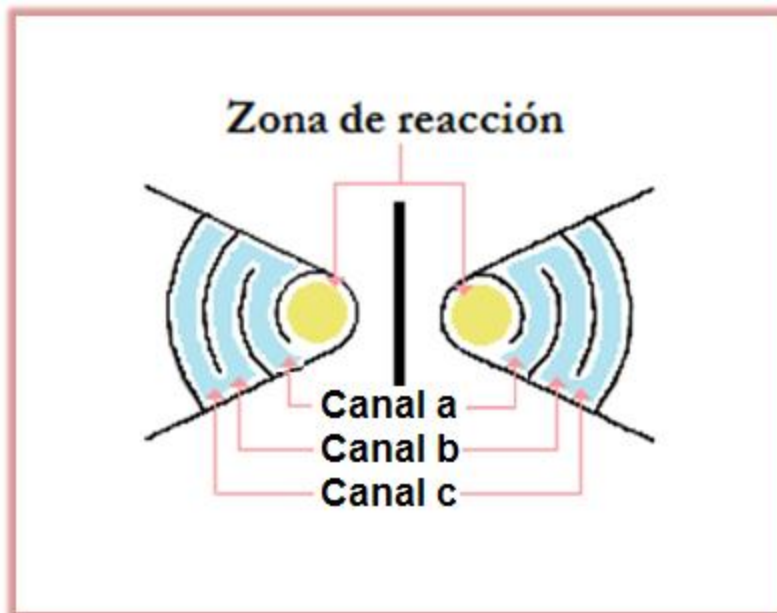
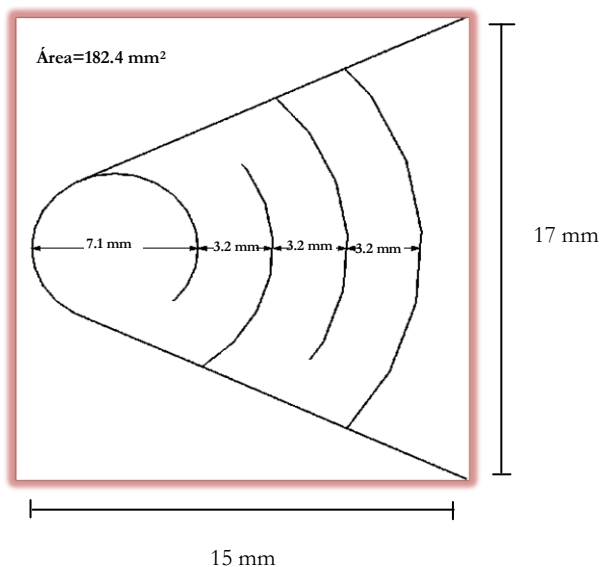


Figura II.4: Zona de reacción y canales del sensor «ODB».

Figura II.5: Dimensiones del sensor «ODB».



El sensor «ODB» está formado por dos zonas, el área reactiva (lado izquierdo del sensor) y el área control (lado derecho). Ambos lados tienen un área total de 87.9 mm². El diámetro de la zona de reacción es de 7.1 mm con un área de 18.9 mm², por otro lado los canales tienen un ancho de 3.2 mm y una longitud total aproximada de 34.5 mm lo cual genera un área de 87.9 mm². El sensor puede inscribirse en un cuadrado de 15 X 17 mm.

Se tomaron medidas de las dimensiones del sensor «ODB» antes y después del tratamiento térmico. Posterior a estas mediciones se adquirieron imágenes del sensor con el microscopio óptico Nikon 400X para observar el material hidrofóbico y como se modifica su hidrofobicidad después del calor.

Para comprobar la funcionalidad e integridad de la barrera hidrofóbica, se hicieron pruebas con una solución coloreada con Rodamina-b (véase A.II[†]). Con ayuda de esta solución se comprobó la metodología de diseño, así como el tiempo y volumen que le toma al líquido llenar cada canal (a, b y c) optimizando el volumen de la muestra y el tiempo de llenado.

[†] En A.II se encuentran todas las soluciones reactivas utilizadas.

2. Implementación de métodos colorimétricos y fluorescentes, para la detección de cortisol salival

Para la detección por color de cortisol en saliva se emplearon dos reactivos químicos: Fenilhidrazine (proporcionado por Sigma Aldrich, EE.UU) (Porter & Silver, 1950; Schulz & Neuss, 1957) y Difenilamina (proporcionado por Sigma Aldrich, EE.UU) (Schulz & Neuss, 1957), así como diversos colorantes como Cristal Violeta (CV), Rodamina-b, pinturas para óleo (Lefranc & Bourgeois) y colorantes vegetales (McCormick®). La literatura consultada hace referencia al uso de estos reactivos siempre en solución, por lo que fue necesario realizar modificaciones en su preparación para su empleo (véase A.II) en el sensor[†].

† El uso de ácidos fuertes puede generar daño en la celulosa del sensor.

El primer paso fue modificar la solución de Porter y Silver para evitar usar ácidos fuertes que pudiesen dañar el papel del sensor (S-FH). Para manipular la Fenilhidrazine es necesario usar equipo de protección (guantes, cubre bocas, bata y anteojos protectores), pues es un reactivo irritante y cancerígeno. En la literatura se utiliza Fenilhidrazine siempre en compañía de ácidos fuertes como el H₂SO₄ y ácido acético (**Aa**), así como el uso de alcohol. Se modificó la solución con diferentes concentraciones de ácido o alcohol. También se agregaron diversos colorantes para verificar si se maximizaba la reacción de respuesta.

En el caso de la Difenilamina se utilizó una combinación de H₂SO₄ concentrado y Aa glacial (Schulz & Neuss, 1957) (S-DA), la reacción debe realizarse en la campana de extracción ya que la combinación genera gases. En este caso, también se agregaron colorantes para maximizar la reacción.

Como prueba final, se utilizó una mezcla de ambas sustancias, para verificar si de esta forma se maximizaba la reacción colorimétrica.

Los colorantes que se utilizaron para maximizar las reacciones colorimétricas se encuentran en el anexo A.II. La cantidad de CV adicionada,

dependió de cada solución, pues el color desaparecía con el tiempo por lo que se agregaba poco a poco hasta que el color se estabilizara. Con la Rodamina-b no sucedió eso, por lo que se agregaron 500 μL de Rodamina-b a cada solución. Se estudió la fluorescencia generada por cada solución, pura o combinada con algún colorante, con la ayuda de una lámpara UV.

iii. Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en agua

Se utilizaron la S-FH y la S-DA, simples y con distintos colorantes, con y sin AuNP, en medio acuoso o en aceite, con y sin H_2SO_4 , y con y sin alcohol (véase A.III[†]). Una vez determinadas las soluciones con las que se decidió trabajar, se comenzaron a hacer pruebas directamente en los sensores «ODB». Posteriormente los sensores fueron probados con: H_2O pura, o con diferentes concentraciones de Hidrocortisona (HC) (véase Tabla II.1) y finalmente con saliva (artificial y real).

† En A.III se encuentran todos los experimentos realizados y sus especificaciones.

Ya que aún no conocíamos la reacción a esperar de cada reactivo, como primer paso, se aplicó las soluciones a los sensores con la ayuda de un pincel, para de esta forma agregar una película homogénea en toda el área del sensor. Cabe mencionar que las soluciones aún no contaban con NP; una vez añadidas las nanopartículas (NP) a la ecuación, fue necesario depositar la solución en el sensor, con la ayuda de micropipetas (véase A.III[†]). La agregación de NP a la solución es para aumentar el área de reacción de la solución, aumentando de esta forma la sensibilidad al analito (cortisol). Se deseaba que el reactivo únicamente se encontrara en la zona de reacción, y que en ningún momento invadiera los canales, por ello se hicieron pruebas con distintos volúmenes (10, 5, 2, 1, 0.5, 0.4, 0.3 μL) hasta obtener la cantidad exacta para que el líquido no invadiera los canales (a, b o c; véase Figura II.4).

† En la Figura A.III.2 se ejemplifica la aplicación de la solución reactiva.

La solución reactiva se agregó en ambos lados del sensor; el lado izquierdo se utilizó para evaluar la funcionalidad del reactivo, y el lado derecho como control. Para evaluar la funcionalidad, se empleó un modelo de cortisol

(Hidrocortisona –proporcionado por Sigma Aldrich-) en agua (H₂O desionizada ultrapura *Milli-Q*) (véase A.II) a distintas concentraciones. Se llevaron a cabo cuatro distintas diluciones de la solución stock «H», para evaluar los reactivos incluyendo en ellas los niveles de normalidad en saliva (véase Tabla II.1).

	µg/dl
H	18
H1	9
H2	1.8
H3	0.9
H4	0.1

Tabla II.1:
Concentraciones de HC.

Después de depositar la solución reactiva en el sensor, se esperaba a que el sensor seicara superficialmente (1h de secado) o prolongadamente (24h de secado). Una vez seco el sensor se añadió la solución reactante y se esperó a que seicara para determinar si la reacción fue favorable.

Una vez ya obtenida una reacción favorable del reactivo, es momento de añadir las NP[†]. Se utilizaron AuNP (Nanopartículas de oro) con un diámetro de 20 nm en solución coloide (proporcionado por TED PELLA, INC). Se agregaron a la solución reactiva en una proporción de 10 µL/mL de solución reactiva. Se agregaron 0.3 µL de la solución reactiva con AuNP a cada lado del sensor «ODB», para posteriormente evaluar su reacción con las soluciones de HC en agua y se esperó a que seicara para determinar si la reacción fue favorable.

† El procedimiento para agregar las AuNP a la solución reactiva se explica detalladamente en el A.II.

- iv. Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en saliva artificial (SA)

Se siguió el mismo procedimiento que en el punto anterior, es decir, se depositaron 0.3 µL de la solución reactiva con AuNP a ambos lados del sensor para posteriormente evaluar su reacción con las soluciones de HC, pero en este caso se utilizó un modelo de saliva artificial (proporcionado por

UNAM) como líquido base. Se esperó a que el sensor seicara para determinar si la reacción seguía siendo favorable con el modelo de SA.

v. Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando SH

Se prepararon los sensores con el protocolo descrito con anterioridad, pero en este caso se comprobó su reactividad con la saliva de dos sujetos experimentales[†]. Antes de tomar la muestra se pidió a los sujetos que respondieran unas preguntas (véase Tabla II.2). El nivel de estrés de cada sujeto experimental, fue determinado por el sujeto mismo, en una escala del 1-5, siendo 1 «Muy Bajo» nivel de estrés y 5 «Muy Alto» nivel de estrés. El protocolo para la adquisición de la muestra se encuentra en el anexo A.II, en la sección de Protocolos.

[†] No se realizó un estudio previo para determinar la concentración de cortisol de cada sujeto.

Tabla II.2:
Características de los sujetos experimentales con S-FH.

	Sexo	Edad	Nivel de estrés	Horas de sueño
S1	Femenino	27	Normal	8h
S2	Femenino	28	Alto	6h

De igual forma, se esperó a que los sensores secaran después de agregado el analito, para determinar la funcionalidad del reactivo.

3. Investigar métodos inmunológicos de cortisol, y nanopartículas para su uso con colorimetría y fluorescencia.

Se deseaba explorar la posible extrapolación de métodos de ensayos inmunológicos a papel. Como primer paso se agregó la solución de HC en agua y en SA a una solución de anticuerpo (Anti-Cor) en PBS (véase A.II). Se dejó incubar por 30 minutos (Salimetrics I.) para que se produjera la reacción antígeno-anticuerpo y se midió con ayuda de un espectroscopio (Genesys UV-Vis). Se intentó verificar si añadiendo AuNP, se lograba percibir algún cambio, al funcionar como catalizador.

- i. Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en SA

El siguiente paso fue marcar el anticuerpo (Anti-Cor – proporcionado por Sigma Aldrich) con peroxidasa de rábano picante (proporcionado por Sigma Aldrich) (**ap**), una enzima utilizada en ensayos ELISA directo. Posteriormente al marcado[†], se agregaron AuNP (**apAuNP**) para aumentar el número de anticuerpos que se agregarían al sensor «ojos de búho» en la zona de reacción, formando de esta forma un «nano-ELISA» directo. Se agregaron 0.3 μL de la solución a la zona reactiva de ambos lados del sensor, para que el lado derecho actué como control negativo, y posteriormente al secado, se agregó la solución de SA con HC, para verificar la respuesta después de la unión antígeno-anticuerpo (HC - Anti-Cor). Para maximizar la visibilidad de la reacción, se añadieron distintos colorantes (CV, NM, Colorantes vegetales –amarillo, rojo y verde-) a la zona reactiva (0.5 μL), antes de agregar los 0.3 μL de la solución apAuNP. Posterior al secado (10 min) se agregó la SA con y sin HC para verificar la reacción. En un estudio ELISA directo habitual el tiempo de incubación es de hasta 2h.

† El procedimiento para marcar el anticuerpo se encuentra en la sección de protocolo del A.II.

La tercer prueba fue realizar un nano-ELISA tipo «sándwich» (Salimetrics, 2014), el primer paso para esto fue marcar con la peroxidasa de rábano picante la IgG (de suero humano – proporcionada por Sigma Aldrich-) (**Ip**), posterior al marcado, se agregaron AuNP a la solución (**IpAuNP**), por otra parte, también se agregaron AuNP al Anti-Cor (**aAuNP**). Al sensor se agregaron 0.3 μL de aAuNP en la zona reactiva, previamente coloreada con la pintura vegetal. Una vez seca, se agregaron 0.3 μL de la solución de IpAuNP. Una vez seco el sensor (10 min), se agregó la SA con HC para verificar su respuesta.

Con el nano-ELISA tipo «sándwich» se realizó una evaluación de respuesta a diferentes concentraciones y en diferentes rangos de tiempo

(después de agregado el sustrato al sensor «ODB»). Las concentraciones y los tiempos utilizados se encuentran en la Tabla II.3.

Tabla II.3: Análisis concentración de HC vs. Tiempo, en sensor «ODB» con anticuerpos. (Los valores de las concentraciones de HC están en la Tabla II.1)

Tiempo	Concentración			
	2 min	H	H1	H3
30 min	H	H1	H3	H4
20 horas	H	H1	H3	H4
24 horas	H	H1	H3	H4

ii. Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando SH

Una vez confirmada la reacción positiva de la solución reactiva (HC en SA), se agregaron muestras de saliva de 5 sujetos diferentes (Tabla II.4).

Tabla II.4: Características de los sujetos experimentales evaluados con el «ODB» modificado con nano-ELISA tipo «sándwich».

	Sexo	Edad	Nivel de estrés	Horas de sueño
S1	Femenino	28	Alto	9h
S2	Femenino	50	Normal	6h
S3	Masculino	61	Muy Alto	10h
S4	Femenino	27	Normal	9h
S5	Masculino	36	Alto	5h
S6	Masculino	33	Normal	6h

III. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

4. Caracterización de los sensores en papel con AFM.

Se tomaron barridos de superficie en modo «typing» con el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), de la zona reactiva del sensor «ODB» con la mejor respuesta (modificación con anticuerpos para generar un nano-ELISA «sándwich»), se prepararon 2 modificaciones.

- Zona reactiva después de tratamiento térmico
- Zona reactiva después de tratamiento térmico + aAuNP + IpAuNP
- Zona reactiva después de tratamiento térmico + aAuNP + IpAuNP + solución de HC en SA

Posteriormente, se realizó un análisis morfológico y comparativo de las imágenes obtenidas de cada modificación.

CAPÍTULO IV

I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN POR OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN

1. Diseño y fabricación del sensor analítico en papel

El mejor resultado del diseño del sensor fue el sensor «ojos de búho», que tiene la mejor morfología para tener un comportamiento microfluídico con capacidad de muestras de $20 \mu L$ y tiempo de llenado de 3 min. El proceso de selección del diseño del sensor en papel se explica con mayor detalle en el anexo AI.

- i. Modificar superficie del sensor para generar zonas hidrofóbicas e hidrofílicas

En la Figura I.1 se encuentran especificadas las zonas hidrofóbica (cera impresa) e hidrofílicas (papel cromatográfico) del sensor «OBD».

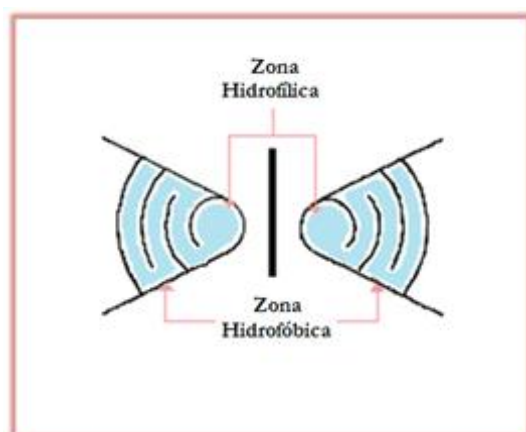


Figura I.1:
Diagrama del sensor «OBD» especificando las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas.

La funcionalidad del sensor depende de la adecuada modificación de la hidrofobicidad del papel. Si la temperatura no es la adecuada, pueden existir fugas o al contrario no permitir el paso del fluido a través del sensor (véase A.I). Si el sensor es sobreexposto a alta temperatura, como consecuencia el calor comienzan a quemar las capas de celulosa que conforman al papel cromatográfico (Figura I.2), volviendo el papel de color café, interfiriendo con el cambio de color de sustancias que reaccionan en colores amarillos-marrón.



Figura I.2: Sensor con daño en celulosa debido a alta temperatura durante el tratamiento térmico.

- ii. Construcción, caracterización y realización de pruebas hidrofílicas al sensor para determinar el correcto funcionamiento usando métodos de microscopía óptica

En el anexo A.I se encuentran las características antes y después del tratamiento químico de cada sensor de la Figura II.1(Capítulo III), con ayuda de agua coloreada con Rodamina-b se ayudó a determinar la funcionalidad del sensor, después del tratamiento térmico.

Los resultados arrojaron, que los sensores diseñados presentaban fallas, tanto de diseño como de tratamiento, razón por la cual se fueron descartando. Se determinó que el sensor (a) no era adecuado para la realización del proyecto ya que el tamaño de la zona de reacción era muy grande para su utilización con NP. El sensor (b) fue descartado ya que no funcionaba como un sensor de flujo lateral. El sensor (c) tenía el problema de que al ser agregada la

sustancia reactiva ésta destruía la barrera hidrofóbica (véase Capítulo IV.I.2). En el sensor (d) el problema se suscitó en los canales, pues después del tratamiento térmico estos se estrecharon haciendo que el agua generara la ruptura de la barrera hidrofóbica. El sensor (e) siempre presentó fuga después del tratamiento térmico. En los sensores (f) y (g) el tratamiento térmico, provocó un estrechamiento de los canales por los que el fluido no lograba pasar. Finalmente el sensor (h) o sensor «ODB» fue el sensor elegido para la realización del proyecto, pues contaba con un adecuado funcionamiento microfluídico después del tratamiento térmico (Figura I.3), así como presentar estabilidad en la barrera hidrofóbica después de agregar la sustancia reactiva.

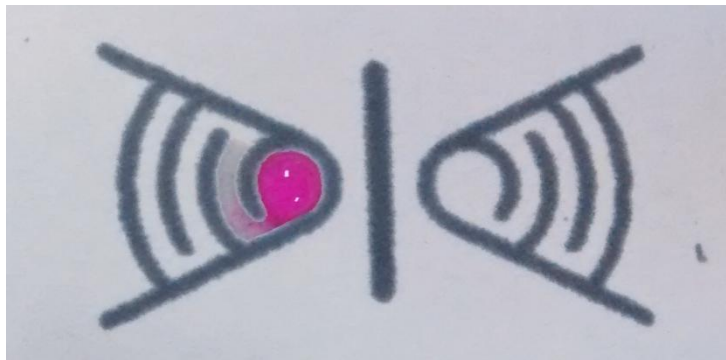


Figura I.3: Prueba de la barrera hidrofóbica en el sensor «ojos de búho».

En la Figura I.4 podemos ver imágenes obtenidas con el microscopio óptico 400X (Nikon) del sensor «ODB» antes y después del tratamiento térmico. Se puede observar que el material ocupado para generar la barrera hidrofóbica (cera impresa) penetra en las capas de celulosa impregnándolas y cambiando de esta forma la hidrofiliidad después del tratamiento térmico, generando un camino definido para el fluido. Como el material hidrofóbico se dispersa por las fibras de celulosa, el contorno del sensor se ensancha, cambiando de esta forma sus dimensiones, en la Tabla I.1 se puede ver esta comparación.

Figura I.4: Imágenes obtenidas con el microscopio óptico Nikon 400X del sensor «ojos de búho» (a) antes del tratamiento térmico. (b) después del tratamiento térmico (370 x 510 μm).

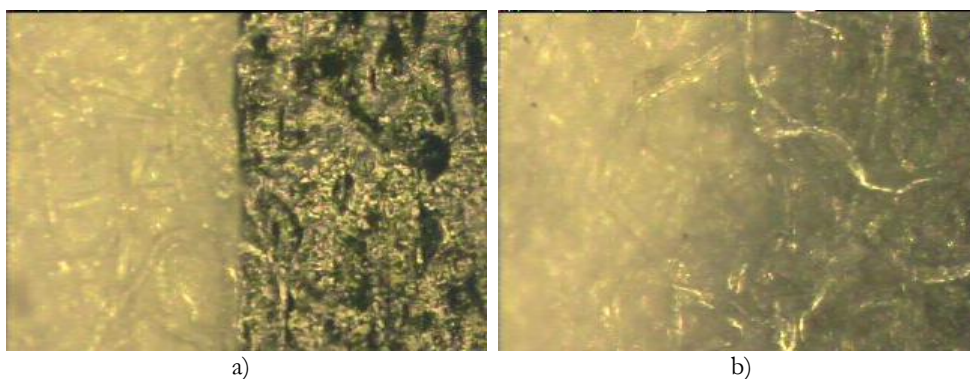


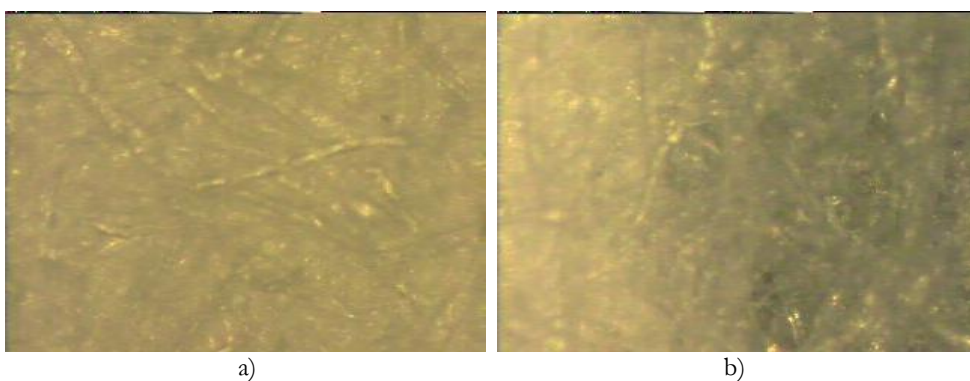
Tabla I.1:

Comparación de las dimensiones del sensor «ODB» antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Diámetro de la zona de reacción	4.9 mm	4.4 mm
Área de la zona de reacción	18.9 mm ²	15.2 mm ²
Ancho del canal	2.0 mm	1.3 mm
Longitud del canal	34.5 mm	30.9 mm
Área total	87.9 mm ²	55.4 mm ²

Se tomaron imágenes de la parte trasera del sensor con el microscopio óptico (Nikon, 400x) antes y después del tratamiento térmico (sin el acetato de celulosa). En la Figura I.5 se puede observar del lado izquierdo el sensor, previo al tratamiento térmico, y en el lado derecho, posterior al tratamiento. De esta forma podemos ver que tanto penetra el material hidrofóbico en las fibras de celulosa después del tratamiento térmico.

Figura I.5: Imágenes obtenidas con el microscopio óptico Nikon 400X de la parte trasera del sensor «ojos de búho» (a) antes del tratamiento térmico. (b) después del tratamiento térmico (370 x 510 μm).



En algunos casos aunque el tratamiento térmico se haya aplicado como se estandarizó, el material hidrofóbico por alguna razón no penetra

adecuadamente provocando una fuga. En la Figura I.6 se puede ver un sensor que presenta fuga en la parte inferior del área reactiva (lado izquierdo), con ayuda del microscopio óptico, es posible ver como la barrera hidrofóbicas es sobrepasada por el líquido rosáceo.



Figura I.6: Sensor «ODB» con solución de Rodamina-b que presenta fuga (a) sensor (b) imagen obtenida con el microscopio óptico Nikon 400X de la parte trasera de la fuga (370 x 510 μm).

2. Implementación de métodos colorimétricos y fluorescentes, para la detección de cortisol salival

i. Fenilhidrazine

La reacción esperada con el Fenilhidrazine, durante la realización de este proyecto es la descrita por Peterson (2013) basada en la investigación de Porter y Silver (1950). En la que se utiliza alcohol y ácido sulfúrico para deshidratar y reordenar el grupo keto de la hidrocortisona, para que en conjunto con la Fenilhidrazine forme como producto Bisfenilhidrazone de color amarillo (Bartos & Pesez, 1979), en la Figura I.7. En el caso de este proyecto se utilizaron el alcohol y el ácido sulfúrico con el Fenilhidrazine respectivamente, para determinar cuál de ellos presentaba una mejor respuesta.

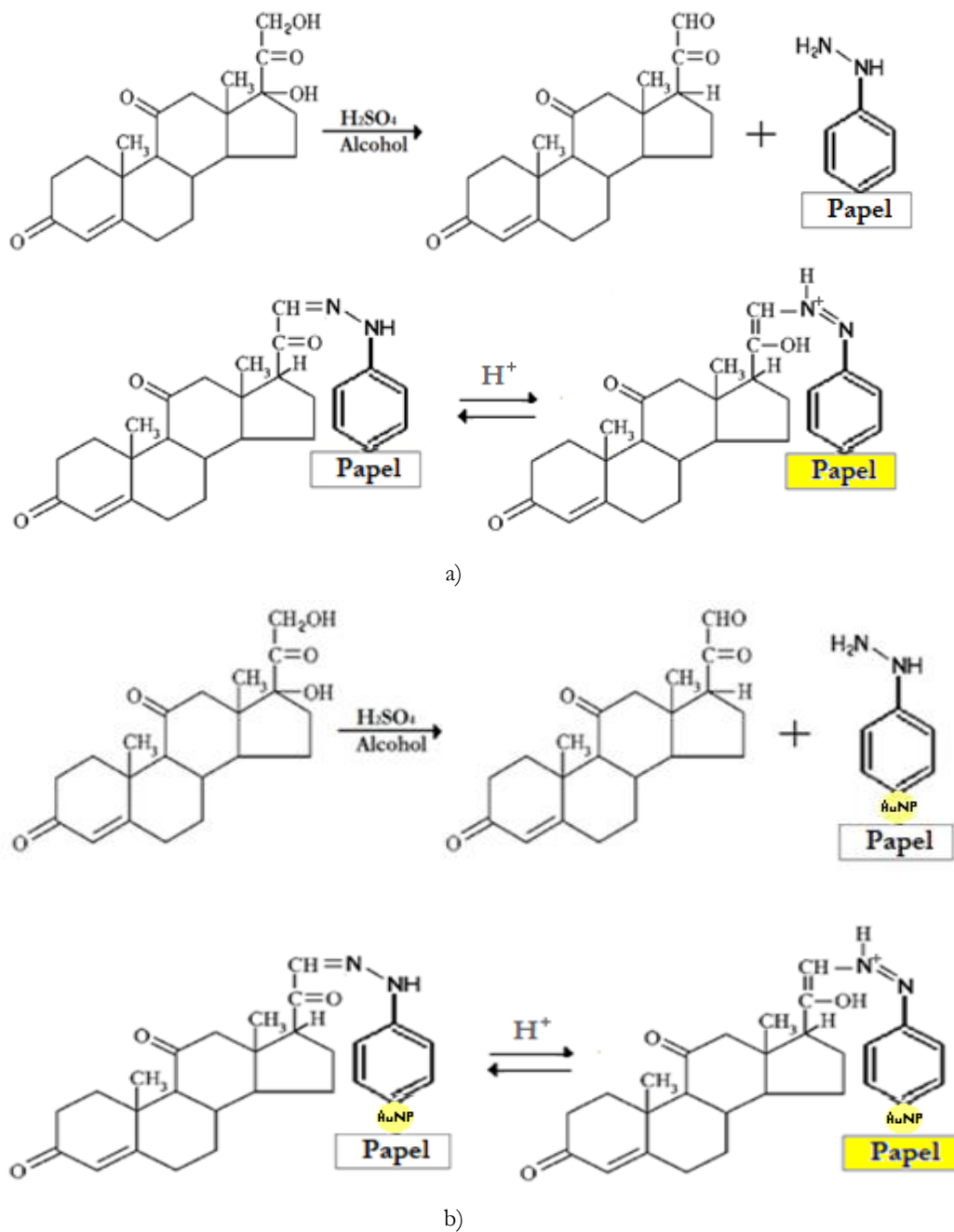
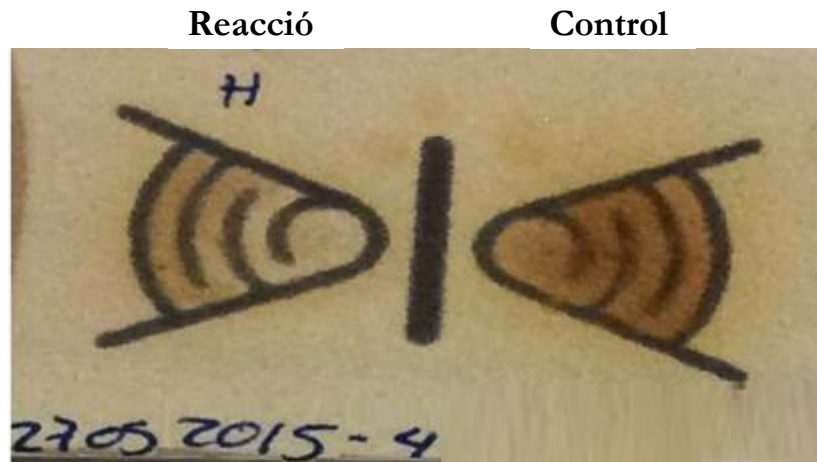


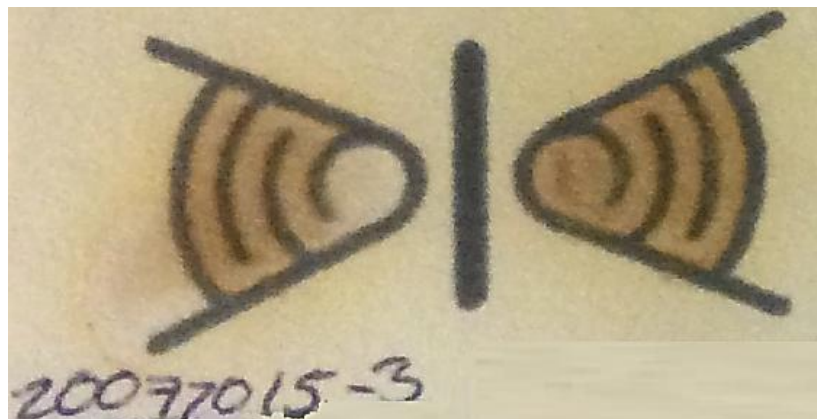
Figura 1.7: Reacción Cortisol-Fenilhidrazina (a) sin NP (b) con NP [FL.6]

En el caso de la S-FH el mejor resultado fue obteniendo una despigmentación de marrón (amarillo fuerte) a blanco (lado izquierdo es el lado de reacción) en sensores con H_2SO_4 y con alcohol (Figura 1.8). La S-FH fue preparada fresca y la solución analito (HC en agua) se agregó 1h después del

secado. La mejor decoloración es generada por la adición de alcohol a la solución S-FH.



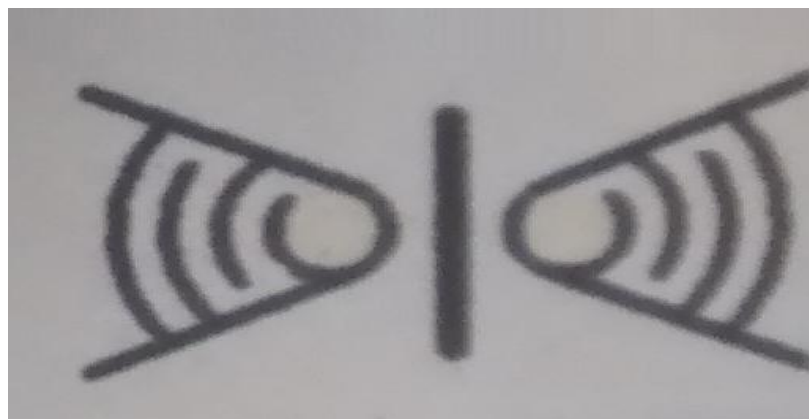
a)



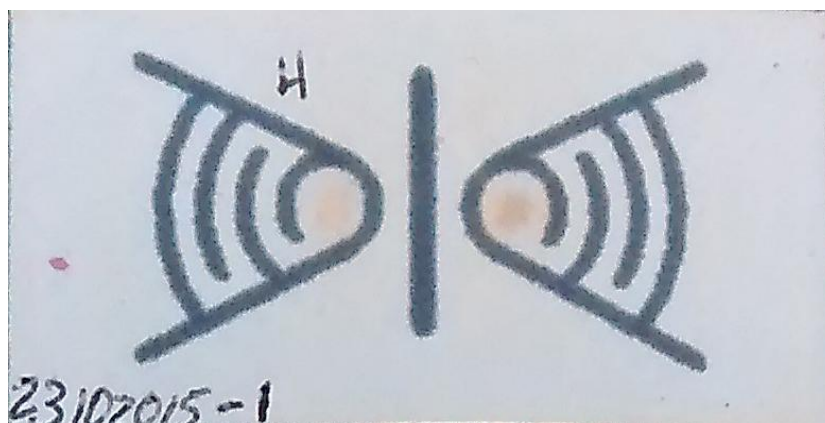
b)

Figura I.8: Sensores «ODB» modificado con S-FH (a) con Alcohol + HC (b) con H_2SO_4 + HC. Después de 24h.

En el sensor al que se le agregó la misma solución pero se esperó 24h para agregar la solución analito, se observó una muy ligera decoloración, esto demostró que se requiere que la solución esté fresca para que se maximice la reacción. Se requiere mencionar que la solución originalmente tiene una coloración amarillo suave-blancó al ser agregada al sensor, color que va incrementando su tonalidad con el pasar del tiempo (Figura I.9b).



a)



b)

Figura 1.9: Sensores «ODB» con S-FH (AuNP) + Alcohol + HC (únicamente del lado izquierdo) (a) recién agregada y (b) 24h después.

El primer colorante agregado para maximizar la coloración de la reacción, fue cristal violeta (CV). El color morado característico de este colorante se fue perdiendo poco a poco hasta finalmente desaparecer y quedar únicamente la tonalidad marrón. Se optó por utilizar un colorante vegetal (proporcionado por McCormick®) y una pintura al óleo (proporcionado por Lefranc & Bourgeois). En la reacción de Fenilhidrazine a Bisfenilhidrazone se genera una reacción reversible relacionada a la liberación de un Hidrogeno, de esta forma se esperaba que el colorante reaccionara con este Hidrogeno magnificando de esta forma la reacción, en ningún caso, se obtuvo una reacción favorable, por lo que se decidió no utilizar ningún colorante extra.

Como prueba final para las pruebas colorimétricas, se usó SA con HC, el cual tenía las mismas concentraciones de la (Tabla II.1). Se agregaron 2 μL de la solución analito (HC), dando como resultado la decoloración del color marrón producido por la S-FH [†]. En el caso de la SH, la decoloración no se puede apreciar claramente, se utilizaron dos sujetos experimentales fueron 2 femeninas de 27 y 28 años respectivamente. El sujeto 2 (S_2) dice tener un nivel de estrés Alto, y el sujeto 1 (S_1) Normal, al analizar la saliva de los sujetos en la luz blanca la diferencia entre el lado control (derecho) y el lado reactivo (izquierdo) no se aprecia claramente (Figura I.11 a).

[†] Estos resultados se pueden observar en A.III.

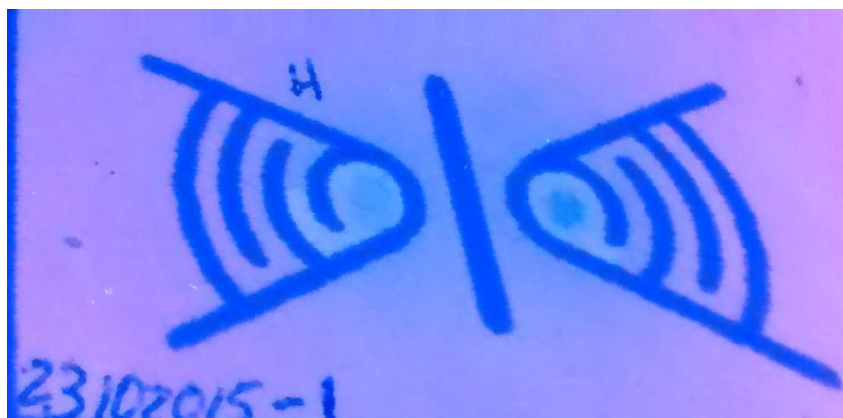


Figura I.10: Sensor «ODB» con S-FH (AuNP) + Alcohol y HC (del lado izquierdo) bajo luz UV.

La S-FH con alcohol genera una fluorescencia color naranja que puede observarse con ayuda de una lámpara UV. En la Figura I.10 se aprecia como la zona reactiva del lado izquierdo disminuye su fluorescencia por la adición de SA con HC. En el caso de la SH (Figura I.11 b) es clara la diferencia entre los sujetos solo al poner el sensor bajo la luz UV. Al iluminar con la luz UV los sensores con SH, se confirma la percepción del sujeto 2 pues al comparar el lado control (derecho) y el reactivo (izquierdo) del sensor del sujeto 2 este último disminuye la intensidad de su fluorescencia más que en el caso del sujeto 1 (Figura I.11). Confirmando la funcionalidad del método fluorescente de la S-FH.

Podemos decir que la S-FH en conjunto con Alcohol es un adecuado indicador colorimétrico de niveles de cortisol, cualidad que se ve maximizada por la adición de AuNP. La Fenilhidrazine es un reactivo aceitoso, pero la S-FH es una emulsión de agua y aceite. Hecho por el cual, al agregar la S-FH (AuNP) en el papel, existe una separación de fase, lo que hace que la coloración generada por el Fenilhidrazine no sea homogénea, y por ende tampoco la decoloración generada al agregar HC, esto mismo sucede con la fluorescencia bajo la luz UV.

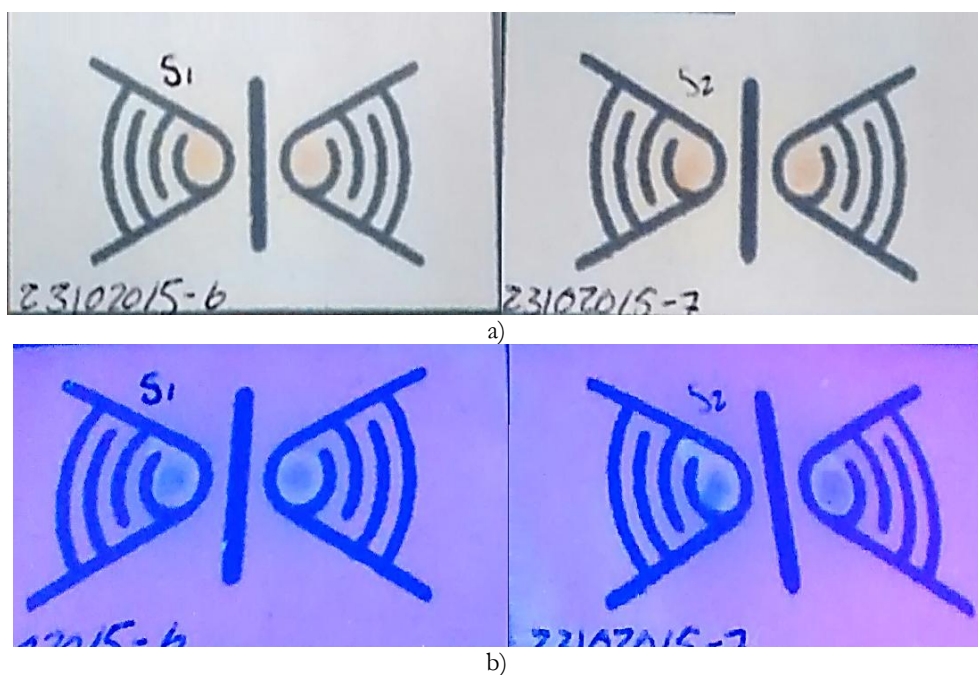


Figura I.11: Sensores «ODB» con S-FH (AuNP) + Alcohol y saliva humana (del lado izquierdo) de dos sujetos experimentales bajo a) luz blanca y b) luz UV.

ii. Difenilamina

En este caso el protocolo para utilizar la Difenilamina (Schulz & Neuss, 1957) incluye el uso de ácido sulfúrico concentrado y ácido acético glacial. Se decidió utilizar este protocolo[†] sin cambio alguno (S-DA). Posteriormente, se analizó la barrera la barrera hidrofóbica y esta no se vio afectada. La solución resultante es incolora por lo que se decidió utilizar diversos colorantes para observar la reacción. Se agregó CV, Rodamina-b y

[†] En el anexo A.II se encuentran las especificaciones de la S-DA.

Naranja de Metilo (NM), los cuales reaccionaban con el pH del agua, enmascarando la reacción del analito (Figura I.12).

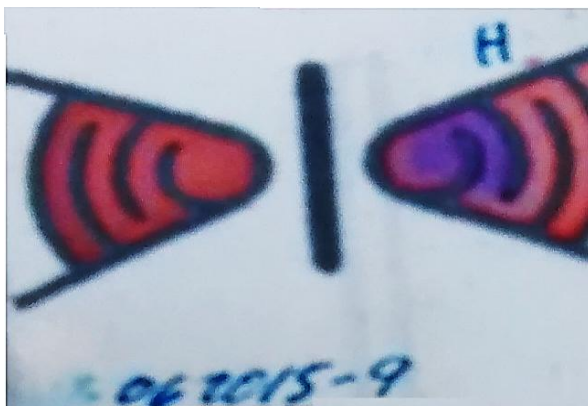


Figura I.12: Sensor «ODB» con S-DA + Rh-b*10⁻² y HC en agua del lado derecho.

La S-DA con AuNP y sin la adición de ningún colorante, se torna verde después de 24h en el papel (Figura I.13). Tras agregar la solución con HC en diferentes concentraciones se observó una muy ligera diferencia, por lo que se decidió agregar más Difenilamina, aumentando de esta forma la intensidad de la coloración del sensor (véase A.III). Posterior a esto, se comprobó su efectividad con la solución de HC en un sensor y con agua (ultrapura *Milli-Q*) en otro sensor, el resultado no fue el esperado, no se observó ningún cambio en la coloración ni fluorescencia bajo la luz UV (Figura I.14).

Por lo anterior, la S-DA no se llevó a la siguiente fase, es decir no se evaluó su comportamiento ni con SA con HC ni con SH, y ya que no se observó ni cambio de color ni fluorescencia, se eliminó como principio activo para la realización de un Nanobiosensor de estrés.

Figura I.13: Sensores «ODB» con S-DA + DA y AuNP.



Figura I.14: Sensores «ODB» con S-DA + 60 mg de DA (AuNP) a) con HC en el lado izquierdo del sensor y b) con H₂O en el lado izquierdo del sensor.



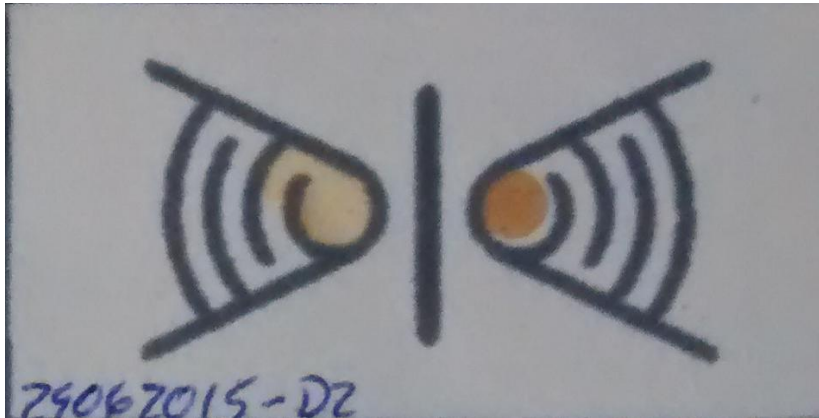
a)

b)

iii. Combinaciones[†]

Se llevaron a cabo combinaciones[†] de ambas soluciones, estas combinaciones[†] generaban una tonalidad amarilla en el área de reacción a las 3h de haber añadido la combinación. Aunque el color de la combinación era amarillo, aun así se agregó CV (Figura I.15 b) en un experimento para ver si de esta forma se podría aumentar la reacción colorimétrica. Se observó una decoloración del área de reacción después de agregar la solución HC en agua (Figura I.15 a), pero para verificar este resultado se comparó con un sensor sin CV, lo cual mostro que la reacción visualizada se debía al pH de la solución, pues ningún sensor con estas «combinaciones» mostraron diferencias visibles con la solución de HC (Figura I.15b) y con agua pura (Figura I.15 c).

[†] En el anexo A.III combinaciones, se observan las proporciones de las combinaciones



a)



b)

c)

Figura I.15: Combinación de S-FH y S-DA (AuNP) a) con CV y HC del lado izquierdo del sensor b) con HC del lado izquierdo del sensor y c) con H₂O del lado izquierdo del sensor.

Al hacer incidir la luz UV en los sensores con la combinación se observó una muy marcada fluorescencia (Figura I.15).



Figura I.16: Combinación de S-FH y S-DA bajo luz UV después de agregar HC en el lado izquierdo del sensor.

Por lo anterior, la S-DA no se llevó a la siguiente fase, es decir no se evaluó su comportamiento ni con SA con HC ni con SH, y ya que no se observó ni cambio de color ni fluorescencia, se eliminó como principio activo para la realización de un Nanobiosensor de estrés.

3. Investigar métodos inmunológicos para detección de cortisol, con nanopartículas para su uso con colorimetría o fluorescencia.

En solución, la reacción antígeno-anticuerpo (Figura I.17) no genera ninguna respuesta que pueda apreciarse a simple vista, lo que nos confirma que se requiere de algún indicador para determinar una respuesta colorimétrica o de fluorescencia. Para ello, se agregó la peroxidasa de rábano picante al anticuerpo y AuNP, pero aun así la solución apAuNP no generó ninguna reacción colorimétrica después de agregado el antígeno (HC), ni en solución ni en papel. En la Figura I.17 se encuentra un esquema del acomodo de las moléculas de esta solución. La peroxidasa, es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno, por lo cual requiere de un sustrato que oxidar, para mostrar algún tipo de respuesta colorimétrica. Por ello, se agregó colorante vegetal al papel del sensor «OBD», para que existiera un sustrato que reaccionara con el peróxido de hidrogeno de la peroxidasa.

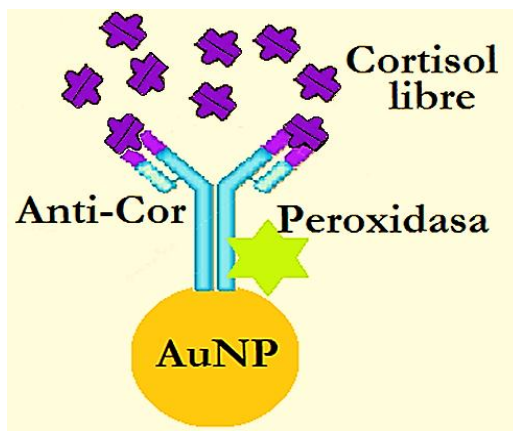


Figura I.17: Esquema de unión apAuNP-Cortisol

- i. Evaluar el desempeño del sensor en papel utilizando un modelo de cortisol en SA

En la Figura I.18 se muestra un esquema de cómo se cree que se acomodaron las moléculas de la solución apAuNP en el papel con el colorante vegetal. De los colorantes agregados al sensor «ODB» los que mejor respuesta presentaron con la solución apAuNP, fueron los colorantes vegetales rojo y verde.

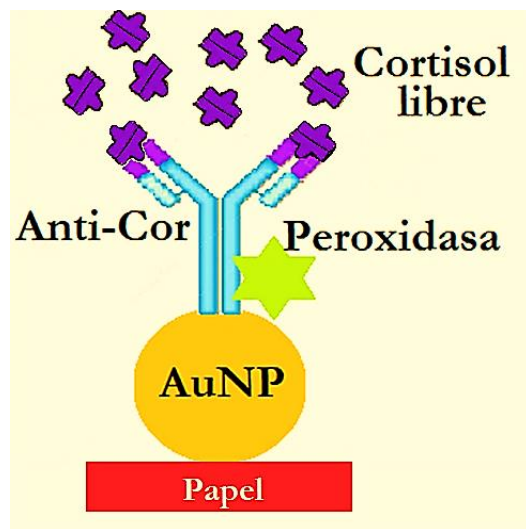


Figura I.18: Esquema de unión apAuNP-Cortisol en el sensor «ODB»

El colorante verde presentó una ligera diferencia colorimétrica entre el sensor con SA y el sensor con SA con HC (Figura I.19). Aunque ambos presentaban decoloración de la zona reactiva (lado izquierdo del sensor, en comparación con el lado control –derecho-). Posteriormente se evaluó su respuesta con SH.

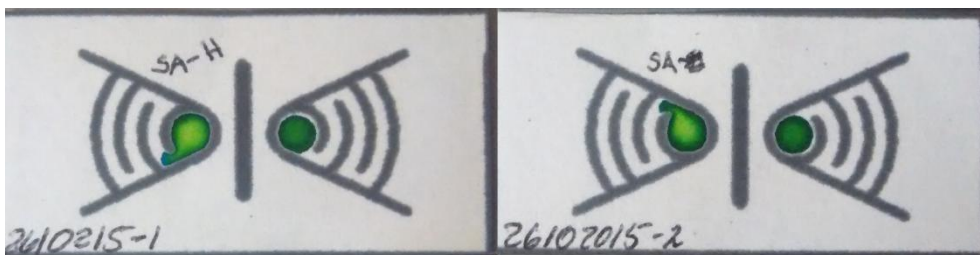
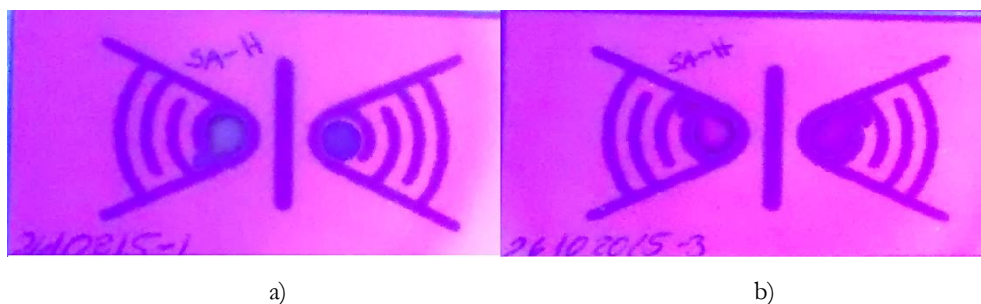


Figura I.19: Sensor «ODB» modificado con apAuNP, en el lado izquierdo de los sensores a) SA con HC y b) SA.

El colorante rojo no presentó un cambio colorimétrico apreciable con la SA con HC, por lo que no se tomó en cuenta para las pruebas con SH. El colorante verde presentó fluorescencia al iluminarse con luz UV, respuesta que también presentó el colorante rojo con la solución apAuNP, ambos comparados con sus respectivos controles. Al comparar la fluorescencia de ambos colorantes, se optó por usar el colorante rojo en lo sucesivo. En la Figura I.20 se encuentra la comparación de un sensor rojo y uno verde iluminados por luz UV.

Figura I.20: Sensor «ODB» con apAuNP y HC en el lado izquierdo del sensor a) color verde y b) color rojo. Bajo Luz UV.



En el caso del ELISA tipo «sándwich», únicamente se utilizó el colorante vegetal rojo. La respuesta con respecto a los sensores con apAuNP fue mucho mayor, sobre todo bajo la luz UV. A partir de este punto nos referiremos a este análisis como nano-ELISA «sándwich». En la Figura I.21 se encuentra un esquema de cómo se cree que es la reacción antígeno-anticuerpos de la solución IpAuNP.+HC.

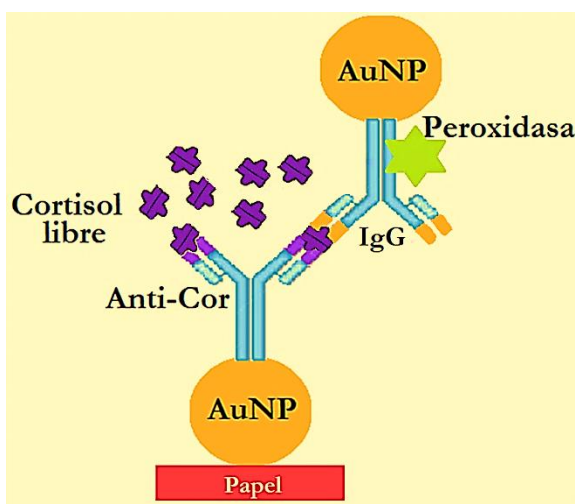


Figura I.21: Esquema de unión aAuNP + IpAuNP + Cortisol en el sensor «ojos de búho».

Se evaluó la respuesta del sensor con SA y SA+HC y se comparó con las respuestas (en colorante rojo) de la solución apAuNP. Se puede observar en la Figura I.22 la comparación de las respuestas de estas dos soluciones.

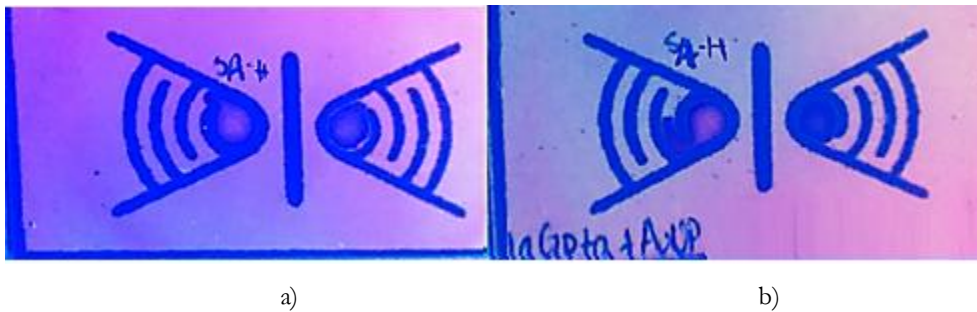


Figura I.22: Comparación de sensores «ojos de búho» a) apAuNP con SA e HC y b) aAuNP + IpAuNP + HC

Se comprobó la funcionalidad del nano-ELISA «sándwich» evaluando su reacción ante distintas concentraciones de HC en SA, incluyendo concentraciones fisiológicas. También se quiso evaluar su respuesta con respecto al tiempo, para verificar de esta forma, si su respuesta estaba en función del tiempo transcurrido desde su elaboración. Muchas proteínas son muy susceptibles a cambios de temperatura, humedad y pH, por lo que evaluar su funcionalidad es altamente necesario. En la Tabla I.2 se observan los sensores evaluados.

Comparando los resultados de la tabla podemos concluir que la fluorescencia del sensor «ODB» responde proporcionalmente a la concentración de HC. Y que en cuanto al tiempo, es mejor preparar con anticipación (20h) para maximizar la fluorescencia de la respuesta.

El siguiente paso, fue evaluar la respuesta del nano-ELISA «sándwich» con SH, para ello se evaluaron 6 sujetos experimentales de diversas edades y niveles de estrés (subjetivo) datos que se encuentran en la Tabla II.4 (Capítulo III). En la Figura I.23 se pueden observar los resultados de los sujetos experimentales.

Tabla I.2: Análisis de concentración vs. Tiempo de sensores «ODB» modificados con un nano-ELISA «sándwich». Visualizado bajo luz UV.

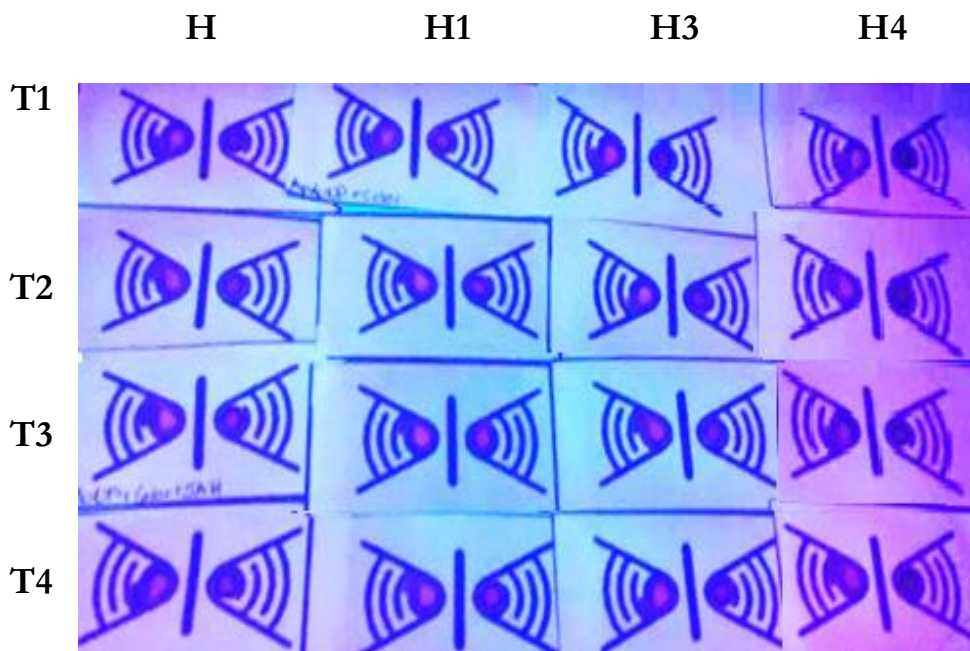
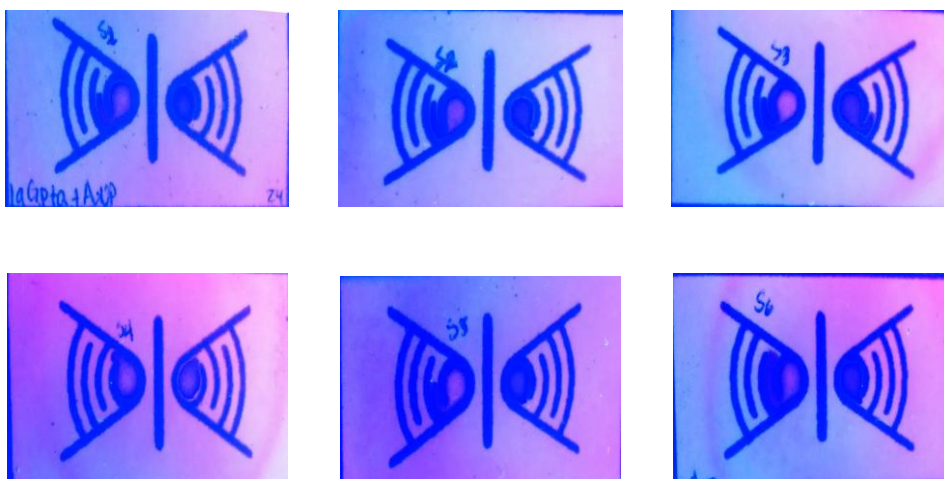


Figura I.23: Resultado del estudio de 6 sujetos con los sensores «ODB» modificados con un nano-ELISA «sándwich» y SH del lado izquierdo del sensor.



Concluimos que el principio activo a base de inmunoensayos que presenta la mejor respuesta es el nano-ELISA «sándwich», si bien no presenta respuesta colorimétrica, su fluorescencia bajo la luz UV es bastante significativa, y mucho más clara que la respuesta obtenida por métodos químicos (S-FH). En cuanto a la respuesta colorimétrica, es necesario verificar si el nano-ELISA

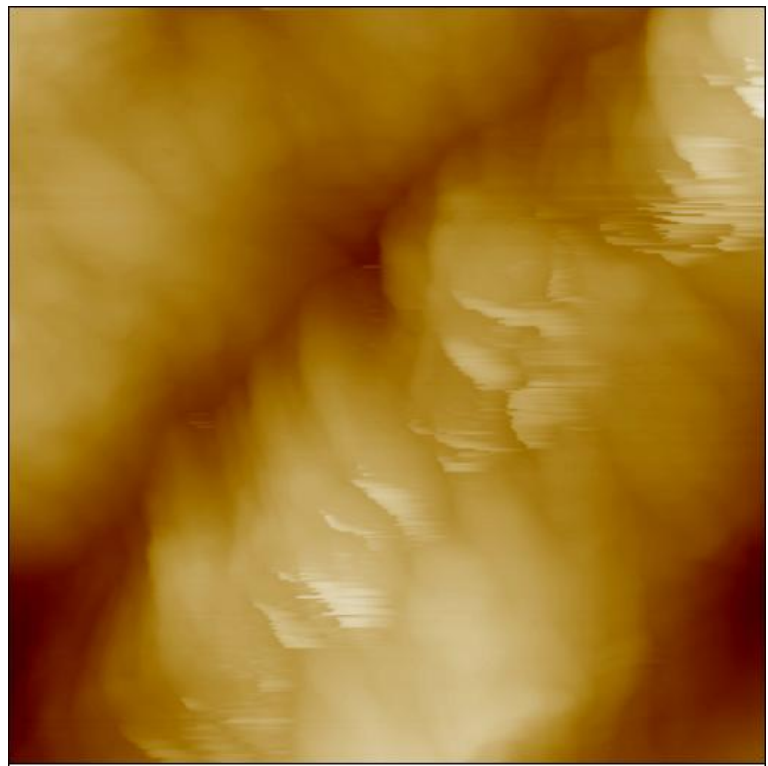
«sándwich» también genera una respuesta colorimétrica con el colorante vegetal verde (como con la solución apAuNP). Por todo lo anterior se puede decir que el nano-ELISA «sándwich», es el principio activo más prometedor para la generación de un Nanobiosensor de estrés.

4. Caracterización de los sensores en papel con AFM.

Se analizaron 3 muestras del principio activo en base a anticuerpos con AFM:

- Papel después del tratamiento térmico
- Papel + Color Vegetal + aAuNP + IpAuNP
- Papel + Color Vegetal + aAuNP + IpAuNP + HC

Imagen de AFM: altura y fase de papel de sensor ODB después de tratamiento térmico

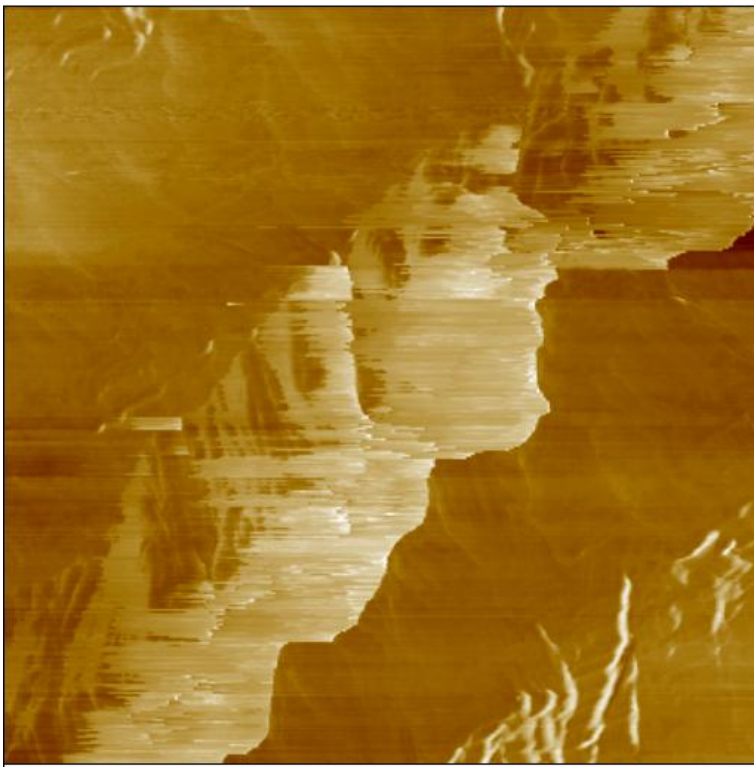


0

1.07 μm

Data type
Z range

Height
720.1 nm



0

1.07 μm

Data type
Z range

Phase
90.00 °

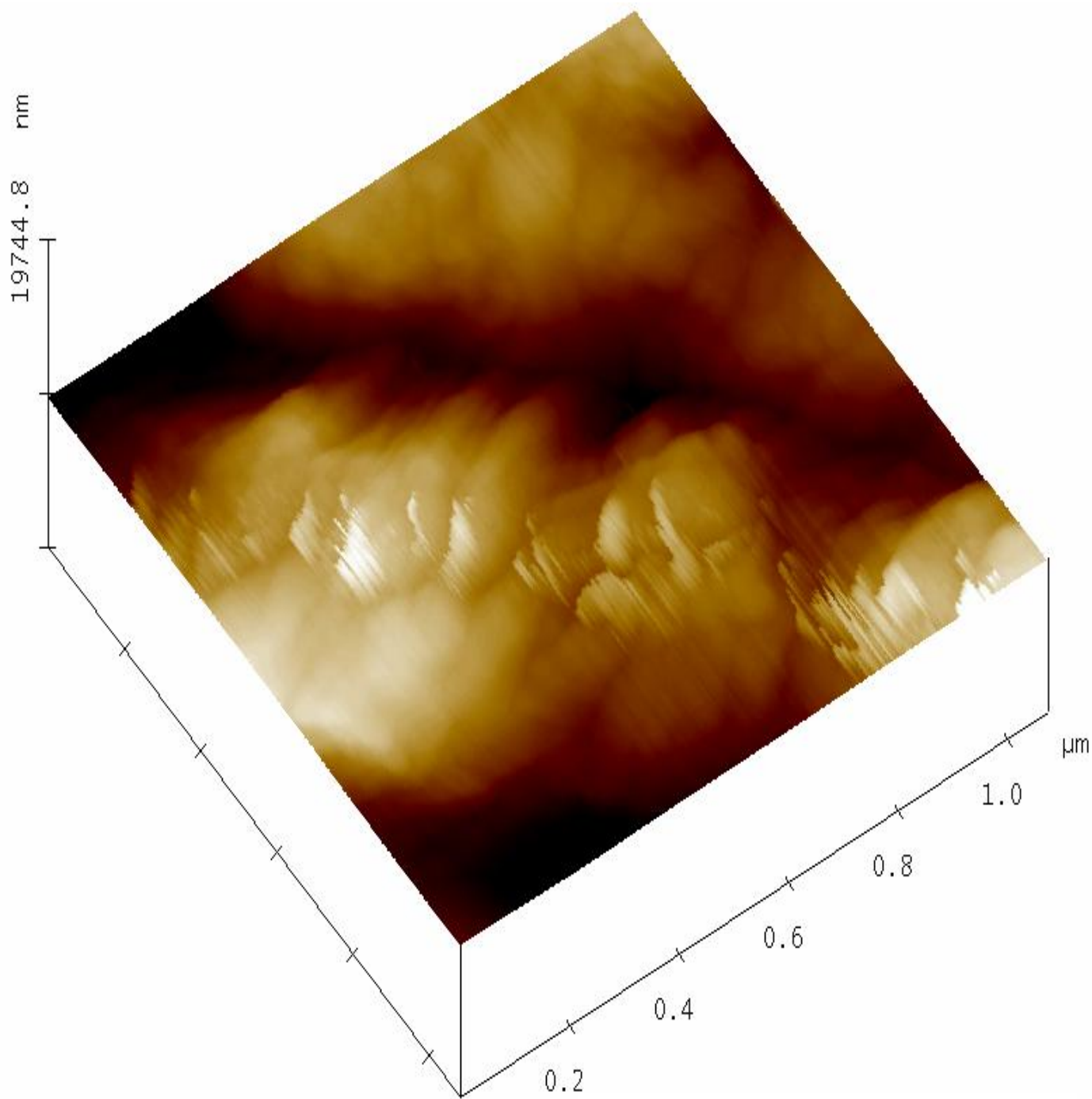
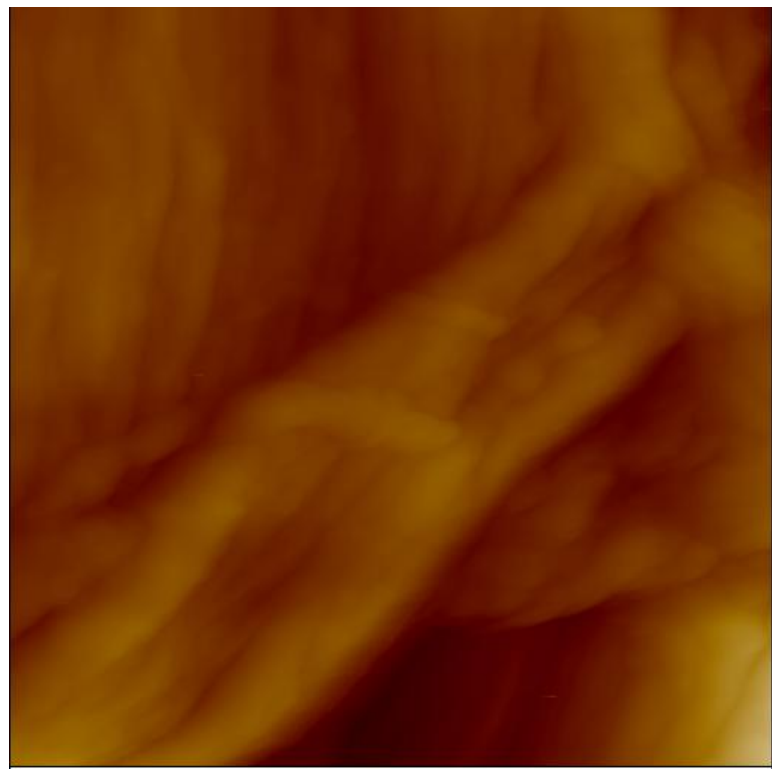


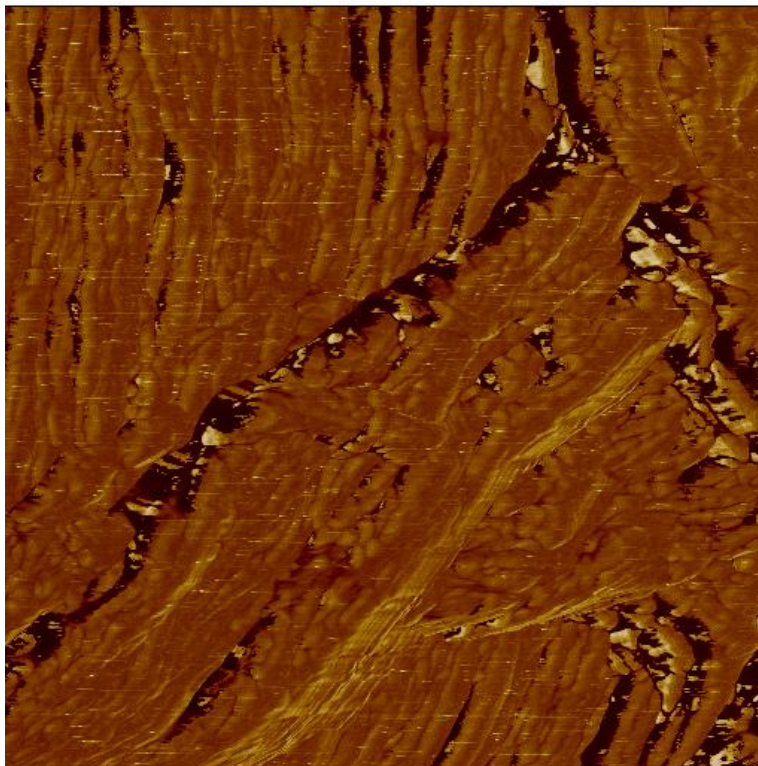
Imagen 3D de AFM de superficie de sensor «ODB» (papel antes de modificación con anticuerpos).

Imagen de AFM: altura y fase de superficie de sensor de ODB (modificación con colorante vegetal + aAuNP + IpAuNP)



0 1.50 μm

Data type Height
Z range 500.0 nm



0 1.50 μm

Data type Phase
Z range 90.00 °

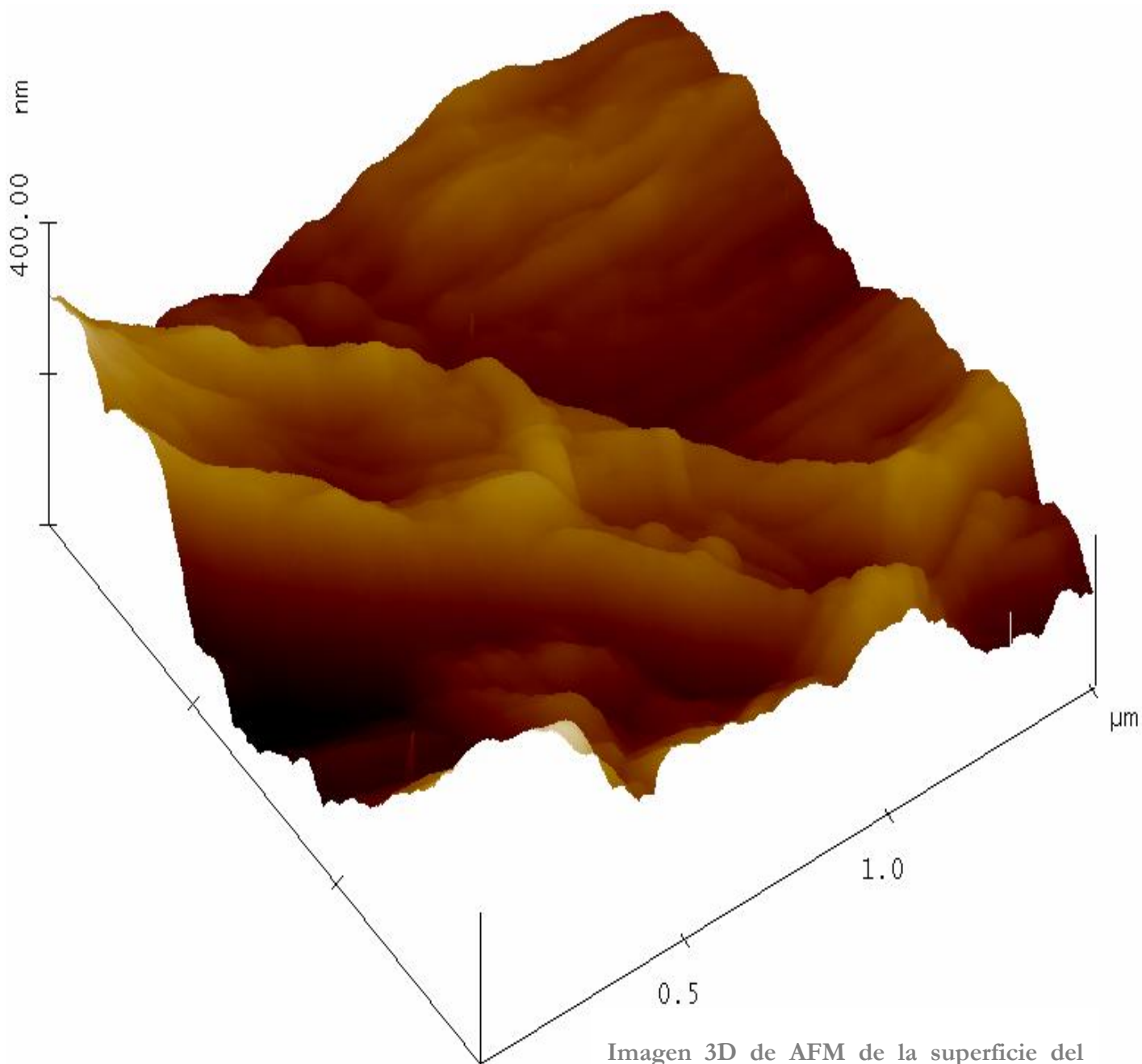
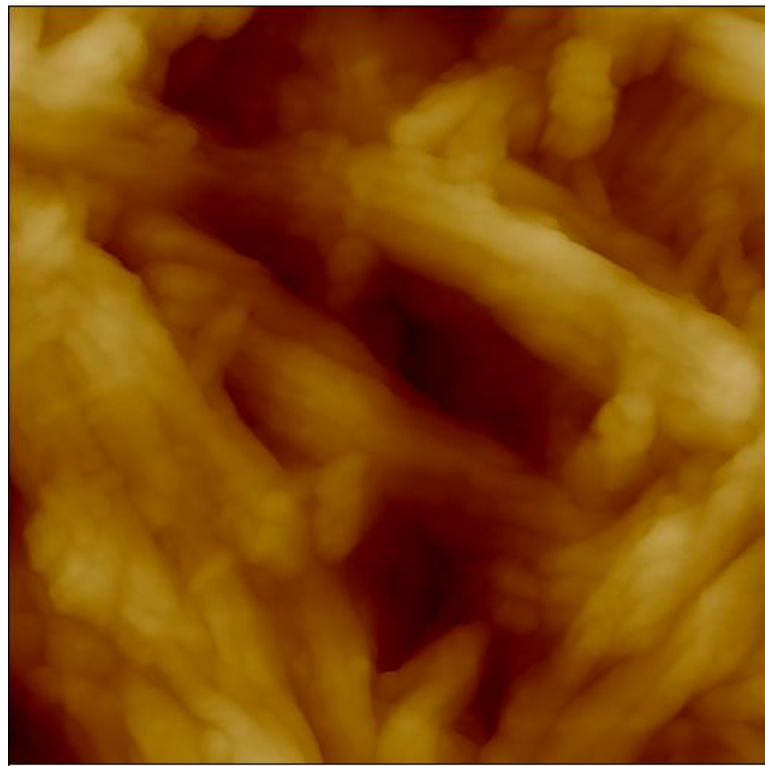
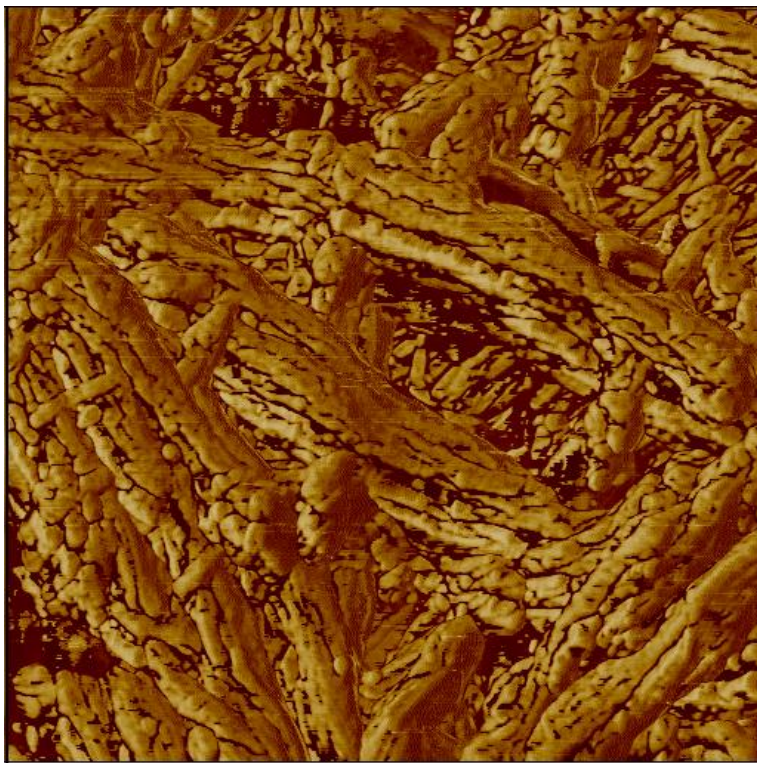


Imagen 3D de AFM de la superficie del sensor «ODB» con la modificación de anticuerpos y NP

Imagen de AFM: altura y fase de superficie de sensor de ODB (modificación con colorante vegetal + aAuNP + IpAuNP + HC)



0

1.07 μm Data type
Z rangeHeight
186.5 nm

0

1.07 μm Data type
Z rangePhase
120.0 $^{\circ}$

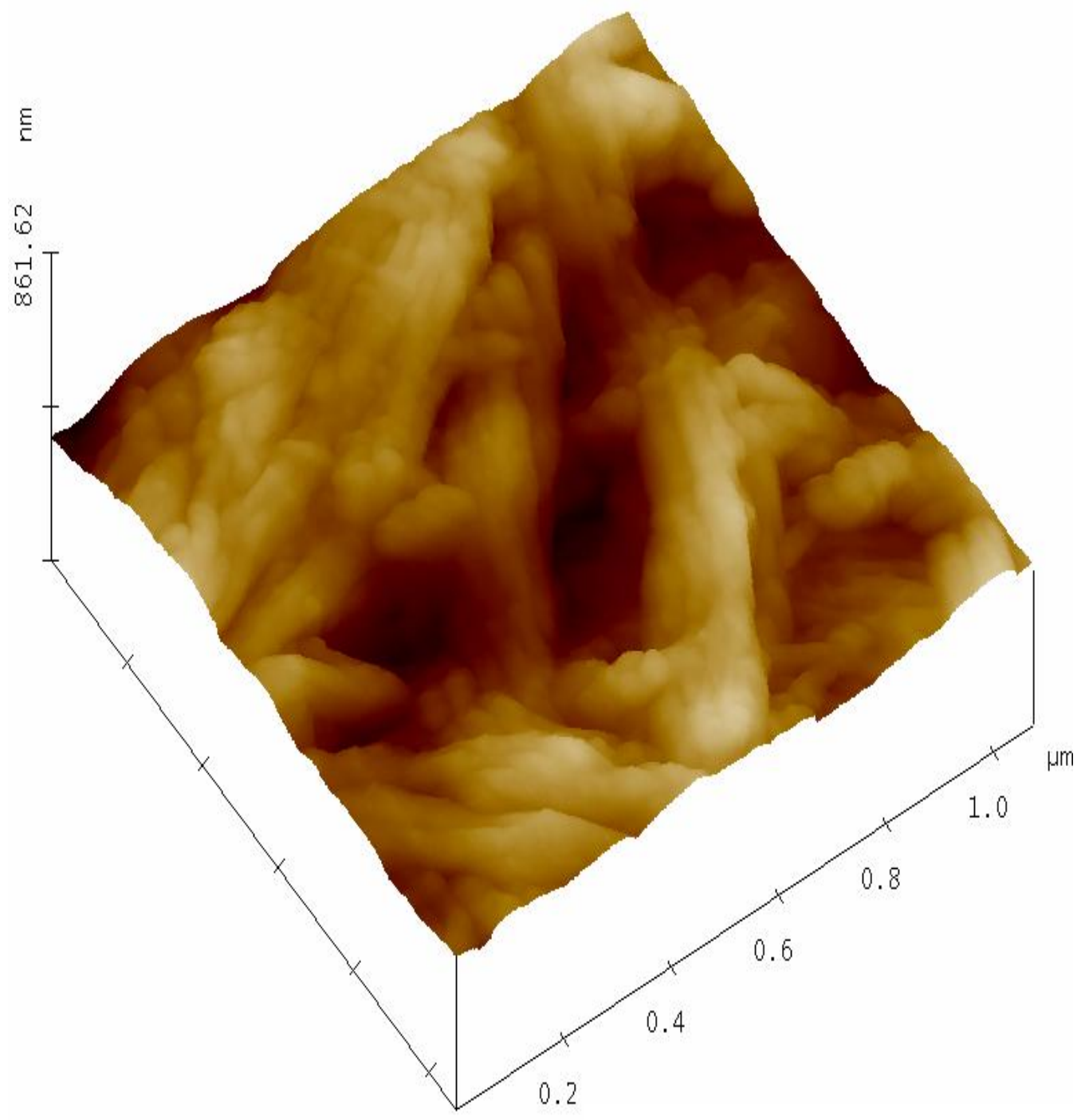


Imagen 3D de AFM de la superficie del sensor «ODB» con la modificación de anticuerpos, NP y HC.

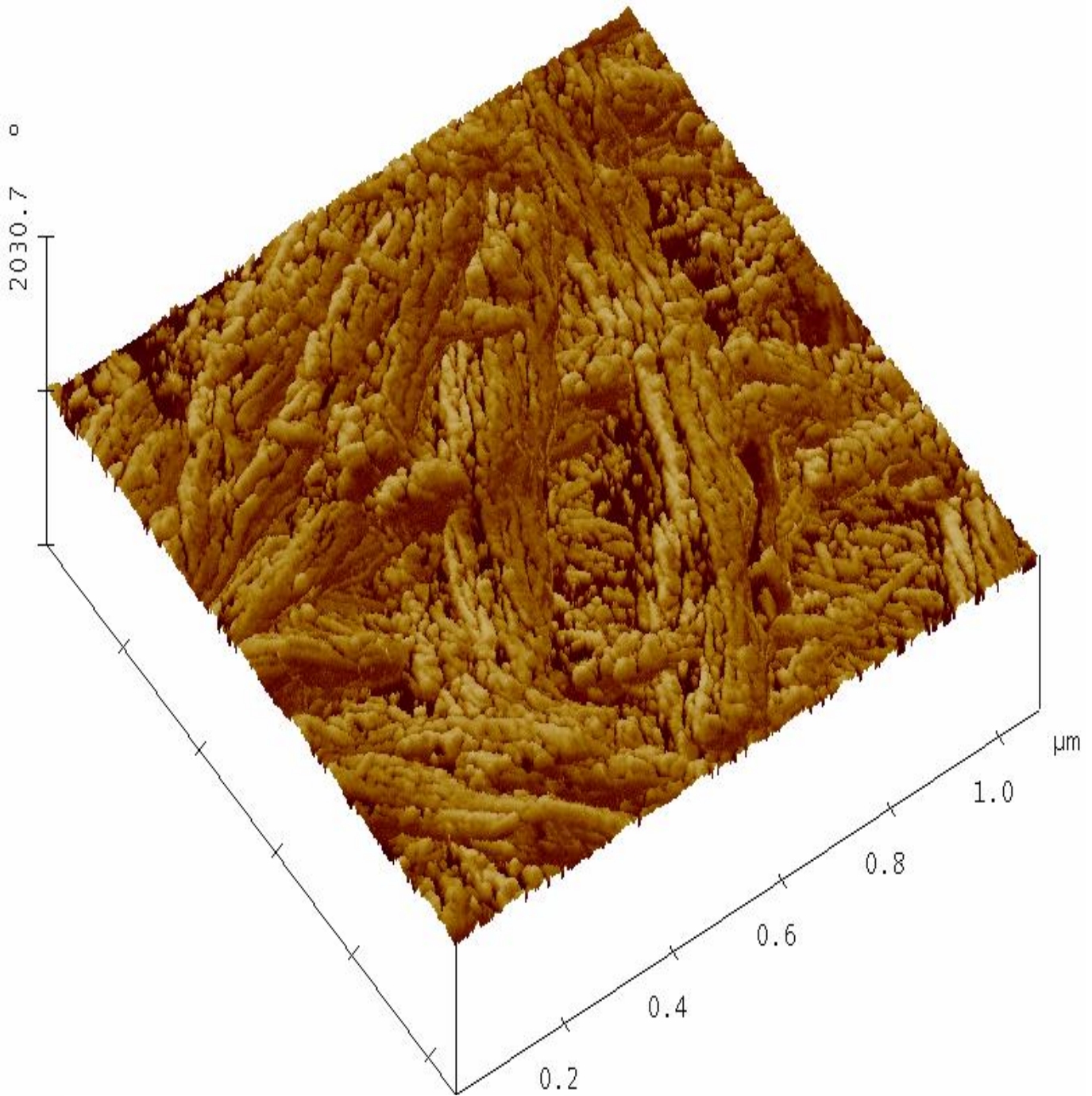


Imagen 3D de AFM de la fase del sensor «ODB» con la modificación de anticuerpos, NP y HC.

Si se comparan las imágenes obtenidas por el AFM se observa claramente que la superficie del papel cambia en su rugosidad (RMS). Al comparar las imágenes AFM de altura, se ve claramente la modificación de la superficie, por las AuNP, las moléculas de los anticuerpos y la HC cambiando su morfología (Tabla I.3).

En un principio, en la superficie del papel sin modificación, dominan las estructuras fibrosas, la superficie es altamente rugosa y cubierta con cadenas largas con un ancho aproximado de 200 *nm*. Después con cada paso en la modificación, la rugosidad va disminuyendo (Tabla I.3); este es el resultado de llenar la superficie con el material modificante, pues se espera que la morfología cambie drásticamente en presencia del aAuNP. La influencia del papel sigue observándose claramente en la morfología de la superficie, pero al agregar la HC a la ecuación, la superficie del sensor cambia drásticamente, por una clara influencia de las AuNP, lo cual se puede observar con claridad en la imagen 3D de la fase del sensor modificado con anticuerpos, NP y HC (página 70).

	Altura (nm)	Rugosidad RMS (Rq) (nm)
Muestra 1	720.1	60.28
Muestra 2	500.0	46.59
Muestra 3	186.5	28.49

Tabla I.3:
Altura y rugosidad de las tres muestras analizadas por AFM.

Las cadenas nanométricas (con longitudes entre los 320 y los 700 *nm*) son alineadas generando un ancho de entre 20 a 28 *nm*. Las AuNP tienen un diámetro de 20 *nm*, por lo que podemos pensar que el ancho de estas cadenas puede ser por la modificación de las AuNP con el anticuerpo, aumentando de esta forma su diámetro y su aglomeración por la presencia de HC. Esto se puede observar claramente en las imágenes 3D de altura y fase de la modificación con anticuerpos, NP y HC (páginas 69 y 70), pues su superficie es más compacta y organizada, eliminando completamente las características morfológicas del papel.

El análisis por AFM claramente muestra, que para diseñar un sensor con alta eficiencia, accesibilidad y fácil detección depende de su composición elemental, no solo de los procesos metodológicos, también del conocimiento de materiales e inspección a nivel nanométrico. Por ejemplo el análisis AFM a nivel nanométrico claramente muestra los resultados de la modificación. Esto es de gran importancia porque hasta ahora, no tenemos otros datos para la verificación y análisis detallado de la misma. Estos resultados son una combinación entre ciencia básica, ya que ayuda a comprender como funciona el sensor, y ciencia aplicada, para mejorar y optimizar su funcionamiento.

II. CONCLUSIONES

Al finalizar los métodos experimentales y el análisis de resultados, podemos concluir que:

- Se diseñó y construyó un sensor (sensor «ojos de búho», ODB) con zona de reacción y tres canales, con capacidad de $20 \mu L$ y un comportamiento microfluídico satisfactorio.
- La generación de la barrera hidrofóbica es básica para el funcionamiento de flujo lateral del sensor, por lo que el diseño y el tratamiento térmico del sensor es primordial para obtenerla.
- Por las características sensor «ODB» antes mencionadas, es capaz de detectar la presencia de cortisol en muestras de saliva en lapso no mayor a 3 minutos.
- El sensor «ODB» con principio colorimétrico, trabaja con la solución de Fenilhidrazine, en compañía de alcohol, que presenta una reacción de «blanqueamiento» después de agregada la solución de HC. Este «blanqueamiento» (o cambio de intensidad de color) es proporcional a la concentración de HC. Esta respuesta también sucede al evaluar la solución con SA e HC, y con SH. En presencia de AuNP este efecto se ve amplificado.

- En particular, la reacción de la solución de Fenilhidrazine con alcohol únicamente sucede cuando la solución es «fresca», es decir, que la solución se haya preparado el mismo día que se desea hacer el análisis, y que se agregue la solución analito (HC) 1h después de haber puesto la solución de Fenilhidrazine en el sensor «ODB». Esto significa que el sensor pierde su viabilidad rápidamente con esta solución.
- Los sensores «ODB» modificados con la solución de Difenilamina y con combinaciones de Difenilamina y Fenilhidrazine no provocaron un cambio de color significativo, por lo que se decidió descartar completamente su uso.
- Los sensores «ODB» que se modifican con la solución de Fenilhidrazine con alcohol al ser iluminados con la luz UV fluorescen. Dicha fluorescencia presenta un decaimiento en su intensidad, en relación a la concentración de HC agregada al sensor.
- El Fenilhidrazine debe de manipularse con precaución, ya que al tratarse de una amina, es altamente cancerígeno, por lo que no se recomienda su utilización.
- El sensor «ODB» modificado con anticuerpo ligado a la enzima (peroxidasa de rábano picante) no genera un cambio de coloración significativa al unirse con el antígeno, por lo que concluimos, que se requiere de un colorante externo para obtener una reacción colorimétrica notable.
- Los sensores «ODB» modificados con el colorante vegetal verde y la solución de apAuNP presenta fluorescencia bajo la luz UV y cambio de color («blanqueamiento» de la coloración verde).
- La mejor respuesta de fluorescencia se observó en los sensores «ODB» modificados con el principio de nano-ELISA «sándwich» (que consiste en la agregación de colorante vegetal rojo + aAuNP (anticuerpo con AuNP) + IpAuNP (IgG-peroxidasa con AuNP)). Sin embargo este tipo de sensor no provoca cambios colorimétricos.

- El análisis AFM demuestra cambios en la morfología de la superficie del sensor después del proceso de modificación. Se observaron cambios cualitativos y cuantitativos a nivel nanométrico. Estos resultados permitieron entender mejor el funcionamiento básico y fundamental de sensor «ODB» y puede servir en el futuro para la optimización del mismo.
- La respuesta del sensor «ODB» con el nano-ELISA «sándwich» es proporcional a la concentración de HC en SA ($0.01-1.8 \mu\text{g}/\text{ml}$, o $1-180 \mu\text{g}/\text{dL}$), que es en rango de otros sensores en uso, a nivel mundial (véase Tabla II.1, Capítulo II).
- La respuesta del sensor de «ODB» preparado con el nano-ELISA «sándwich» colorimétrica/fluorescente no presenta diferencia significativa en función del tiempo, es decir, tiene una gran estabilidad durante aproximadamente dos semanas.
- Se usó el sensor «ODB» con nano-ELISA «sándwich» en personas (6 sujetos experimentales) de diferentes géneros y edades. Fueron sujetos a una evaluación de sus niveles de HC en saliva. Esta prueba fue preliminar e interna, pero observamos una adecuada respuesta de sensor «ODB» modificado, con claras indicaciones de diferencia entre los sujetos evaluados.
- Por la simplicidad del diseño y sus características, este sensor «ODB» modificado con nano-ELISA «sándwich» es posible adecuarlo para desarrollar un nanobiosensor de estrés para uso comercial y uso doméstico.

Por todo lo anterior podemos concluir que el diseño y el proceso de fabricación del sensor «ojos de búho» (diseñado y creado en el Laboratorio de Nanotecnología e Ingeniería Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Iztapalapa en 2015) fue optimizado para su uso con muestras de saliva de $20 \mu\text{L}$, con un tiempo de absorción/secado de 3 min. De los principios activos estudiados durante la realización de este proyecto, la S-

FH + Alcohol es el que mejor resultado presenta en cuanto a un análisis de colorimetría, pues presenta un cambio de color de marrón a blanco, pero su implementación, podría comprometer la seguridad del usuario. En el caso del uso de anticuerpos, el nano-ELISA «sándwich» en papel es el que mejores resultados arroja pues a mayor HC mayor fluorescencia presenta bajo la luz UV, siendo esta la mejor opción para ser utilizada como principio activo en el desarrollo de un Nanobiosensor de Estrés comercial y de uso doméstico.

III. RECOMENDACIONES

Para la fabricación de un Nanobiosensor de Estrés que funcione por un principio colorimétrico o fluorescente, se requiere que los resultados sean también cuantitativos, es decir se requiere que se realice una estandarización del cambio de color/fluorescencia y se correlacione con la concentración de HC, por lo que se requiere de una caracterización mucho más controlada, llevando a cabo un análisis comparativo con un método estandarizado de uso comercial (Kit ELISA para cortisol en saliva comercial, Salimetrics ® (Salimetrics I.)). El uso de anticuerpos como sustrato reactivo no se ha usado nunca en papel, por lo que se requiere de un análisis de estabilidad vs. funcionalidad para verificar su comportamiento a largo plazo y de esta forma confirmar si su uso para la realización de sensor comercial es viable. Entre otras cosas es preferible aumentar sensibilidad de sensor «ODB», entre 10 y 100 veces. También es imprescindible realizar modificaciones al «ODB» con nano-ELISA «sándwich» para disminuir el alto costo de fabricación (costo aproximado actual de un sensor: 90 USD ≈1500 MXN), sin sacrificar sensibilidad, viabilidad, estabilidad ni tiempo de respuesta.

REFERENCIAS

- Aardala, E., & Holm, A. (1995). Cortisol in saliva—Reference ranges and relation to cortisol in serum. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, *33*, 927-932.
- Arya , S., Dey , A., & Bhansali , S. (2011). Polyaniline protected gold nanoparticles based mediator and label free electrochemical cortisol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *28*(1), 166-173.
- Arya, S., Chornokur, G., Venugopa, M., & Bhansali, S. (2010a). Antibody modified gold micro array electrode based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of cortisol in saliva and ISF. . *Procedia Engineering*, *5*, 804-807.
- Arya, S., Chornokur, G., Venugopal, M., & Bhansali, S. (2010b). Antibody functionalized interdigitated u-electrode (IDuE) based impedimetric cortisol biosensor. *The royal society chemistry*, *135*, 1941-1946.
- Bandodkar, A. J., & Wang, J. (Julio de 2014). Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. *Trends in biotechnology*, *32*(7), 363-371.
- Bartos, J., & Pesez, M. (1979). Colorimetric and Fluorimetric Determination of Steroids. *Pure and Applied Chemistry*, *51*(10), 2157–2169.
- Cano, A. (2005). *La naturaleza del estrés*. (Sociedad Española para el Estudio de la Ansiedad y el Estrés) Recuperado el 20 de Marzo de 2015, de <http://www.ansiedadyestres.org>
- Cingolani, H., & Houssay, A. (1945). *Fisiología Humana* (7 a ed.). El Ateneo.
- Clark, I. (1955). A colorimetric reaction for the estimation of cortisone, hydrocortisone, aldosterone and relate steroids. *Nature*, *75*(4446), 123-124.
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D., & Miller, G. E. (2007). Psychological stress and Disease. *JAMA*, *298*, 1685-1688.
- Consulta Mitofsky. (Octubre de 2012). *El estrés en la vida de los mexicanos, encuesta telefónica nacional*. Recuperado el 09 de Marzo de 2015, de <http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/mexico-opina/380-el-estres-en-la-vida-de-los-mexicanos>
- Cullum, B., & Vo-Dinh, T. (2000). Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, *366*(6-7), 540.
- De Camargo, B. (2004). Stress, general adaptation syndrome or general alarm reaction. *Revista Médico Científica*, *17*(2), 78-86.

- Departamento de prevención de riesgos del trabajo. (2014). *Guía para el estrés, causas, consecuencias y prevención*. ISSSTE.
- Drug-Bank. (s.f.). *Cortisol*, DB07886. Recuperado el 14 de Marzo de 2015, de <http://www.drugbank.ca/drug/DB07886>
- Giovindasamy, K., Potgieter, S., Land, K., & Muzenda, E. (2012). Fabrication of Paper Based Microfluidic. *World Congress Engineering, III*. London.
- Glaros, G., & Fotiadis, D. (2005). Wearable devices in helthcare. *Intelligent Paradigms for Healthcare Enterprises*, 237-264.
- Höferl, M., Krist, S., & Buchbauer, G. (2005). Adaptation of DELFIA cortisol kit for determination of salivary cortisol concentration. *Arch Pharm (Weinheim)*, 388(10), 439-497.
- Institute, National Nanotechnology. (s.f.). *Nanotechnology 101*. Recuperado el 03 de 08 de 20015, de <http://www.nano.gov>
- Jessop, D., & Turner-Cobb, J. (2008). Measurement and meaning of salivary cortisol: A focus on health and disease in children. *Informa Healthcare*, 11(1), 1-14.
- Kalant, H. (29 de Julio de 1958). Chromogenic and fluorogenic reaction of adrenocortical and other steroids in concentrated acids. *Biochemical Journal*, 69(1), 79-93.
- Kaushik, A., Vasudev, A., Arya, S. K., Khalid, P. S., & Bhansali, S. (2014). Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application. *Biosensors and Bioelectronics*, 53, 499-512.
- Kelley, W. (1993). *Medicina interna* (Vol. 1). Médica Panamericana.
- Kirschbaum, C., Strasburger, C., Wolfgang, T., & Hellhammer, D. (1989). Cortisol and Behavior: Adaptation of a radioimmunoassay kit for reliable and inexpensive salivary cortisol determination. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 34, 747-751.
- Koren, L., Mokady, O., Karaskov, T., Klein, J., Koren, G., & Geffen, E. (2002). A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Anim. Behav*, 63(2), 403-406.
- Kotanen, C., Moussy, F., Carrara, S., & Guiseppi-Elie, A. (2012). Implantable enzymeamperometric biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), 14-26.
- Kumar, A., Aravamudhan, S., Gordic, M., Bansali, S., & Mohapatra, S. (2007). Ultrasensitive detection of cortisol whith enzyme fragmentcomplementation technology using functionalized nanowire. *Biosensor and Bioelectronics*, 22(9), 2138-2144.
- Levine, A., Zagoory-Sharon, O., Feldman, R., Lewis, J. G., & Weller, A. (2007). Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiol. Behav.*, 90(1), 43-53.
- Liu, X., Zhao, R., Mao, W., Feng, H., Liu, X., & Wong, D. (2011). Detection of cortisol at gold nanoparticle / protein G-DTBP-scaffold modified electrochemical immunosensor. *The royal society of chemistry*, 136, 5204-5210.
- Lud, S., Nikolaides, M., Haase, I., Fischer, M., & Brauch, A. (2006). Field Effect of Screened Charge: Electrical Detection of Peptides and Proteins by a Thin Film Resistor. *ChemPhysChem*, 7(2), 379-384.
- Marazuela, M., & Moreno-Bondi, M. (2002). Fiber-optic biosensors and overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(5-6), 664-682.

- Martinez, A., Phillips, S., & Whitesides, G. (2000). Diagnostics for the Developing World: Microfluidic. *Analytical Chemistry Feature*, 82, 3-10.
- Michell, J., Lowe, T., & Ingram, J. (2009). Rapid ultrasensitive measurement of salivary cortisol using nano-linker chemistry coupled with surface plasmon resonance detection. *The royal society of chemistry*, 134, 380-386.
- Michels, N., Vanaelst, B., Vyncke, K., Sioen, I., Huybrechts, I., De Vriendt, T., y otros. (2012). Children's Body composition and Stress, the ChiBS study: aims, design, methods, population and. *BioMed Central*, 70(1), 17.
- Miguel , N., Pires , M., & Dong , T. (2014). Measurement of salivary cortisol by a chemiluminescent organic-based immunosensor. *BioMedical Materials and Engineering*, 24(1), 15-20.
- Nina, J., Ronkainen, Stanley, L., & Okon. (2014). Nanomaterial-Based Electrochemical Immunosensors for Clinically Significant Biomarkers. *Materials*, 7(6), 4669-4709.
- Olvera , X. E. (2013). *Dispositivo analítico basado en nanotecnología y papel para detección del cáncer de mama utilizando saliva*. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
- Olvera, X., Batina, N., & Cadena, M. (2013). *Patente n° MX/a/2013/014704*. Mexico.
- Pasha , S., Kaushik , A., Vasudev , A., Snipes , S., & Bhansali , S. (2014). Electrochemical Immunosensing of Saliva Cortisol. *Journal of The Electrochemical Society*, 161(2), B3077-B3082.
- Perez-Guzman, D., Zonana-Nach, & Valles-Medina, A. (2009). Niveles de estrés en trabajadores de la salud adscritos a unidades de medicina familiar. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 47(5), 575-579.
- Peterson, R. E. (2013). Hydrocortisone in plasma. En *Standar Methods of Clinical Chemistry: By the American Association of Clinical Chemists* (Vol. 3, págs. 160-166). Elsevier.
- Pires , N. M., & Dong, T. (2014). Measurement of salivary cortisol by a chemiluminescent organic-base immunosensor. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24, 15-20.
- Pocock, G., & Richards, C. (2004). *Human Physiology. The basis of Medicine* (2 a ed.).
- Porter, C. C., & Silver, R. H. (9 de February de 1950). A quantitative color reaction for cortisone and relate 17,21-Dihydroxy-20-ketosteroids. *Merck Institute for therapeutic research*, 201-207.
- Randstad. (15 de Julio de 2013). *Motivaciones de los mexicanos en el trabajo*. Recuperado el 09 de Marzo de 2015, de <http://www.randstad.com.mx/randstad-mexico/noticias/57-de-los-mexicanos-considera-que-el-estres-laboral-ha-impactado-negativamente-su-vida/>
- Read, G. F. (1989). Hormones in saliva. *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*, II, 147-176.
- Rowe, L., Deo, S., Shofner, J., Ensor, M., & Daunet, S. (2007). Aequorin-based homogeneous cortisol immunoassay for analysis of saliva samples. *Bioconjugate Chimestry*, 18(6), 1772-1777.
- Russell, E., Koren, G., Reider, M., & Van Uum, S. (2012). The detection of cortisol in human sweat: implications for measurement of cortisol in hair. *Endocr. Rev.*, 33, 03.
- Saiyudthong , S., Suwannarat, P., Trongwongsa , T., & Srisurapanon , S. (2010). Comparison between ECL and ELISA for the detection of salivary cortisol and determination of

- the relationship between cortisol in saliva and serum measured by ECL. *ScienceAsia*, 36, 169-171.
- Salimetrics. (26 de 02 de 2014). *Salimetrics*. Recuperado el 31 de 10 de 2015, de <https://www.salimetrics.com/assets/documents/1-3902.pdf>
- Salimetrics, I. (s.f.). *Salimetrics ELISA Kit (Saliva)*. Recuperado el 29 de 10 de 2015, de <https://www.salimetrics.com/assets/documents/1-3002n.pdf>
- Sauvé, B., Koren, G., Walsh, G., Tokmakejian, S., & Van Uum, S. (2007). Measurement of cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clinical and Investigative Medicine*, 30(5), E183-E191.
- Scholar, G. (s.f.). *Google Scholar*. Recuperado el 14 de Octubre de 2015, de <https://scholar.google.com.mx/>
- Schulz, E. P., & Neuss, J. D. (1957). Colorimetric assay for cortisone, hydrocortisone and related steroids. *Analytical Chemistry*, 29(11), 1662-1665.
- Shanmugam, S., Thandavan, K., Gandhi, S., Sethuram, S., Rayappan, J. B., & Krishnan, U. M. (2011). Development and evaluation of a highly sensitive rapid response enzymatic nanointerfaced biosensor for detection of putrescine. *Analyst*, 133(24), 5234-5240.
- Small, B. C., & Davis, K. B. (2007). Validation of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma cortisol in channel catfish *Ictalurus*. *J. World Aquac. Soc.*, 33(2), 184-187.
- Stalder, T., & Kirschbaum, C. (2012). Analysis of cortisol in hair- State of art future directions. *Brain Behavior and Immunity*, 26, 1019-1029.
- Streckfus, C. F., & Bigler, L. R. (Marzo de 2002). Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Diseases*, 8(2), 69-76.
- Sun, K., Ramgir, N., & Bhansali, S. (2008). An immunoelectrochemical sensor for salivary cortisol measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133(2), 533-537.
- Teruhisa, U., Ryoji, H., Taisuke, I., Tatsuya, S., Fumihiro, M., & Tatsuo, S. (1981). Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin.Chim.Acta*, 110(2), 245-253.
- Tilli, C., Myung, N., Shatty, V., & Mulchandani, A. (2011). Label-free, chemiresistor immunosensor for stress biomarker cortisol in saliva. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4382-4386.
- Turner, A., Wilson, G., & Kaube, I. (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, 770.
- Ueno, Y., Furukawa, K., Hayashi, K., Takamura, M., Hibino, H., & Tamechika, E. (2013). Graphene-modified Interdigitated Array Electrode: Fabrication, Characterization, and Electrochemical Immunoassay Application. *Analytical Sciences*, 29(1), 55-60.
- Urban, A. (2009). Micro and Nanobiosensors state of the art and trends. *Measurements Science and Technology*, 2001.
- Van Caenegem, E., Wierckx, K., Fiers, T., Segers, H., Vandersypt, E., Kaufman, J., y otros. (2011). Salivary cortisol and testosterone: a comparison of salivary sample collection methods in healthy controls. *Endocr. Abstr.*, 355.

- VanBruggen, M., Hackney, A., McMurray, R., & Ondrak, K. (2011). The relationship between serum and salivary cortisol levels in response to different intensities of exercise. *Int. J. Sports Physiol. Perform.*, 6(3), 396.
- Vasudev , A., Kaushik , A., Tomizawa, Y., Norena , N., & Bhansali , S. (2013). An LTCC-based microfluidic system for label-free, electrochemical detection of cortisol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182, 139-146.
- Vegnugopal, M., Arya, S. K., Chornoku, G., & Bhansali, S. (2011). A realtime and continuous assessment of cortisol in ISF using electrochemical impedance spectroscopy. *Sensors Actuators A: Phys*, 172(1), 154-160.
- Venugopal, M., Feuvrel, K. E., Mongin, D., Bambot, S., Faupel, M., Panangadan, A., y otros. (2008). Clinical evaluation of a novel interstitial fluid sensor system for remote continuous alcohol monitoring. *Sensors J. IEEE*, 8(1), 71-80.
- Weerth, C., Zijl, R., & Buitelaar, J. (2003). Development of cortisol circadian rhythm in infancy. *Early Human Development*, 73(1-2), 39-52.
- Yamaguchi , M., Yoshikawa , S., Tahara , Y., Niwa , D., Imai , Y., & Shetty, V. (2009). Point-of-use measurement of salivary cortisol levels. *Sensors IEEE*, 343-346.
- Yamaguchi, M., Matsuda, Y., Yoshikawa , S., Sasaki , M., Imai , Y., Niwa , D., y otros. (2013). Rapid hormone immunosensor with fluid control mechanism Solid-State Sensors. *Actuators and Microsystems Conference (TRANSDUCERS) 16th International*, (págs. 1164-1167).

REFERENCIAS DE FIGURAS

I. CAPITULO I

- [F I.1] De Camargo, B. (2004). Stress, general adaptation syndrome or general alarm reaction. *Revista Médico Científica* , 17 (2), 78-86.
- [F II.1] Kaushik, A., Vasudev, A., Arya, S. K., Khalid, P. S., & Bhansali, S. (2014). Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application. *Biosensors and Bioelectronics* , 53, 499-512.
- [F II.2] De Camargo, B. (2004). Stress, general adaptation syndrome or general alarm reaction. *Revista Médico Científica* , 17 (2), 78-86.
- [F II.3] De Camargo, B. (2004). Stress, general adaptation syndrome or general alarm reaction. *Revista Médico Científica* , 17 (2), 78-86.
- [F II.4] Consulta Mitofsky. (Octubre de 2012). *El estrés en la vida de los mexicanos, encuesta telefonica nacional*. Recuperado el 09 de Marzo de 2015, de <http://consulta.mx/web/index.php/estudios-e-investigaciones/mexico-opina/380-el-estres-en-la-vida-de-los-mexicanos>
- [F III.1] Drug-Bank. (s.f.). *Cortisol*, DB07886. Recuperado el 14 de Marzo de 2015, de <http://www.drugbank.ca/drug/DB07886>
- [F III.2] Pocock, G., & Richards, C. (2004). *Human Physiology. The basis of Medicine* (2 a ed.).

II. CAPITULO II

- [F I.1] Scholar, G. (s.f.). *Google Scholar*. Recuperado el 14 de Octubre de 2015, de https://scholar.google.com.mx/scholar?q=saliva+sensor&hl=es&as_sdt=0,5
- [F III.1] Scholar, G. (s.f.). *Google Scholar*. Recuperado el 22 de Octubre de 2015, de <https://scholar.google.com.mx/>

IV. CAPITULO IV

- [F I.6] Bartos, J., & Pesez, M. (1979). Colorimetric and Fluorimetric Determination of Steroids. *Pure and Applied Chemistry*, 51(10), 2157–2169.

ANEXOS

A.I.Desarrollo y características de los sensores en proceso de diseño y fabricación

Se deseaba diseñar y fabricar un sensor en papel que tuviera canales para que se comportara como un dispositivo microfluídico. Para ello se requiere que cuente con barreras hidrofóbicas que ayuden a movilizar el líquido para que no tarde más de 3 min en generar una reacción. También se desea que la zona de reacción sea lo suficientemente grande para ser visible por el ojo humano, pero lo suficientemente pequeña para minimizar el costo del uso de nanopartículas. Se pretende que el sensor cuente con un espacio suficiente para conservar sin fugas un volumen aproximado de $20 \mu L$.

A continuación se encuentran las primeras versiones de diseño y por qué se descartaron al no cumplir con las especificaciones antes mencionadas.

1. Sensor a)

- i. Características físicas del sensor antes y después del tratamiento térmico

En la Figura A.I.1 se aprecia la planilla del primer sensor con una zona de reacción grande para ser apreciada por el ojo humano. Este sensor también fue tratado térmicamente para generar la barrera hidrofóbica. En la Tabla A.I.1. Se muestran las dimensiones del sensor antes y después del tratamiento térmico.

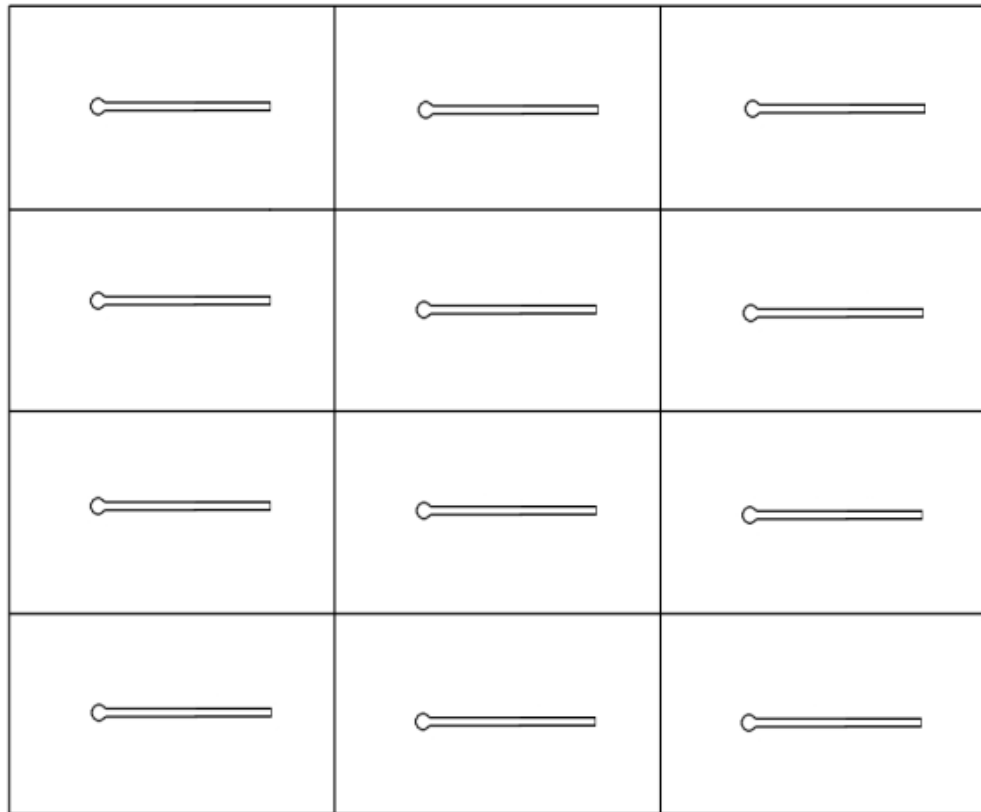


Figura A.I.1 Planilla del sensor a) (véase Figura II.1 Capítulo III).

Tabla A.I.1:
Comparación de las dimensiones del sensor a) antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Diámetro de la zona de reacción	7.8 mm	7.8 mm
Área de la zona de reacción	24.5 mm ²	24.5 mm ²
Ancho del canal	1.3 mm	1.3 mm
Longitud del canal	40.7 mm	40.7 mm
Área total	77.41 mm ²	77.41 mm ²

ii. Funcionamiento de la barrera hidrofílica

Este sensor se imprimió con ayuda de una impresora láser (HP Láser Jet 600) y posteriormente se dibujó el contorno con un lápiz de cera (Olvera X. E., 2013), la cual se expuso a un tratamiento térmico. Se realizaron diversas pruebas para determinar qué parámetros se requerían para generar una adecuada barrera hidrofóbica. La barrera hidrofóbica funciona adecuadamente en este sensor, tanto para agua como para SA coloreada (Figura A.I.2). Las

medidas del sensor no cambiaron pues la cera del lápiz únicamente se colocó en la periferia o sobre el contorno del sensor.

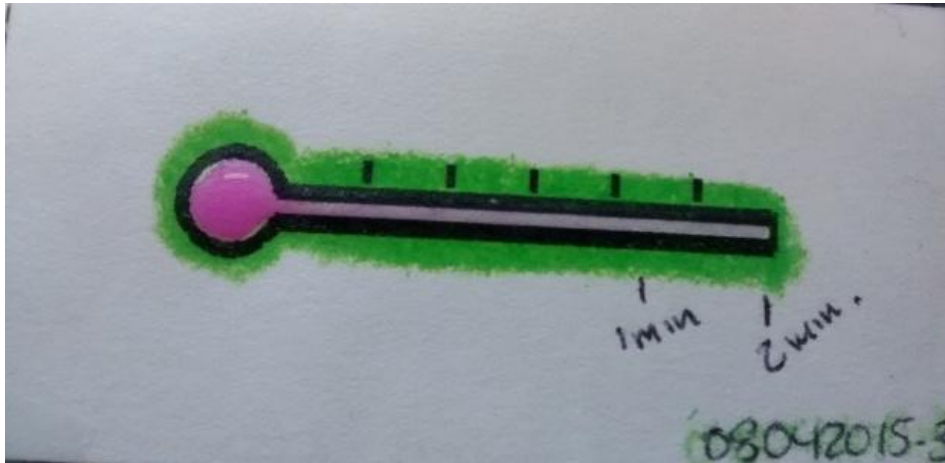


Figura A.I.2: Sensor a) con barrera hidrofóbica dibujada con un lápiz de cera, después del tratamiento térmico.

iii. Problemas del sensor

Aunque este sensor funcionaba adecuadamente para agua y SA, pues el líquido tardaba entre minuto y medio y dos minutos en recorrer todo el sensor. Pero el área de reacción era muy grande para su utilización con NP. Por lo cual este sensor se descartó.

2. Sensor b)

i. Características físicas del sensor antes y después del tratamiento térmico

En la Figura A.I.3 se aprecia la planilla del segundo sensor, en este caso se decidió eliminar la zona de reacción y solo dejar el canal. Este sensor también fue tratado térmicamente para generar la barrera hidrofóbica. En la Tabla A.I.2. Se muestran las dimensiones del sensor antes y después del tratamiento térmico.

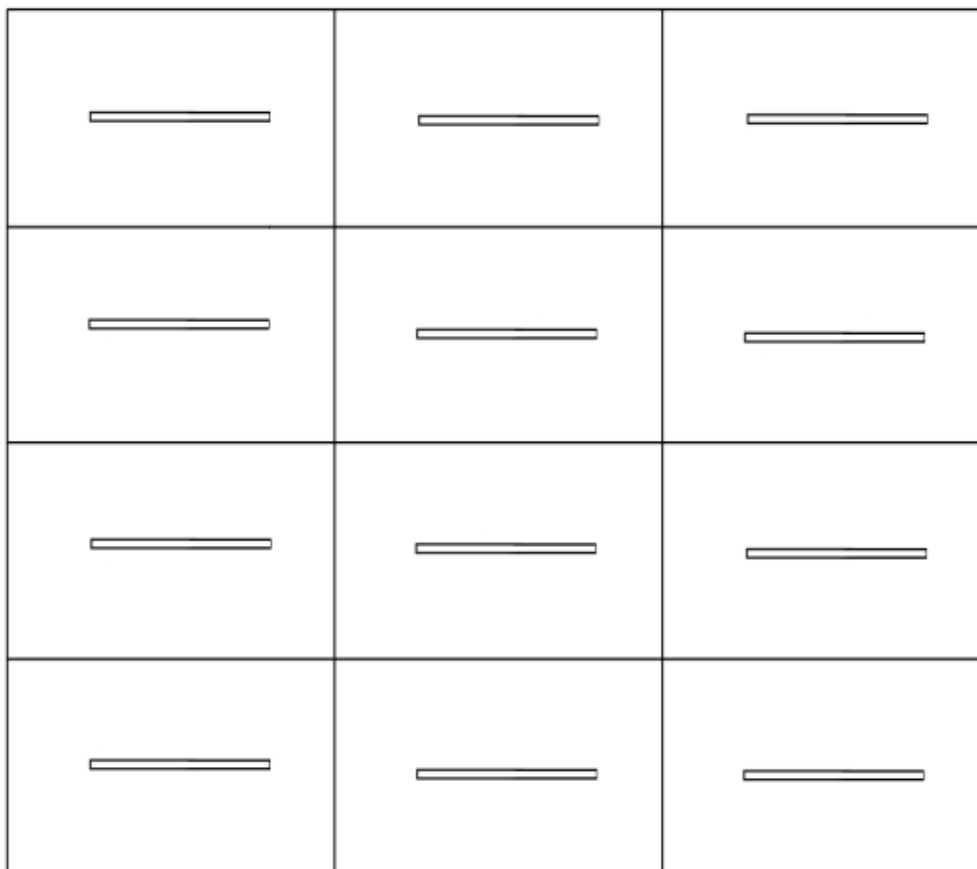


Figura A.I.3: Planilla del sensor b) (véase Figura II.1 Capítulo III).

Tabla A.I.2:
Comparación de las dimensiones del sensor b) antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Ancho del canal	1.5 mm	1.5 mm
Longitud del canal	43.3 mm	43.3 mm
Área total	54.9 mm ²	54.9 mm ²

ii. Funcionamiento de la barrera hidrofílica

Este sensor se imprimió con ayuda de una impresora láser (HP Láser Jet 600) y posteriormente se dibujó el contorno con un lápiz de cera, el cual se expuso a un tratamiento térmico. Se realizaron diversas pruebas para determinar qué parámetros se requerían para generar una adecuada barrera hidrofóbica. La barrera hidrofóbica funciona adecuadamente en este sensor, tanto para agua como para SA coloreada (Figura A.I.4). Las medidas del sensor

no cambian pues la cera del lápiz únicamente se colocó en la periferia o sobre el contorno del sensor.

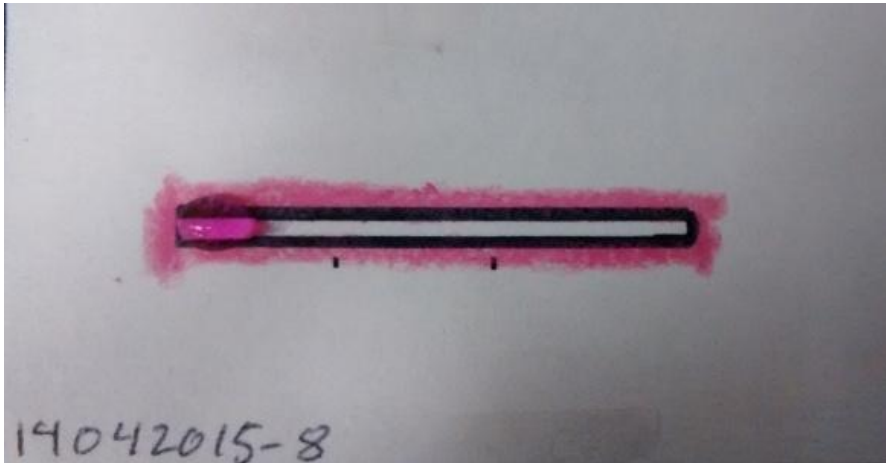


Figura A.I.4: Sensor b) con barrera hidrofóbica dibujada con un lápiz de cera, después del tratamiento térmico.

iii. Problemas del sensor

Este sensor, no funcionaba como un sensor de flujo lateral, ya que después de 8 minutos el líquido no era conducido por el canal, razón por la cual se descartó el uso de este sensor.

3. Sensor c)

i. Características físicas del sensor antes y después del tratamiento térmico

En la Figura A.I.5 se aprecia la planilla del tercer sensor, se decidió regresar al diseño con zona de reacción, pero en este caso hacer la zona más pequeña y el canal más delgado para que su avance fuera más rápido. Este sensor también fue tratado térmicamente para generar la barrera hidrofóbica. En la Tabla A.I.3. Se muestran las dimensiones del sensor antes y después del tratamiento térmico.

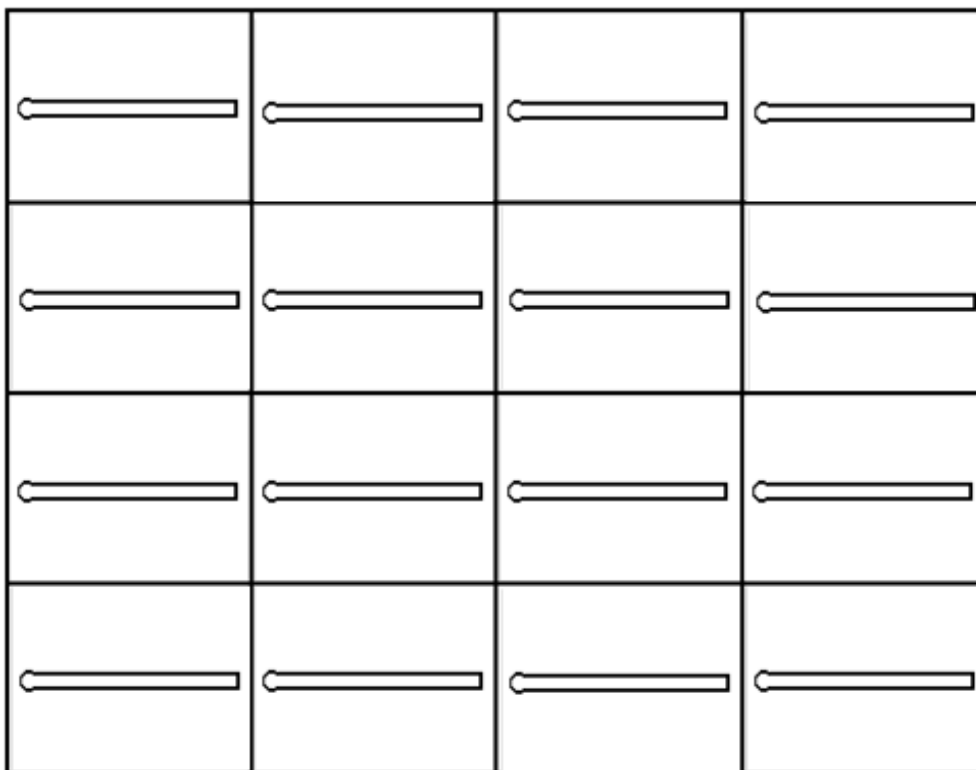


Figura A.I.5: Planilla del sensor c) (véase Figura II.1 Capítulo III).

Tabla A.I.3:
Comparación de las dimensiones del sensor c) antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Diámetro de la zona de reacción	3 mm	2.7 mm
Área de la zona de reacción	9.4 mm ²	8.5 mm ²
Ancho del canal	1.4 mm	1 mm
Longitud del canal	24 mm	23.9 mm
Área total	43 mm ²	32.4 mm ²

ii. Funcionamiento de la barrera hidrofílica

Este sensor se imprimió utilizando la impresora Xerox Phaser 8560 y posteriormente se expuso a un tratamiento térmico. Se realizaron diversas pruebas para determinar que parámetros se requerían para generar una adecuada barrera hidrofóbica. La barrera hidrofóbica funciona adecuadamente en este sensor, tanto para agua como para SA coloreada (Figura A.I.6).

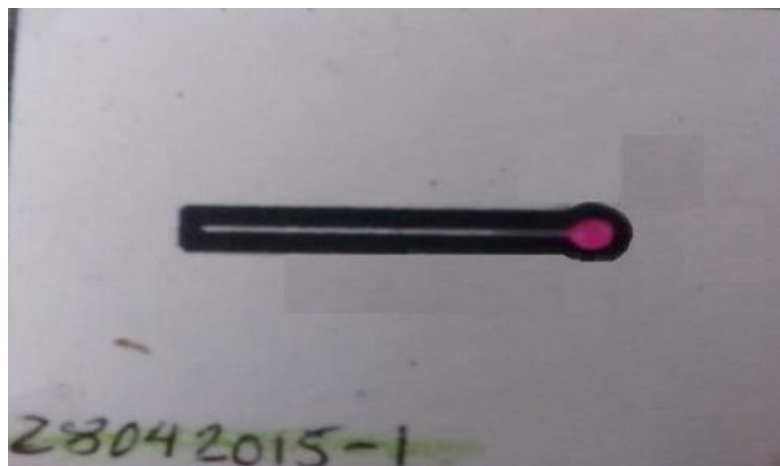


Figura A.I.6: Sensor c) después del tratamiento térmico.

iii. Problemas del sensor

Este sensor funciona adecuadamente tanto para agua como para SA por lo cual fue una opción viable para continuar con la siguiente fase. El volumen máximo que soportaba este sensor era de $10 \mu\text{L}$ y el tiempo de llenado fue de 1 min, por lo que se decidió que podía pasar a la siguiente fase, es decir usarse con soluciones reactivas. Por desgracia al agregar la solución reactiva, ésta hace que la barrera hidrofílica se rompa, razón por la cual este sensor fue descartado.

4. Sensor d)

En la Figura A.I.7 se aprecia la planilla del cuarto sensor, se decidió que era necesario que el sensor contara con una zona de reacción y canales que pudieran ser usados como desagüe de la muestra, para de esta forma aumentar la capacidad volumétrica del sensor. Este sensor también fue tratado térmicamente para generar la barrera hidrofóbica. En la Tabla A.I.4. Se muestran las dimensiones del sensor antes y después del tratamiento térmico.

i. Características físicas del sensor antes y después del tratamiento térmico

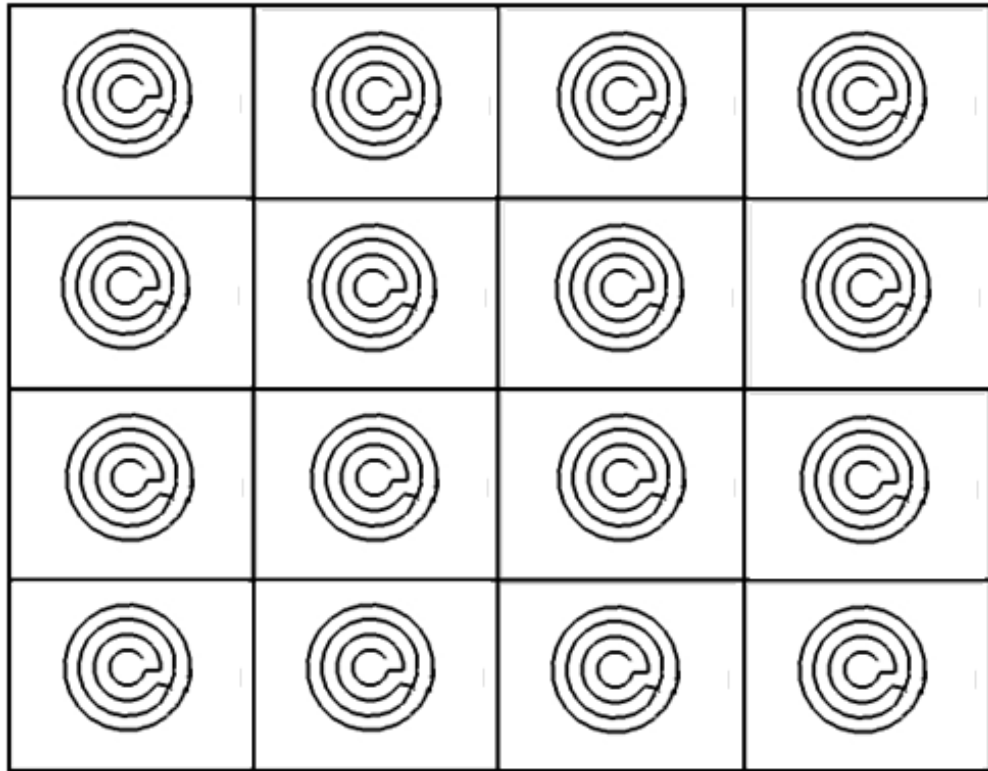


Figura A.I.7: Planilla del sensor d) (véase Figura II.1 Capítulo III).

Tabla A.I.4:
Comparación de las dimensiones del sensor d) antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Diámetro de la zona de reacción	3.2 mm	3.1 mm
Área de la zona de reacción	10.1 mm ²	9.7 mm ²
Ancho del canal	1 mm	0.7 mm
Longitud del canal	87.7 mm	85 mm
Área total	97.7 mm ²	69.2 mm ²

ii. Funcionamiento de la barrera hidrofílica

Este sensor se imprimió utilizando la impresora Xerox Phaser 8560 y posteriormente se expuso a un tratamiento térmico. Se realizaron diversas pruebas para determinar que parámetros se requerían para generar una barrera

hidrofóbica adecuada. La barrera hidrofóbica funciona adecuadamente en este sensor, tanto para agua como para SA coloreada (Figura A.I.8).



Figura A.I.8: Sensor d) después del tratamiento térmico.

iii. Problemas del sensor

Después del tratamiento térmico los canales se hicieron muy estrechos provocando que la solución de SA coloreada tarde mucho en absorberse, entre 10 y 12 min. El paso tan lento del fluido hace que la barrera hidrofílica se rompa, invadiendo por debajo las otras zonas. Por esta razón este sensor fue descartado.

5. Sensor e)

i. Características físicas del sensor antes y después del tratamiento térmico

En la Figura A.I.9 se aprecia la planilla del quinto sensor, en este caso se determinó que la necesidad de tener un control era necesario. Este sensor también fue tratado térmicamente para generar la barrera hidrofóbica. En la Tabla A.I.5. Se muestran las dimensiones del sensor antes y después del tratamiento térmico.

Este sensor cuenta con dos zonas de reacción y dos longitudes de canal diferentes. El círculo del centro funcionaría como zona reactiva y el del extremo inferior como control.

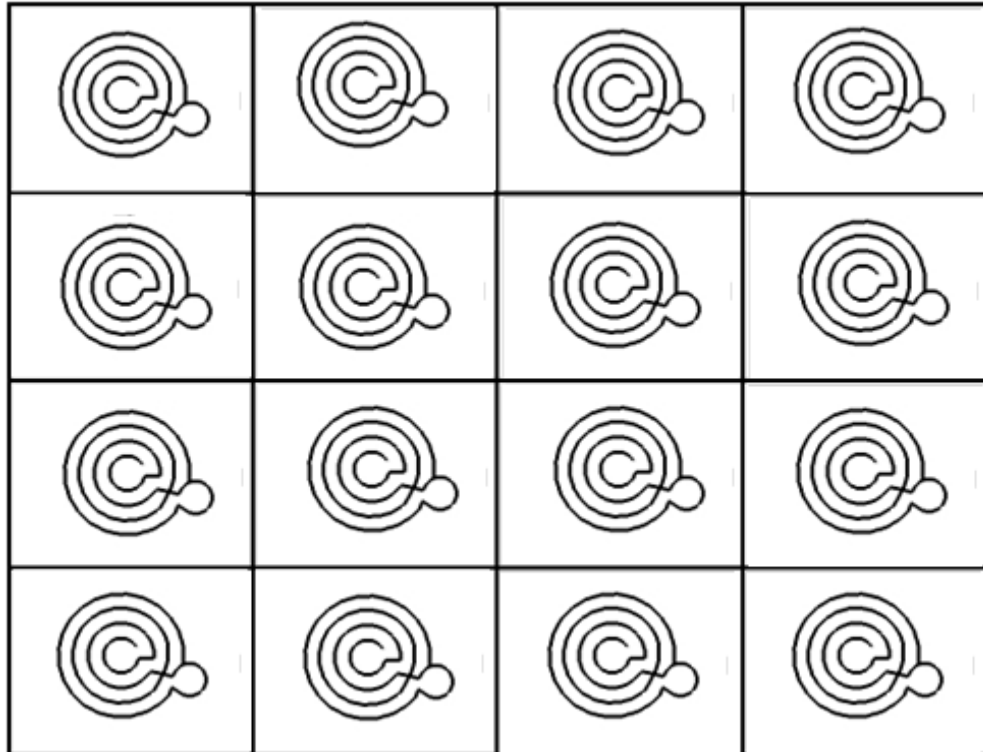


Figura A.I.9: Planilla del sensor e) (véase Figura II.1 Capítulo III).

Tabla A.I.5:
Comparación de las dimensiones del sensor e) antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Diámetro de la zona de reacción 1	4.1 mm	3 mm
Área de la zona de reacción 1	12.9 mm ²	9.4 mm ²
Ancho del canal 1	1.4 mm	1 mm
Longitud del canal 1	48.5 mm	40 mm
Diámetro de la zona de reacción 2	3.8 mm	2.6 mm
Área de la zona de reacción 2	11.9 mm ²	8.2 mm ²
Ancho del canal 2	1.2 mm	0.8 mm
Longitud del canal 2	42.1 mm	41.6 mm
Área total	143.2 mm ²	85.3 mm ²

ii. Funcionamiento de la barrera hidrofílica

Este sensor se imprimió utilizando la impresora Xerox Phaser 8560 y posteriormente se expuso a un tratamiento térmico. Se realizaron diversas pruebas para determinar qué parámetros se requerían para generar una adecuada barrera hidrofóbica, pero no fue posible pues la solución pasaba del canal 1 al canal 2 (Figura A.I.10).



Figura A.I.10: Sensor e) después del tratamiento térmico.

iii. Problemas del sensor

Este sensor fue descartado porque sin importar los parámetros del tratamiento térmico siempre presentaba fuga del primer canal hacia el segundo.

6. Sensor f)

i. Características físicas del sensor antes y después del tratamiento térmico

En la Figura A.I.11 se aprecia la planilla del sexto sensor, se decidió usar dos zonas de reacción y una de control como primicia para el diseño de este sensor. Este sensor también fue tratado térmicamente para generar la barrera hidrofóbica. En la Tabla A.I.6. Se muestran las dimensiones del sensor antes y después del tratamiento térmico.

Este sensor cuenta con tres zonas reactivas y tres canales independientes. Este diseño se realizó pensando en la capacidad de realizar mediciones de otro tipo. Las tres zonas reactivas tienen las mismas dimensiones.

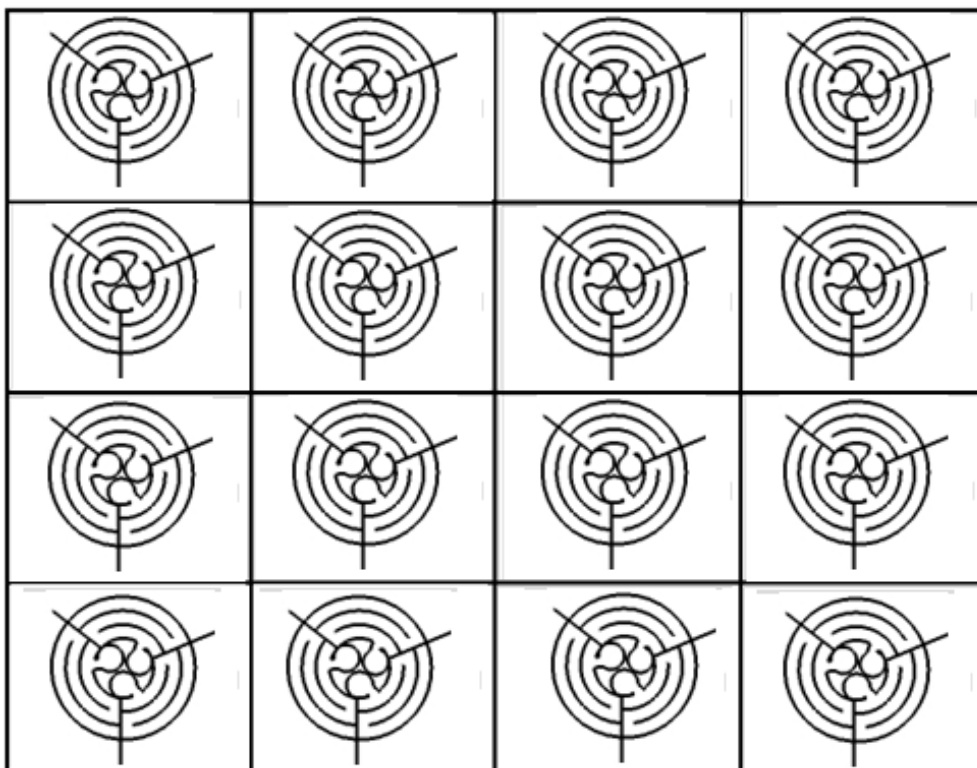


Figura A.I.11: Planilla del sensor f) (véase Figura II.1 Capítulo III).

Tabla A.I.6: Comparación de las dimensiones del sensor f) antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Diámetro de la zona de reacción	3.9 mm	2 mm
Área de la zona de reacción	12.3 mm ²	6.3 mm ²
Ancho del canal	1.6 mm	0.9 mm
Longitud del canal	41.2 mm	32.7 mm
Área total	78.2 mm ²	35.7 mm ²

ii. Funcionamiento de la barrera hidrofílica

Este sensor se imprimió utilizando la impresora Xerox Phaser 8560 y posteriormente se expuso a un tratamiento térmico. Se realizaron diversas

pruebas para determinar que parámetros se requerían para generar una adecuada barrera hidrofóbica. La barrera hidrofóbica sella el paso del líquido a través del canal (Figura A.I.12).



Figura A.I.12: Sensor f) después del tratamiento térmico.

iii. Problemas del sensor

El tratamiento térmico provoca que el material hidrofóbico tape los canales de cada zona reactiva y por lo tanto al no tener forma de escapar el líquido se desborda en el centro del sensor después de minutos de agregada la solución.

7. Sensor g)

i. Características físicas del sensor antes y después del tratamiento térmico

En la Figura A.I.13 se aprecia la planilla del séptimo sensor, este sensor cuenta con dos zonas circulares, una de reacción y otra para control, y canales largos para servir de desagüe y aumentar la capacidad del sensor. Este sensor también fue tratado térmicamente para generar la barrera hidrofóbica. En la Tabla A.I.7. Se muestran las dimensiones del sensor antes y después del tratamiento térmico.

Este sensor cuenta con dos zonas de reacción exactamente iguales. El lado izquierdo funcionaría como zona reactiva y el lado izquierdo como control.

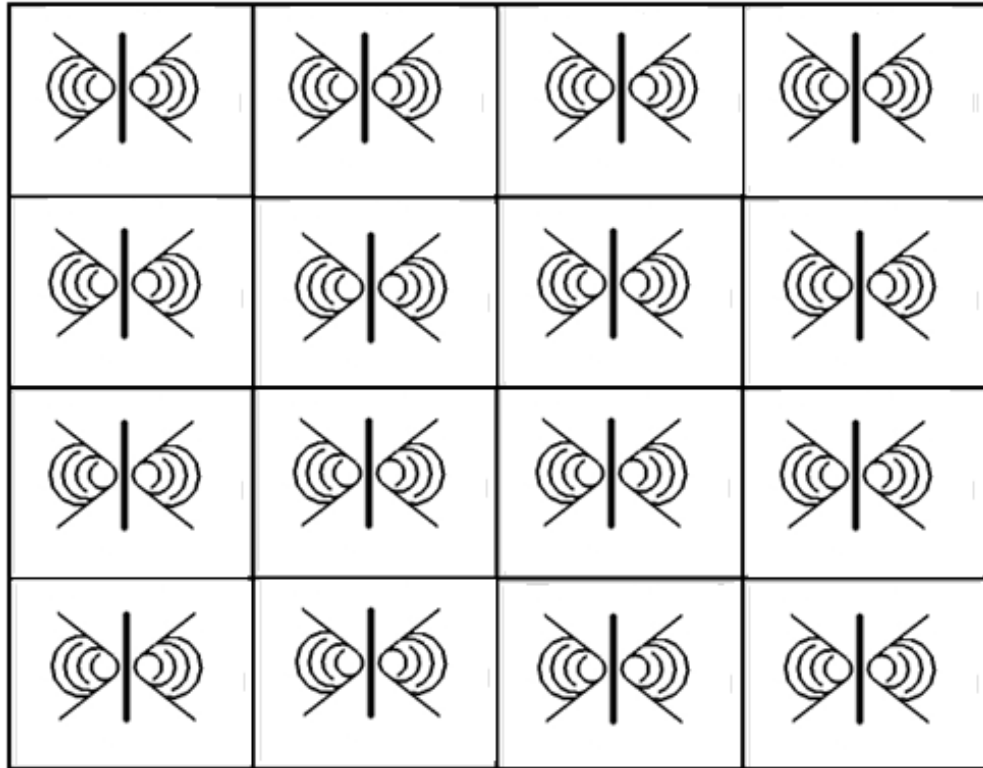


Figura A.I.13: Planilla del sensor g) (véase Figura II.1 Capítulo III).

Tabla A.I.7:
Comparación de las dimensiones del sensor g) antes y después del tratamiento térmico.

	Sin tratamiento térmico	Con tratamiento térmico
Diámetro de la zona de reacción	3.3 mm	2.5 mm
Área de la zona de reacción	10.4 mm ²	7.8 mm ²
Ancho del canal	1.6 mm	0.8 mm
Longitud del canal	26.1 mm	24 mm
Área total	52.16 mm ²	27 mm ²

ii. Funcionamiento de la barrera hidrofílica

Este sensor se imprimió utilizando la impresora Xerox Phaser 8560 y posteriormente se expuso a un tratamiento térmico. Se realizaron diversas pruebas para determinar qué parámetros se requerían para generar una

adecuada barrera hidrofóbica. La barrera hidrofóbica sella el paso del líquido a través del canal (Figura A.I.14)



Figura A.I.14: Sensor g) después del tratamiento térmico.

iii. Problemas del sensor

El tratamiento térmico provoca que el material hidrofóbico tape los canales de cada zona reactiva y por lo tanto al no tener forma de escapar el líquido se desborda en todo el sensor.

Finalmente se diseñó el sensor número ocho (véase Figura II.1 Capítulo III) o sensor «ojos de búho» que es una versión optimizada del sensor g); que cumple con los requisitos deseados para la realización de este proyecto. Este sensor tiene 3 canales y una zona de reacción, con una capacidad volumétrica de $\pm 20 \mu L$ de solución, tiene un tiempo de llenado de 1 a 2 minutos con un líquido poco viscoso y hasta 3 minutos con SA.

A.II.Reactivos, soluciones utilizadas y protocolos

I. Reactivos

Acetato de Sodio (Sigma Aldrich, EE. UU.)

Ácido Acético Glacial (Mallinckrodt AR 98.96%, EE.UU.)

Ácido clorhídrico (J.T. Baker 37.4%, EE.UU.)

Ácido Sulfúrico (J.T. Baker 98.8%, EE.UU.)

Alcohol de caña 96% (Científica Vela Quin S.A de C.V)

Anti-Cortisol (Sigma Aldrich, EE: UU.)

AuNP 20nm Gold Colloid (Tell Pella Inc., EE. UU.)

Cloruro de Potasio (Sigma Aldrich $\geq 99\%$, EE.UU.)

Cloruro de Sodio (Sigma Aldrich $\geq 99\%$, EE.UU.)

Colorante vegetal (McCormick®)

Cristal Violeta (Kanto Chemical CO., INC.)

Difenilamina (Sigma Aldrich, EE. UU)

Fenilhidrazine (Sigma Aldrich, EE. UU.)

Fosfato de Disódico (Sigma Aldrich $\geq 99\%$, EE.UU.)

Fosfato de Potasio Monobásico (Sigma Aldrich $\geq 99\%$, EE.UU.)

Hidrocortisona (Sigma Aldrich, EE. UU.)

IgG de suero humano (Sigma Aldrich, EE.UU.)

Naranja de Metilo (Sigma Aldrich, EE.UU.)

Peroxidasa de Rábano Picante (Sigma Aldrich, EE. UU.)

Pigmento Azul primario (pintura para óleo) (Lefranc & Bourgeois)

Rodamina B (Kanto Chemical CO., INC.)

Saliva Artificial (Laboratorio de Biomateriales Dentales UNAM, México)

II. Soluciones

1. Saliva Artificial

En 500 ml de agua desionizada y estéril agregar:

2 g	Fosfato de potasio monobásico
2 g	Fosfato de potasio tribásico
1 g	Cloruro de sodio
1 g	Cloruro de calcio
0.3 g	Fluoruro
4 g	Carboximetil celulosa

i. SA sin aglutinante

La solución de SA sin aglutinante tiene la misma conformación en sales, pero son omitidos los 4 g de Carboximetil celulosa.

2. Hidrocortisona

i. Solución de HC en agua

En 500 ml de H₂O desionizada ultrapura *Milli-Q* agregar:

0.9 mg	Hidrocortisona
-----------	----------------

ii. Solución de HC en PBS

En 500 ml de PBS agregar:

0.9 mg	Hidrocortisona
--------	----------------

iii. Solución de HC en SA

En 500 ml de SA con o sin aglutinante

0.9 mg	Hidrocortisona
--------	----------------

3. Solución de Fenilhidrazine (S-FH)

2 g Fenilhidrazine
3 g Acetato de Sodio
15 H₂O desionizada ultrapura
ml *Milli-Q*

4. Solución de Difenilamina (S-DA)

60 mg Difenilamina
0.6 ml Ácido sulfúrico concentrado
4.5 ml Ácido Acético glacial
1 ml H₂O desionizada ultrapura
Milli-Q

5. Solución reactiva con AuNP

1 ml Solución reactiva (S-FH, S-DA, ap,
aIgGp)
10 µl AuNP

6. Cristal Violeta (1 X 10⁻³ M) (CV)

En 500 ml de H₂O desionizada ultrapura *Milli-Q* agregar:

0.203 Cristal Violeta
g (C₂₅H₃₀ClN₃)

7. Rodamina-b

i. Rodamina-b (1 X 10⁻³ M)

En 500 ml de H₂O desionizada ultrapura *Milli-Q* agregar:

0.239 Rodamina-b
g (C₂₈H₃₁ClN₂O₃)

ii. Rodamina-b (1 X 10⁻² M)

En 500 ml de H₂O desionizada ultrapura *Milli-Q* agregar:

2.395 Rodamina-b

g $(C_{28}H_{31}ClN_2O_3)$

iii. Agua con Rodamina-b

50 H₂O desionizada ultrapura
ml *Milli-Q*
5 ml Rodamina-b 1×10^{-3} M

iv. SA con Rodamina-b

50 H₂O desionizada ultrapura
ml *Milli-Q*
5 ml Rodamina-b 1×10^{-3} M

v. Saliva Humana con Rodamina-b

50 H₂O desionizada ultrapura
ml *Milli-Q*
5 ml Rodamina-b 1×10^{-3} M

8. Naranja de Metilo (1×10^{-3} M) (NM)

En 500 ml de H₂O desionizada ultrapura *Milli-Q* agregar:

0.164 Naranja de Metilo
g $(C_{14}H_{14}N_3NaO_3S)$

9. H₂SO₄ (1×10^{-3} M)

500 H₂O desionizada ultrapura
ml *Milli-Q*
0.03 H₂SO₄ a 98.8%
ml

10. Solución amortiguadora de potasio (PBS)

En 800 ml de H₂O desionizada ultrapura *Milli-Q*

8 g NaCl
0.2 g KCl

1.44 g Na_2HPO_4

0.24 g KH_2PO_4

Con HCl ajustar el pH a 7.4, posteriormente llevar el volumen a 1L.

11. Reconstitución del anticuerpo

Agregar 5 ml de PBS al vial de Anti-Cortisol liofilizado.

12. Reconstrucción de la IgG

Agregar 10 ml de PBS a 0.1M al vial de IgG.

13. Reconstrucción de la peroxidasa de rábano picante

Agregar 5 ml de PBS a 0.1M al vial de peroxidasa de rábano picante.

III. Protocolos

1. Limpieza de instrumental y cristalería

La limpieza de la cristalería y el material metálico se realizó bajo el siguiente protocolo:

- Lavar y enjabonar hasta que no existan residuos de ningún tipo.
- Posteriormente enjuagar con abundante agua para eliminar completamente el jabón del material.
- Sumergir el material metálico (5 min) y la cristalería (24h) en ácido crómico ($\text{K}_2\text{CrO}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$).
- Enjuagar con abundante agua (desionizada ultrapura *Milli-Q*) hasta eliminar cualquier rastro de ácido crómico (solución amarilla/marrón) del material, hasta que el enjuague sea completamente incoloro.

De esta forma nos aseguramos que no quede ningún tipo de impureza en el material que pudiese interferir con el desarrollo o

resultados de los experimentos. Se requiere del uso de bata, guantes, cubre bocas y gafas protectoras en todo momento, así como el uso de pinzas, para evitar el contacto directo con el ácido crómico, es necesario trabajar siempre dentro de la campana de extracción.

2. Esterilización de material plástico

La limpieza del material plástico (tubos eppendorf, puntas de micropipetas) se realizó bajo el siguiente protocolo:

- Se colocaron los tubos eppendorf en un recipiente de vidrio con tapa y se cubre con papel aluminio y se mete en una bolsa de plástico.
- Se colocan las puntas en cajas para micropipetas y se cubren con aluminio y se meten en una bolsa de plástico.
- Se colocan las cajas y el frasco en el esterilizador eléctrico de vapor a presión a 15 psi. Por 20 min.

3. Preparación de solución con AuNP

Para agregar a cualquier solución AuNP se siguió el siguiente protocolo:

- Poner la solución coloide en tratamiento ultrasónico de 1-2 min.
- Agregar 10 μ L de la solución coloide en 1 mL de la solución reactiva.

4. Preparación del sujeto experimental para la extracción de saliva humana

Para extraer la saliva humana se requiere seguir el siguiente protocolo para la preparación del sujeto experimental.

- Se requiere que el sujeto no se haya cepillado los dientes, comido o bebido nada en las 2h anteriores a la toma de la muestra.
- Se requiere hacer una revisión de la cavidad bucal buscando algún tipo de laceración. En caso de existir, el sujeto no se puede realizar la extracción pues puede existir contaminación por sangre en la saliva.
- En otro caso, se realizan tres enjuagues con agua ultrapura *Milli-Q* fría.
- Se le proporciona al sujeto un trozo de Parafilm® M para mascar y estimular la salivación.
- Se recolectan de 1 a 5 ml de saliva en un recipiente de vidrio limpio y estéril.

5. Marcación del anticuerpo con la peroxidasa de rábano picante

Para marcar la IgG (de suero humano y Anti-Cor) con la peroxidasa de rábano picante se requiere agregar partes iguales de peroxidasa y de IgG.

A.III.Resultados experimentales

Los resultados de los diferentes protocolos utilizados en la realización de este proyecto se pueden encontrar en este anexo. Cada sensor se etiqueta de la siguiente forma:

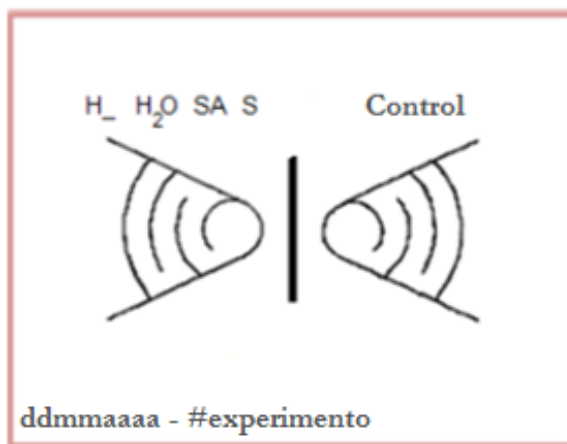


Figura A.III.1:
Nomenclatura de los sensores experimentales.

Donde la fecha del experimento está escrita en el formato de dd/mm/aaaa sin espacios. Posterior a la fecha se escribió el número de sensor utilizado. En la parte superior izquierdo, se puso el tipo de analito y el derecho se queda en blanco pues es el lado utilizado como control. El analito pudo ser de cuatro tipos: H (solución con diferentes concentraciones de hidrocortisona), agua (desionizada ultrapura *Milli-Q*), saliva artificial (SA) y saliva humana (SH).

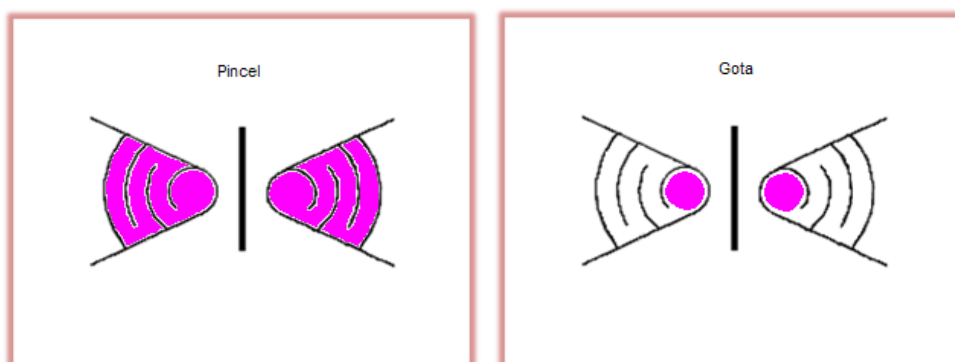
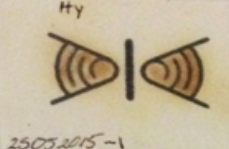

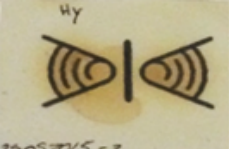


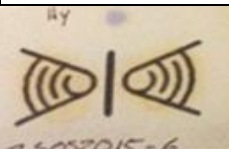

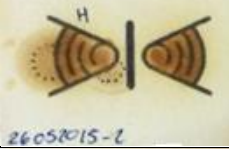
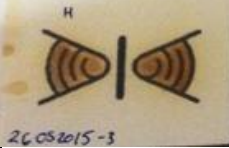


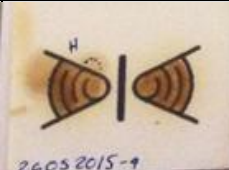

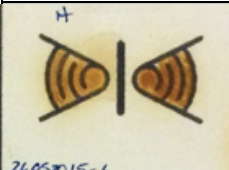

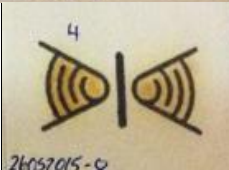
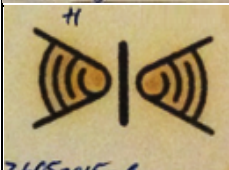

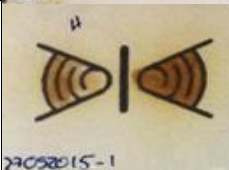
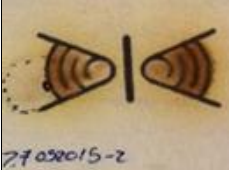
Figura A.III.2: Ejemplo de aplicación de la sustancia reactiva a) con pincel, sin AuNP y b) con micropipeta, con AuNP.

Existen dos tipos de sensores, aquellos en los que la sustancia reactiva se agregó con un pincel (sin AuNP) y aquellos a los que se les agregó con una punta de micropipeta (con AuNP) (Figura A.III.2).


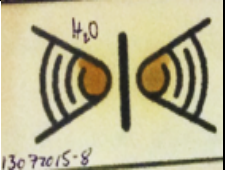
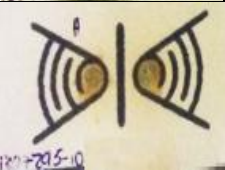







I. Colorimetría y fluorescencia




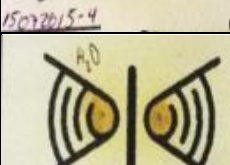




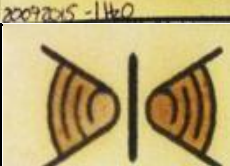
1. S-FH




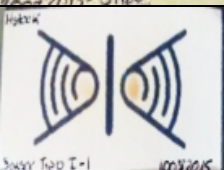

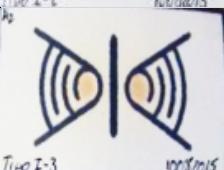
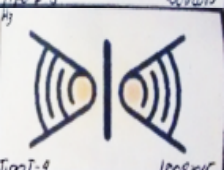
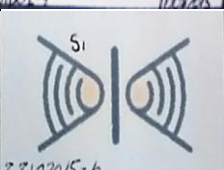
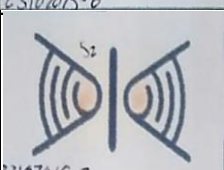
Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
25/05/2015		S-FH	H	1 h	Se puede observar que el único sensor que presenta un cambio en cuanto a la coloración es el que fue modificado con H ₂ SO ₄ .
			CV → H		
			AAc → H		
			AAc + CV → H		
			H ₂ SO ₄ → H		
			H ₂ SO ₄ + CV → H		
			H ₂ SO ₄ → H		
26/05/2015		S-FH (24 hr)	H ₂ SO ₄ (500 μL) → H	1 h	Se puede observar que aunque se agregó H ₂ SO ₄ no se aprecia una diferencia significativa con el lado control.
			H ₂ SO ₄ (1 mL) → H		

Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
26/05/2015		S-FH (24 h)	H ₂ SO ₄ (1.5 mL) → H	1 h	Se puede observar que aunque se agregó H ₂ SO ₄ no se aprecia una diferencia significativa con el lado control.
			H ₂ SO ₄ (2 mL) → H		
			H ₂ SO ₄ (2.5 mL) → H		
			H ₂ SO ₄ (3 mL) → H		
			H ₂ SO ₄ (4 mL) → H		
			H ₂ SO ₄ (5 mL) → H		
			H ₂ SO ₄ (6 mL) → H		
27/05/2015		S-FH	Alcohol (250 µL) → H	1 h	
			Alcohol (500 µL) → H		

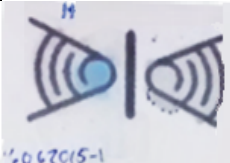
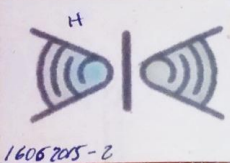
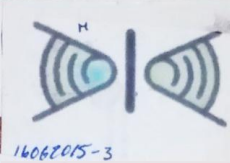
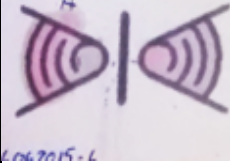
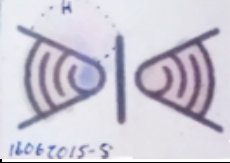
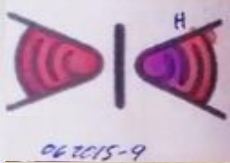
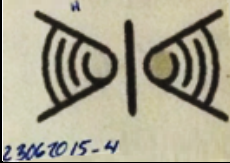

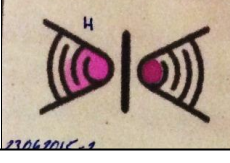
Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
27/05/2015		S-FH	Alcohol (750 μ L) \rightarrow H	1 h	En este día se preparó S-FH fresca y por los resultados observados podemos determinar que el uso de solución "fresca" es necesaria para maximizar la reacción.
			Alcohol (1 mL) \rightarrow H		
			Alcohol (1.5 mL) \rightarrow H		
			Alcohol (2 mL) \rightarrow H		
			Alcohol (20 mL) \rightarrow H		
13/07/2015		S-FH1	$H_2SO_4 \rightarrow H$	1 h	Aunque con anterioridad el uso de H_2SO_4 había provocado una decoloración en el sensor, en este caso no sucedió. Esto probablemente porque la base fue modificada.
			$H_2SO_4 \rightarrow H_2O$		
			$H_2SO_4 + 250 \mu L$ de colorante vegetal (rojo) $\rightarrow H$		
			$H_2SO_4 + 250 \mu L$ de colorante vegetal (rojo) $\rightarrow H_2O$		

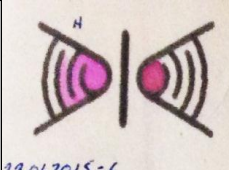
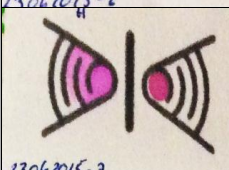
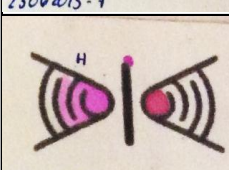
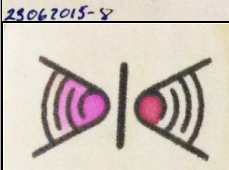
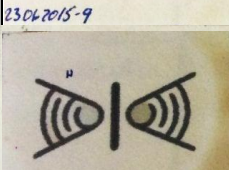
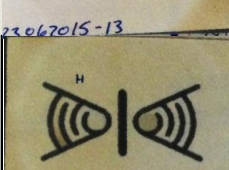
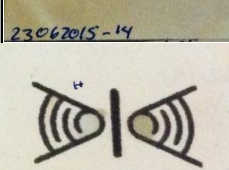
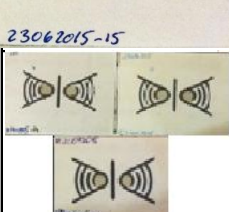
Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
13/07/2015		S-FH1	H ₂ SO ₄ +Azul primario (pintura al óleo)→ H	1 h	En ninguno de los casos fue posible observar una diferencia entre los sensores a los que se les agregó la solución Stock de Hidrocortisol y a los que se agregó H ₂ O Mili-Q. Ambas tinturas se mantienen estables sin importar el pH de la solución reactiva. En el caso del Azul primario fue necesario verificar cuál era la mejor forma de diluirlo. Se intentó directamente en la solución, después en la sustancia (conformación aceitosa) y finalmente se probó diluirlo previamente en aceite de olivo. Siendo este último el que generaba una mejor dilución.
			H ₂ SO ₄ +Azul primario (pintura al óleo)→ H ₂ O		
			H ₂ SO ₄ +Azul primario (pintura al óleo) disuelto en aceite de FH→H		
			H ₂ SO ₄ +Azul primario (pintura al óleo) disuelto en aceite de FH→ H ₂ O		
			H ₂ SO ₄ +Azul primario (pintura al óleo) disuelto en aceite de olivo → H		
			H ₂ SO ₄ +Azul primario (pintura al óleo) disuelto en aceite de olivo→ H ₂ O		
					
					
15/07/2015		S-FH2	AuNP → H	5 dias	Podemos ver que en ninguno de los sensores hay un cambio de coloración o diferencia entre el sensor con la solución Stock de Hidrocortisol y el sensor con H ₂ O.
			AuNP → H ₂ O		

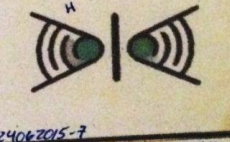
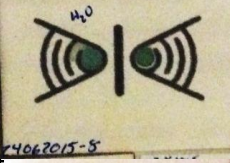


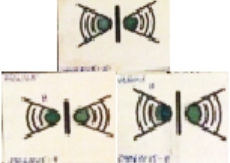



Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado		
15/07/2015		S-FH2	AuNP+1 250 μ L de colorante vegetal (rojo) \rightarrow H	5 días	Por lo que se puede concluir que en ninguno de los casos el sensor reacciona en seco. Es necesario que la solución que se agrega al sensor sea fresca y aunque el sensor se encuentre seco superficialmente este fresco cuando se agrega la solución reactiva.		
			AuNP +250 μ L de colorante vegetal (rojo) \rightarrow H ₂ O				
			AuNP+Azul primario (pintura al óleo) disuelto en aceite de olivo \rightarrow H				
			AuNP+Azul primario (pintura al óleo) disuelto en aceite de olivo \rightarrow H ₂ O				
			AuNP \rightarrow H			1 h	Se observó una decoloración leve en el sensor (con respecto al lado control) al que se le agregó la solución de Hidrocortisol. El sensor al que se agregó H ₂ O no mostro cambio alguno.
			AuNP \rightarrow H ₂ O				
20/07/2015		S-FH	1 ml H ₂ SO ₄ + AuNP \rightarrow H	1h	Anteriormente la modificación con H ₂ SO ₄ fue de las que mejor resultados género, pero al compararla con la alteración que el H ₂ O le provoca al sensor con dicha modificación aunque la pérdida de color fue poca es suficiente para descartar este método.		
			1 ml H ₂ SO ₄ + AuNP \rightarrow H ₂ O				
			Alcohol (250 μ L) + AuNP \rightarrow H				


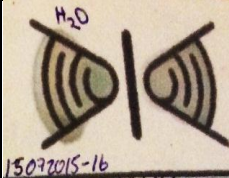
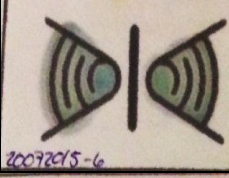
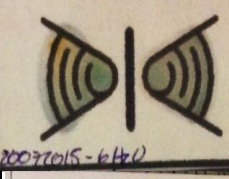
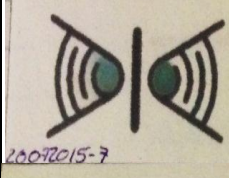

Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
20/07/2015		S-FH	Alcohol (250 μ L) + AuNP \rightarrow H ₂ O	1 h	Por otra parte la modificación con alcohol genera una despigmentación mucho mayor además de que al hacer la prueba con el H ₂ O no existe reacción alguna. Con esto podemos concluir que la modificación con 1 mL de alcohol es la mejor opción para detectar Cortisol o Hidrocortisol por colorimetría.
			Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow H ₂ O		
			Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow H ₂ O		
10/08/2015		S-FH	Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow H	1 h	En estos casos se puede observar que la tonalidad del lado control no es tan oscura. Posiblemente por la cantidad de sustancia añadida al sensor.
			Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow H ₂		
			Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow H ₃		
			Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow H ₄		
23/10/2015		S-FH	Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow S1	1h	En este caso no es tan fácil observar la decoloración del lado izquierdo, después de agregada la saliva, pero bajo la luz UV este cambio es mucho mayor.
			Alcohol (1 mL) + AuNP \rightarrow S2		

2. S-DA










Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
16/06/2015		S-DA	$\rightarrow H$	1 h	Los resultados con el uso de la solución S-DA varían dependiendo del tiempo, es decir entre 1 y 2 horas de agregada la solución tienen un color y 24 h después cambia completamente la coloración.
			$H_2O (1:1) \rightarrow H$		
			$CV \rightarrow H$		
			$NM \rightarrow H$		
			$Rh-b * 10^{-3} M \rightarrow H$		
			$Rh-b * 10^{-2} M \rightarrow H$		
23/06/2015		S-DA	$AuNP \rightarrow H$	1 h	Se puede ver claramente que la S-DA reacciona diferente con la solución Stock de Hidrocortisol y con la saliva del sujeto 1.
			$AuNP \rightarrow S$		
			$AuNP + Rh-b * 10^{-2} M \rightarrow H$		



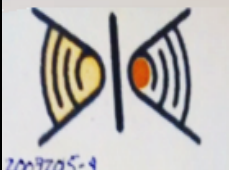


Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado	
23/06/2015	 23062015-6	S-DA	AuNP + Rh-b*10 ⁻² M →H1	1 h	Sin importar la concentración de la solución de Hidrocortisol añadida al sensor todos los sensores que tenían Rh-b reaccionaron igual, por lo que podemos concluir que la Rh-b es la que está reaccionando con el pH de la solución de Hidro-cortisol.	
	 23062015-7		AuNP + Rh-b*10 ⁻² M →H2			
	 23062015-8		AuNP + Rh-b*10 ⁻² M →H3			
	 23062015-9		AuNP + Rh-b*10 ⁻² M →H4			
	 23062015-13		AuNP →H2			Se observa que en los sensores que no contienen Rh-b existe un blanqueamiento del color generado por la S-DA (el color se puede apreciar después de 24 h) aparentemente relacionado con la concentración de Hidrocortisol.
	 23062015-14		AuNP →H3			
	 23062015-15		AuNP →H4			
			S-DA			

Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
24/06/2015		S-DA	AuNP + 60 mg DA → H	1 h	En los sensores que no contienen colorante externo podemos observar que la tonalidad verde generada por la S-DA (24 h después) es más fuerte. Pero sin importar esto no existe un cambio aparente al ser expuesto a la solución de Hidrocortisol.
			AuNP + 60 mg DA → H ₂ O		
			AuNP + 60 mg DA + Rh-b*10 ⁻³ M → H		
			AuNP + 60 mg DA + Rh-b*10 ⁻³ M → H ₂ O		
			AuNP + 60 mg DA → H	24 h 5 días	No se observa cambio en la coloración de ninguno de los dos sensores.
29/06/2015		S-DA	CV + Au NP → H	1h	El color proporcionado por el CV se pierde casi en su totalidad después de haber secado disminuyendo un poco la intensidad del verde proporcionado por la S-DA, pero no se puede observar una diferencia representativa entre el sensor con agua y el sensor con la soluciones de Hidrocortisol.
			CV + AuNP → H ₂ O		
			CV + AuNP → H ₂		

Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
15/07/2015		S-DA	AuNP→H	1 h	En ambos sensores se observó un cambio de color tras la aplicación de las dos soluciones (H stock y H ₂ O)
			AuNP→H ₂ O		
20/07/2015		S-DA	disolución 1:1 + AuNP (pincel) → H	1 h	En ambos sensores se observó un cambio de color tras la aplicación de las dos soluciones (H stock y H ₂ O).
			disolución 1:1 + AuNP (pincel) → H ₂ O		
			disolución 1:1 + AuNP (gota) → H		Finalmente podemos concluir que la S-DA reacciona con el pH de la solución por lo que no resulta un reactivo adecuado para la detección de Cortisol o Hidrocortisol.
			disolución 1:1 + AuNP (gota) → H ₂ O		










3. Combinaciones











Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado		
29/06/2015		S-FH:S-DA	1:1+ AuNP →H	1 h	En ambos tipos de sensores (con y sin CV) podemos observar que esta solución no reacciona al agregar H ₂ O. El cambio más aparente es en el sensor que tiene CV y H stock, cambiando de marrón a amarillo suave.		
			1:1+ AuNP →H4				
			1:1+ AuNP →H ₂ O				
			1:1+ AuNP+ CV →H				
			1:1+ AuNP + CV →H4				
			1:1+ AuNP + CV →H ₂ O				
			1:1+ AuNP →H			24 h	Existe una dilución de la solución pero sin generar un cambio en coloración o fluorescencia. No se ve ningún tipo de diferencia entre estos sensores y los tratados con H ₂ O.
			1:1+ AuNP+ CV →H				
15/07/2015		S-FH2:S-DA	1:1 → H	1 h			

Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
15/07/2015		S-FH2:S-DA	1:1 → H ₂ O	1 h	No se observa ninguna diferencia entre el sensor al que se le aplicó la solución de Hidrocortisol y al que se le aplico H ₂ O.
			1:1 → H	24 h	En este caso si bien aumento la tonalidad de la coloración (con respecto al control) no se ve un cambio representativo.
20/07/2015		S-FH:S-DA	1:1 + AuNP → H	1 h	Esta modificación ya se había realizado, por ello se deseaba verificar su repetitividad. No se obtuvieron los mismos resultados, en esta ocasión, la solución se corrió por el sensor. Se puede pensar que esto se debió al tiempo de secado dedicado a cada día.
			1:1 + AuNP → H ₂ O		
			1:1 + AuNP → H	24 h	No se corrió el material y presentó una ligera despigmentación, por lo que se puede pensar que esta funcionando el reactivo aun seco.

4. S-Anticuerpos

Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
	colorante vegetal (verde o rojo) + ap	(verde) → SA+H	30 min	Se observa que dependiendo del colorante es la respuesta, en caso del colorante verde, la respuesta es colorimétrica, y con el colorante rojo, la respuesta es fluorescente (bajo luz UV).
		(rojo) → SA+H		
		(verde) → AuNP + SA + H		
		(rojo) → AuNP + SA + H	24h	Una vez añadidas las NP podemos que la reacción se magnifica en ambos tipos de sensores.
		(rojo) → AuNP + SA + H		
		(rojo) → AuNP + SA + H		
	colorante vegetal (verde o rojo) + aAuNP + IpAuNP	(verde) → SA + HC	30 min	Se esperó 24 h para agregar la SH para verificar la estabilidad de la solución, la cual reacciona igual que un día anterior.
		(rojo) → SA + H		
		(rojo) → SH (sujeto 1)		

Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
27/10/2015		colorante vegetal (verde o rojo) + aAuNP + IpAuNP	→SH (sujeto 1)	24h	Se observó que la reacción del sensor fue mucho menos brillante, se pensó que se debía al tiempo, se realizó otra medición con la solución de aIPAuNP fresca y el resultado fue el mismo, por lo que se determinó que su funcionalidad estaba íntegra.
			sol aIPAuNP fresca →SH (sujeto 1)	30 min	
28/10/2015		colorante vegetal (rojo) + aAuNP + IpAuNP	→SH (sujeto 2)	30 min	Se aprecia que la luminocidad de la fluorescencia de cada sujeto es diferente.
			→SH (sujeto 3)		
			→SH (sujeto 4)		
			→SH (sujeto 5)		
			→SH (sujeto 6)		
28/10/2015		colorante vegetal (rojo) + aAuNP + IpAuNP	→SA + H	30 min	Con este experimento se puede apreciar que la solución reacciona proporcionalmente a la concentración.
			→SA + H1		

Fecha	Sensor	Composición	Modificación	Tiempo	Resultado
28/10/2015		colorante vegetal (rojo) + aAuNP + IpAuNP	→SA + H3	2 min	También se deseó determinar si el tiempo que se espera para agregar la solución influye en la respuesta, en este caso los sensores que reaccionan mejor son a los que se esperó 20h para agregar la solución de SA+H
			→SA + H4		
			→SA + H	30 min	
			→SA + H1		
			→SA + H3	20h	
			→SA + H4		
			→SA + H	24h	
			→SA + H1		
	→SA + H3				
	→SA + H4				