



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS

**DISEÑO *TOP-DOWN* Y PRIMEROS PASOS DE FABRICACION
DE UN CHIP MICROFLUIDICO COMO BIOSENSOR PARA EL
DIAGNÓSTICO DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

Tesis que presenta

Juan Arturo López Ponce

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Aplicadas

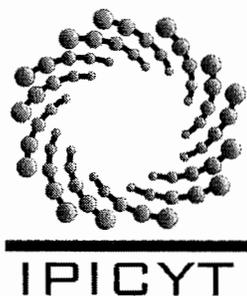
en la opción de

Nanociencias y Materiales

Director de la Tesis:

Dr. José Luis Rodríguez López

San Luis Potosí, S.L.P., mes de año



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis *“Diseño Top-Down y primeros pasos de fabricación de un chip microflúidico como biosensor para el diagnóstico de virus del papiloma humano. Desarrollo del mecanismo de manipulación analito”* presentada para obtener el Grado de Maestro en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Juan Arturo López Ponce** y aprobada el seis de diciembre del dos mil dieciséis por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. José Luis Rodríguez López
Director de la tesis

Dr. José Luis Morán López
Miembro del Comité Tutorial

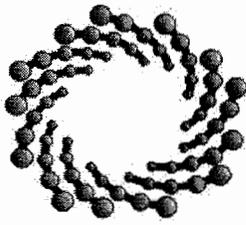
Dr. Román López Sandoval
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Síntesis y Propiedades de Nanopartículas de la División de Materiales Avanzados para la Tecnología Moderna del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. José Luis Rodríguez López.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (reg. 570008/332195) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 020 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de diciembre del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. José Luis Morán López

Presidente

IPICYT

Dr. Román López Sandoval

Secretario

IPICYT

Dr. José Luis Rodríguez López

Sinodal

IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

sustentó el C.

Juan Arturo López Ponce

sobre la Tesis intitulada:

Diseño Top-Down y primeros pasos de fabricación de un chip microfluídico como biosensor para el diagnóstico de virus del papiloma humano: Desarrollo del mecanismo de manipulación analito

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. José Luis Rodríguez López

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes de diciembre de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Agradecimientos

Durante el periodo en que trabajé en esta tesis recibí bastante ayuda de varias personas quienes han contribuido en el desarrollo de la misma. Doy gracias por permitir desarrollar mi conocimiento en este tema al Dr. José Luis Rodríguez López y a los miembros del grupo: Dr. José Luis Sánchez García (DMAv), Dr. Rubén Hipolito López Revilla (DBM), Dra. Lucía Orellana Escobedo (DBM), Biol. Mireya Guadalupe Sánchez Garza (DBM), LAQB. Felipe de Jesús Herrera Ponce (DMAv), así también por las facilidades prestadas en sus respectivos laboratorios a Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios (DMAv), Dr. Horacio Flores Zúñiga (DMAv), Dr. Luis Gerardo Arriaga Hurtado (CIDETEQ), Dr. Francisco Mherande Cuevas Muñoz (CIDETEQ) y los técnicos Mariana Gutiérrez Sánchez (DMAv) e Ing. Raúl Antonio Jiménez González. Agradezco a los profesores que me enseñaron tantas cosas y que han contribuido a mi desarrollo profesional, en especial al Dr. Florentino López Urias y al Dr. Emilio Muñoz.

Debo dar agradecimientos especiales debido a su invaluable apoyo y tiempo a varias personas que me asistieron durante mi última estancia en la División de Ciencias e Ingenierías de la Universidad de Guanajuato, etapa crítica en la realización del presente trabajo. Muchas gracias al Dr. José Jorge Delgado García y al Ing. Jabel Jiménez Ruvalcaba por sus aportaciones, así mismo al Dr. Alejandro Martínez Bórquez, al Dr. Arturo Vega González, al Dr. José Socorro García Díaz y a la M. en C. Angélica Hernández Rayas, por las facilidades prestadas en el acceso a equipos.

También deseo agradecer por encima de todo, a la gente más importante en mi vida, aquellos que han estado apoyándome por el puro gusto de hacerlo, a esas personas que tienen un lugar particular en mi mente: a Karen, a mi familia y a mis pocos amigos que están ahí cuando hacen falta sin más ni más. Sin el apoyo y motivación que me brindan, este trabajo no podría haber sido realizado.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	viii
Abstract	ix
Motivación y Antecedentes	1
Motivación	1
Antecedentes	3
Objetivos y Métodos	4
Objetivos del Proyecto	4
Métodos Propuestos	4
Algunos Conceptos Biológicos	7
Análisis de DNA	7
Amplificación de DNA	8
Amplificación de DNA por PCR	9
Técnicas Isotérmicas	9
Amplificación por Círculo Rodante y Amplificación Círculo a Círculo	12
Detección de Patógenos	13
Biosensores	14
Microflujos en Manipulación de Analitos	15
Dispositivos DMF	16
Microsistemas de Análisis Totales	21
Amplificación de DNA y μ TAS en Dispositivos POC	22
Proceso Diseñado	23
Enfoque del diseño	25
Características del proceso	26
Trabajo Experimental	29
Sustrato	30
Recubrimiento	30
Solución Electro-conductora	31
Prototipo	31
Refinamiento del diseño	35
Conclusiones y Perspectivas	40
Conclusiones	40
Perspectivas	42
Acrónimos	43
Referencias	46

Resumen

Este proyecto de enfoque multidisciplinario e interinstitucional, atiende el problema de la detección e identificación de los tipos predominantes de VPH de alto riesgo, ambas fases necesarias en el diagnóstico de la infección viral y para complementar el tamizaje de las mujeres en riesgo de desarrollar CaCu, por lo que el presente proyecto resulta de relevancia tanto social como científica.

En este proyecto de tesis se presenta la integración de los datos recabados durante el proceso de experimentación. Se presentan algunas técnicas empleadas en el desarrollo del dispositivo DMF planteado para lograr la automatización del proceso de sensado de patógenos, se habla de las complicaciones técnicas encontradas durante la fabricación del dispositivo y se menciona el plan de desarrollo del mismo para continuar con su construcción y eventual implementación.

DISEÑO *TOP-DOWN* Y PRIMEROS PASOS DE FABRICACION DE UN CHIP MICROFLUIDICO COMO BIOSENSOR PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

PALABRAS CLAVE. Biosensor, Microanálisis totales, Microfluídica

Abstract

This project of multidisciplinary and inter-institutional focus deals with the problem of detection and identification of predominant HPV viruses kinds, both, necessary phases on diagnosis of viral infections and discrimination of women at risk to develop cervical cancer, due that, this projet results of scientific and social importance.

TOP-DOWN DESIGN AND FIRST STEPS ON MANUFACTURING OF A MICROFLUIDIC CHIP AS A BIOSENSOR FOR HVP DIAGNOSIS

KEY WORDS. MICROFLUIDICS, BIOSENSOR, BIOLOGICAL ANALYSIS

Motivación y Antecedentes

Motivación

A nivel mundial el cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte en las mujeres, afectando principalmente a aquellas en el rango de los 30 a los 50 años de edad. Se estima que el cáncer cervicouterino afecta anualmente a 500,000 mujeres a nivel mundial, muriendo el 40% de éstas. Son las naciones del tercer mundo las más afectadas, ya que acaparan 80% de los casos fatales [3]. El cáncer es una enfermedad metastática caracterizada por el crecimiento desmedido de células con taras, su detección temprana es crucial para mejorar los mecanismos de su pronóstico y tratamiento [4]. En particular el cáncer cervicouterino es asociado con el HPV¹ como su principal causa, por lo que es de vital importancia la detección de este patógeno también.

El cultivo celular seguido de la diferenciación fenotípica² hoy por hoy es el método base de la identificación microbiana, ésto a pesar de la existencia de técnicas más modernas que han apoyado el diagnóstico genético y de enfermedades infecciosas. En el cultivo celular es necesario llevar a cabo un seguimiento del mismo, para lo cual la técnica más utilizada es la PCR que posee algunos inconvenientes en su aplicación a diagnósticos POC, es decir, herramientas portátiles que sean capaces de determinar las condiciones del paciente en el sitio mismo donde éste se encuentre. Las técnicas de amplificación isotérmica ampliamente usadas en diagnóstico molecular permiten evitar las limitaciones del PCR, ya que éstas logran la desnaturalización del DNA (separación de las hebras) usando enzimas en vez de los ciclos de calentamiento y enfriamiento propios del PCR.

La complicación de este método de identificación microbiana, es el retraso implicado por el cultivo celular, que toma periodos mínimos de entre 1 y 5 días, tiempo vital en el proceso de diagnóstico. La falta del diagnóstico en numerosas ocasiones deriva en la muerte de la paciente [5], por lo que sería adecuado contar con dispositivos de diagnóstico POC. Estos dispositivos no solo deben poseer las características de los métodos de detección convencionales, sino que deben también ser fáciles de usar e interpretar, estables sobre múltiples condiciones de

-
- 1 El HPV se subclasifica en dos tipos, bajo riesgo y alto riesgo. En este último se engloban los tipos 16 y 18, responsables de la mayoría de los cánceres causados por HPV.
 - 2 El fenotipo (del griego *phainein* que significa "aparición" y *typos* que significa "tipo") es el conjunto de características observables de un organismo, abarcando desde las características físicas y químicas, incluido su comportamiento, así como sus productos.

operación (humedad, temperatura, etc), portátiles y de preferencia desechables [6].

La meta planteada en la detección de enfermedades es el desarrollo de técnicas de alta sensibilidad a biomarcadores específicos [7]. Las ventajas encontradas en las técnicas de amplificación isotérmica (rapidez, potencia de amplificación, diagnósticos con alta especificidad y sensibilidad, posibilidad de miniaturización), las vuelven propicias para ser la base de la siguiente generación de dispositivos POC, facilitando el cuidado de la salud de forma personalizada y accesible [5]. No obstante, la tendencia en las técnicas de detección de secuencias genéticas en el DNA, apunta a los protocolos libres de amplificación, los cuales tienen la ventaja de ser protocolos simplificados y con un menor consumo de reactivos [5].

El nivel microscópico y la relativa sencillez de formar arreglos de grandes cantidades de microsensores, ofrecen oportunidades de desarrollo de herramientas de diagnóstico clínico [7]. Los dispositivos microfluídicos en sus dimensiones características permiten una excelente manipulación celular en muestras biológicas, lo cual los convierte en una herramienta a nivel diagnóstico y terapéutico. Esta característica permite el uso de biomarcadores³ mecánicos, los cuales en conjunto con la microfluídica se cree que son la clave para alcanzar el objetivo de desarrollar dispositivos más eficientes, más baratos y más rápidos en el tratamiento de enfermedades [8].

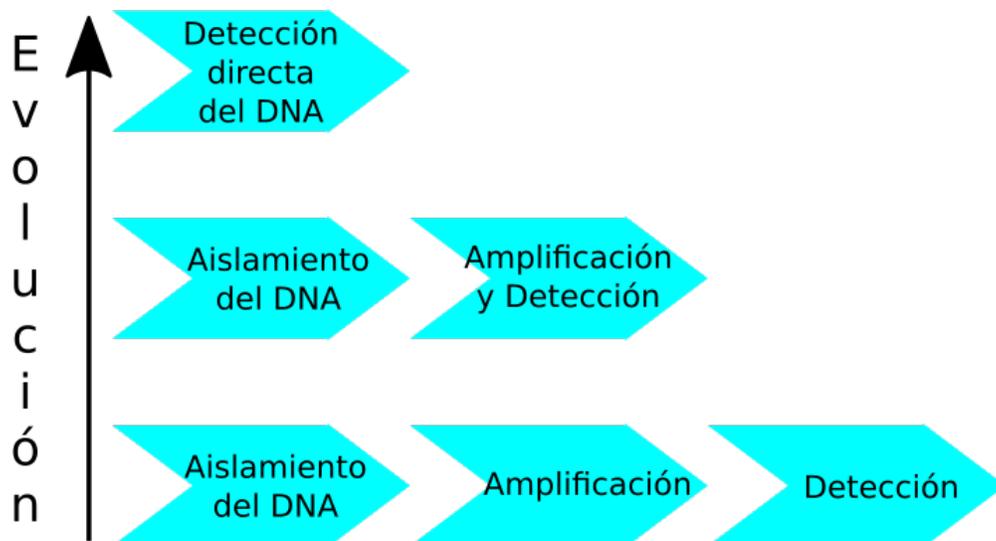


Figura 1: Evolución de las estrategias de identificación de secuencias genéticas.

3 Los biomarcadores son en sentido amplio la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones cuantificables en un sistema biológico o muestra inducidas por el mismo.

La necesidad de los tratamientos de diagnóstico POC ha ayudado a dar paso al rediseño de los dispositivos LOC que típicamente necesitan aditamentos especiales para el control del flujo interno, lo cual de otra forma resultaría difícil e impráctico en el diagnóstico POC [9].

Antecedentes

Las aplicaciones clínicas con enfoque en diagnóstico molecular basado en detección de ácidos nucleicos, son un gran propulsor en el desarrollo de estos métodos [10,11]. Los avances alcanzados por la nanotecnología están logrando el desarrollo de dispositivos para detección de ácidos nucleicos que puedan ser accesibles y descentralizados. Algunas innovaciones en componentes de los procesos clave para detección de ácidos nucleicos como: 1) preparación de la muestra, 2) amplificación del blanco, y 3) modalidades de transducción, han sido revisados por Hartman [11].

La detección de ácidos nucleicos en dispositivos POC está en sus primeras etapas. Los retos a corto plazo en el desarrollo de dispositivos POC que deben ser considerados son: (1) la adaptabilidad en diferentes tipos de muestras, (2) el desarrollo de métodos de amplificación de blancos libres de enzimas usando nanoestructuras basadas en materiales avanzados, (3) el desarrollo de telemedicina mediante la implementación de resultados digitalizados para interfaces inalámbricas con dispositivos de telecomunicaciones, y (4) el cumplimiento del criterio ASSURED recomendado por la WHO para detección en dispositivos POC, mediante integración de preparación de muestras, amplificación de blancos, e interpretación de resultados en un mismo dispositivo.

La integración de las diferentes disciplinas necesarias para el desarrollo de los dispositivos POC, es clave para vencer los obstáculos que retardan su fabricación masiva, así como la implementación de la nanotecnología [5,10,11].

Las expectativas en el desarrollo de sistemas de análisis completos de ácidos nucleicos son muy altas, de hecho, es posible que varios dispositivos basados en RNA estén disponibles en breve. Experiencia y tecnología adicionales deben ser desarrolladas antes que los sistemas μ TAS sean comercialmente viables.

Un dispositivo DMF ha sido presentado por Kuhnemund [12] para la amplificación de ácidos nucleicos basado en el uso de sondas *padlock*. El procedimiento consiste de sondas *padlock* circularizadas en una reacción de ligación con especificidad a una región blanco y amplificada a través de dos rondas de RCA, incluyendo un paso intermedio de digestión, con enzimas de restricción.

Otro ejemplo del éxito en la integración de un dispositivo de diagnóstico, fue

reportado por Mahmoudian [10], cuya plataforma estable de C2CA con dsDNA logró la detección de productos genómicos de DNA de *V. Cholerae*, específicamente se desarrolló una plataforma integrada de RCA y C2CA, con sondas *padlock* y su subsecuente detección en un chip electroforético. La RCA y la C2CA fueron exitosamente llevadas a cabo a una temperatura estable de 37°C en el pozo de la muestra del microchip, y sus respectivos productos fueron detectados en el mismo canal, prellenado con una matriz de separación polimérica y tintes fluorescentes.

Objetivos y Métodos

Objetivos del Proyecto

El objetivo general de este estudio es el siguiente:

Diseñar un chip microfluídico como biosensor para el diagnóstico del virus de papiloma humano de alto riesgo y dar los primeros pasos en su construcción.

En tanto que los objetivos particulares son:

1. Realizar el diseño de un dispositivo microfluídico que servirá como un microreactor en el proceso de detección del HPV.
2. Realizar la optimización del mismo.
3. Controlar la técnica EWOD que se pretende implementar para transportar la muestra a través de los distintos pasos del proceso del análisis.
4. Presentar las técnicas de fabricación que permitirán el desarrollo del dispositivo.

Métodos Propuestos

En pro de la sencillez de fabricación y reproducibilidad experimental es apropiado implementar técnicas que impliquen pocos pasos en el proceso que conlleven para mejorar el control del dispositivo en general.

Los niveles de desarrollo implicados en la creación de este dispositivo y que son reconocibles de forma inmediata son los tres que se muestran en la Figura 2 . Por una parte se tiene el problema del análisis biológico que se pretende realizar mediante un escaleamiento del mismo, paralelamente se debe buscar una solución ingenieril para adaptar-controlar el proceso biológico mediante un dispositivo automatizado y finalmente, es necesario un mecanismo que interprete el resultado obtenido del análisis y se lo indique al operador del dispositivo. Cada uno de estos niveles implica subniveles propios, cada uno con sus peculiaridades a tratar.

La cantidad de métodos y técnicas empleados en dispositivos de este tipo es muy basta. En particular este proyecto pretende realizar un diseño del tipo *top-down* para el dispositivo, dado que las metas y necesidades que se buscan en el

dispositivo son muy específicas.

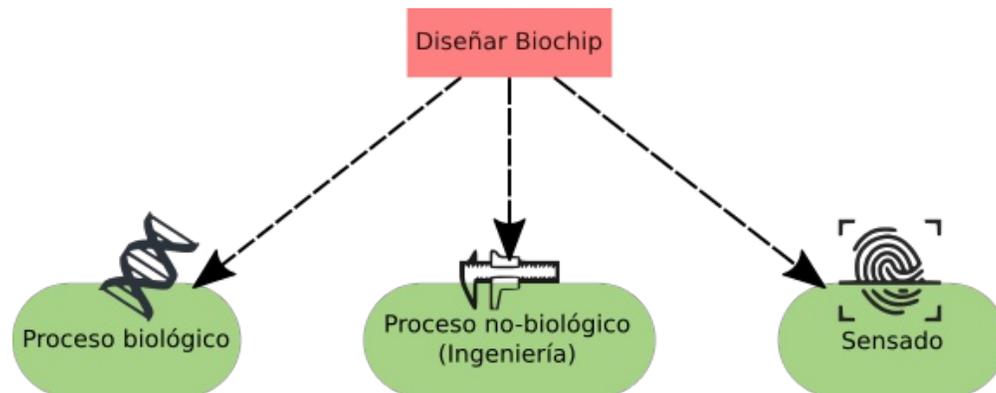


Figura 2: Niveles de desarrollo en la fabricación del dispositivo biosensor autónomo con escalamiento del análisis.

El transporte de la muestra al interior del dispositivo se pretende que sea mediante EWOD ya que esta variante de la técnica microfluídica permite una reducción de componentes en el dispositivo con lo cual se espera un mejor control sobre el proceso.

Se pretende implementar la técnica RCA para la amplificación del DNA de la muestra, debido a que esta técnica no implica variaciones sistemáticas de temperatura, por lo cual contribuirá a un mejor control del proceso.

Algunos Conceptos Biológicos

Análisis de DNA

Como Watson y Creek [13] señalaron años atrás, el DNA puede ser visto como un medio de almacenamiento para el código genético, *i.e.*, dentro del DNA está localizada toda la información esencial de los organismos vivientes. Los bloques fundamentales del DNA son moléculas llamadas nucleótidos y consisten de una "base" unida a un eslabón "azúcar-fosfato", tales nucleótidos están unidas covalentemente por la formación de un enlace de fosfodiéster⁴ entre los grupos fosfatos unidos a la azúcar de un nucleótido y un grupo hidroxilo sobre el siguiente nucleótido. Hay 4 diferentes tipos de bases dentro de la composición del DNA: *adenina* (A), *tiamina* (T), *guanina* (G) y *citósina* (C). Las azúcares unidas mediante los grupos fosfato crean cadenas poliméricas compuestas de eslabones repetitivos azúcar-fosfato con una serie de bases sobresaliendo de ellas. Cada polímero crece por la adición de monómeros en los extremos de una cadena polimérica en una reacción de condensación; cada monómero en una cadena sencilla de DNA consiste de un nucleótido. La manera en que este hecho es entendido funcionalmente, es un lenguaje construido sobre 4 signos.

Dos cadenas de DNA están unidas mediante enlaces débiles de puentes de hidrógeno (los cuales son de muy baja intensidad comparados con las uniones azúcar-fosfato), obedeciendo la complementariedad descrita por la regla de Chargaff [13,14,15]. Tal regla declara que la cantidad de Adenina (A) es igual a la cantidad de Timina (T), y la cantidad de Guanina (G) es igual a la cantidad de Citósina (C), es decir, el número total de bases purinas es igual al número total de bases pirimidinas ($[A+G]=[C+T]$). Este hecho permite que dos hebras de DNA puedan ser separadas sin romper el eslabonamiento y que cada cadena pueda servir como una plantilla, siendo esta la manera en la cual la información genética es replicada, *i.e.*, la síntesis del DNA. De forma natural esta síntesis se realiza mediante la adición de un desoxirribonucleótido al extremo 3' de una cadena polinucleotídica. Es el apareamiento de bases entre el ribonucleótido que se añade y una hebra ya existente de DNA lo que condiciona que la nueva hebra tenga una secuencia de nucleótidos complementaria.

4 El enlace fosfodiéster es un enlace covalente que se produce entre un grupo fosfato (H_3PO_4) y un grupo hidroxilo (OH).

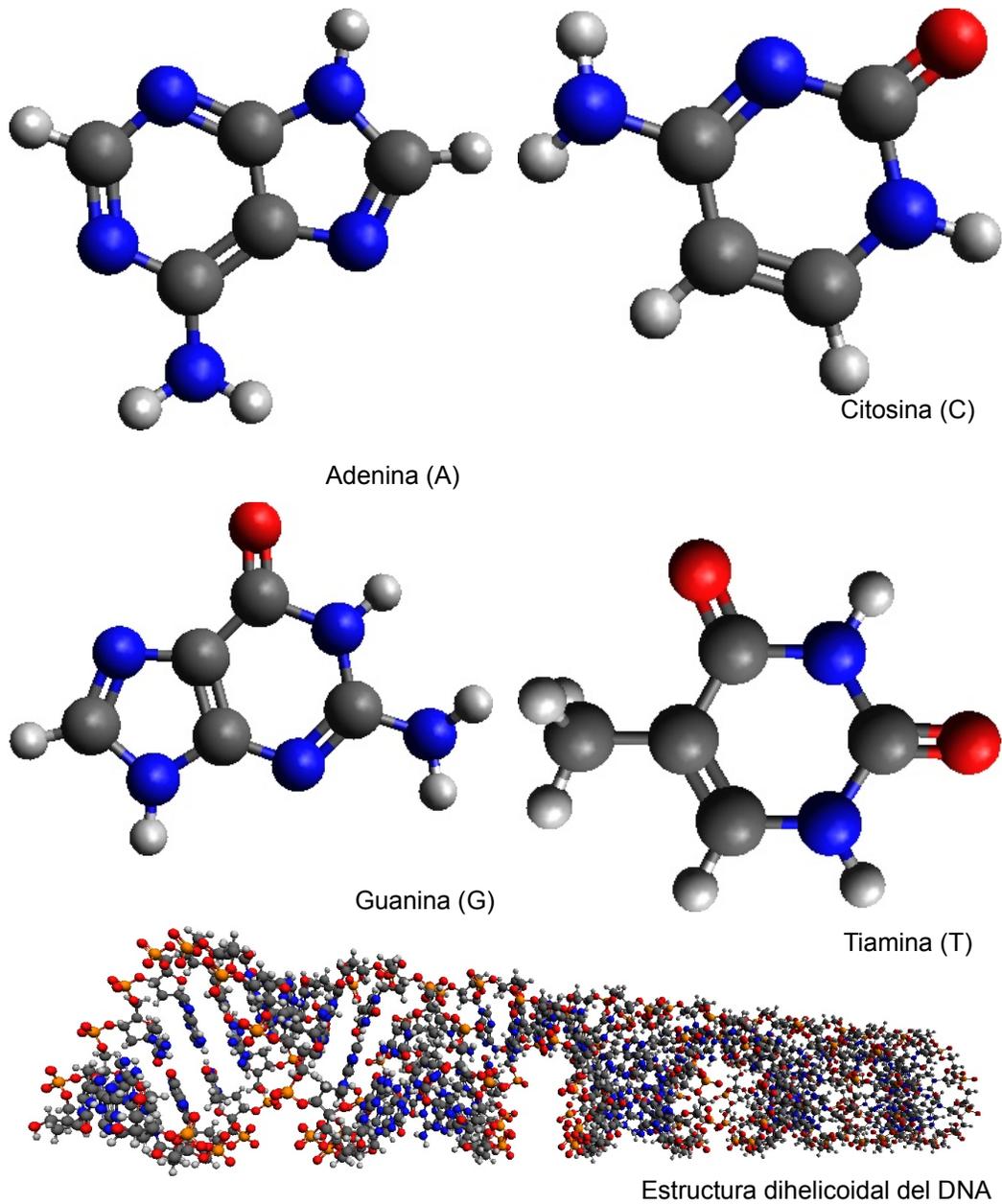


Figura 3: Estructuras básicas de la conformación del DNA.

Amplificación de DNA

Un proceso esencial en la biología moderna y la medicina es el proceso de sensado de ácidos nucleicos, ya que la detección de organismos patógenos (tales como bacterias, virus y genes cancerosos) impacta directamente en el tratamiento

del paciente [2]. Alguna forma de amplificación de ácidos nucleicos es requerida para obtener sensibilidades relevantes clínicamente para pequeñas muestras usadas en la detección de patógenos de dispositivos usados en POCT [5]. La amplificación es un medio de replicación acelerado de manera artificial con la finalidad de generar una gran cantidad de copias de un fragmento “plantilla” de DNA mediante hibridación⁵.

Amplificación de DNA por PCR

La PCR es un proceso relativamente directo de realizar, se aíslan las secuencias a ser amplificadas y se añaden los iniciadores específicos, DNA-polimerasa y una mezcla de precursores de los 4 desoxiribonucleótidos, se calienta la mezcla hasta los 94°C durante 5 minutos para desnaturalizar⁶, se reduce la temperatura para que los hebras separadas puedan ser complementadas con las bases nitrogenadas y complementar las secuencias de nucleótidos de la molécula de DNA, posteriormente se calienta a 72°C y se mantiene por un periodo de 5 minutos, tiempo suficiente para que se active la Taq-DNA-polimerasa. Acabando el periodo anterior se mantiene a 94°C durante 20 seg para desnaturalizar nuevamente. Este bucle se repite típicamente de 30 a 60 veces por proceso.

Su incorporación en la microfluídica puede llevar a tiempos más cortos en la reacción debido a su alta rapidez de transferencia calorífica. Actualmente se han desarrollado dispositivos multicanal con control independiente de temperatura para realizar análisis genéticos en paralelo mediante electroforesis [6].

Técnicas Isotérmicas

La reacción en cadena de la polimerasa PCR es una técnica de amplificación del DNA que permite la reproducción de fragmentos específicos de ácidos nucleicos. Esta técnica permite la replicación de millones de copias de DNA en cuestión de unas cuantas horas realizando ciclos de temperaturas en tres pasos. La técnica PCR ha revolucionado la genética y el diagnóstico molecular siendo empleada ampliamente en biomedicina y ciencias de la vida [16].

5 La hibridación es la construcción artificial de dsDNA a partir de dos fragmentos ssDNA (dos cadenas complementarias de DNA, RNA o de DNA y RNA) usando la complementariedad de bases. Es un método muy versátil que permite estudiar el grado de relación genética entre dos ácidos nucleicos. También permite la detección de fragmentos de DNA que son complementarios a fragmentos monocatenarios de secuencia conocida (sondas) [7].

6 La desnaturalización del DNA consiste en obtener ssDNA a partir de dsDNA

La PCR implica un proceso llevado a cabo mediante un aumento de temperatura, es por eso que no es apropiada en la detección de ácidos nucleicos de organismos vivos. Una vía para evadir este problema, son las técnicas de amplificación isotérmicas, que funcionan en un rango de temperaturas apropiadas (30-37 °C) para las células vivas [11]. El interés en las técnicas de amplificación isotérmicas es debido a que presente una mayor eficiencia energética comparada con el PCR, esto es debido a que no es necesario realizar ciclos de calentamiento, lo cual la convierte en una opción idónea para las aplicaciones POC [6].

Entre los métodos de amplificación isotérmica más importantes se encuentran SDA, RCA, HDA, LAMP, NASBA, ICANs, ensayo invasor, SMART, RPA, NESA, NENNA, reciclaje de blancos asistido por exonucleasa, pruebas "Y" (o de unión), HCR, estrategias de amplificación por desdoblamiento de DNA-zima y desoxirribosoma, reacciones catalíticas no covalentes de DNA, reacciones químicas dirigidas por plantillas que llevan a la amplificación de señales, y la detección vía autoensamble de pruebas de DNA que dan estructuras supramoleculares [6]. La Tabla 1 resume varios de los métodos de NAD operando en condiciones isotérmicas.

Una de las técnicas más comúnmente empleadas en la detección de patógenos es la PCR que permite la amplificación de genes *objetivo* a concentraciones detectables. Lamentablemente esta técnica implica un proceso de fusión, llevado a cabo mediante un aumento de temperatura, es por eso que la PCR no es apropiada en la detección de ácidos nucleicos de organismos vivos [2,5]. Una vía para evadir este problema, son las técnicas de amplificación isotérmicas, que funcionan en un rango de temperaturas apropiadas (30-37 °C) para las células vivas.

Platform	Advantage	Disadvantage	Components	Application
NASBA	10 ⁷ fold amplification in 2 h, commercial kits available	Not ideal for DNA analyte	2 primers, reverse transcriptase, RNase H, RNA polymerase, dNTP, rNTP	HIV-1 genomic RNA, ³⁴ hepatitis C virus RNA, ³⁵ human cytomegalovirus mRNA, ³⁶ 16S RNA in many bacterial species, ³⁷ and enterovirus genomic RNA, ³⁸ etc.
SDA	10 ⁵ fold amplification in 2 h	Less efficient on long targets, sample preparation is required	4 primers, DNA polymerase, REase HincII, dGTP, dCTP, dTTP, dATP-zS	Mycobacterium tuberculosis genomic DNA ⁸¹
LAMP	~10 ⁸ amplification in less than 1 h in the presence of interfering sequences	Complicated primer design, not suitable for short analytes	4 primers, DNA polymerase, dNTP	Viral pathogens, including dengue, ⁴⁷ Japanese encephalitis, ⁴⁸ Chikungunya, ⁴⁹ West Nile, ⁵⁰ <i>Severe acute respiratory syndrome</i> (SARS), ⁵¹ and highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1, ⁵² etc.
Invaader assay	Commercial kits available, ideal for SNP genotyping	Initial PCR required	2 or 3 probes, flap endonuclease	Factor V gene, ⁵⁴ genes responsible for Japanese hearing loss, ⁵⁶ human papillomavirus DNA, ⁵⁷ microRNA from HeLa and Hs578T cells, ⁵⁸ and herpes simplex virus types 1 and 2, ⁵⁹ etc.
RCA	ssDNA product makes this compatible with other isothermal amplification strategies	Ligation using RNA analyte could be problematic	1 probe, ligase, polymerase and dNTP	Cystic fibrosis gene, Epstein-Barr virus in, ⁷⁰ influenza A H1N1 and H3N2 mutations, ⁷¹ porcine circovirus type 2, ⁷² and <i>Listeria monocytogenes</i> , ⁷³ etc.
SMART	50 pM analyte detected in ~4 h, tolerates crude sample	Two-step process	2 probes, DNA polymerase, RNA polymerase, dNTP, rNTP	DNA and rRNA of <i>E. coli</i> , ⁷⁹ DNA and mRNA of marine cyanophage virus ⁸⁰
HDA	10 ⁶ fold amplification in 3 h, commercial kits available	Complicated buffer optimization	2 primers, helicase, SSB, DNA polymerase, dNTP	<i>Trypanosoma denticola</i> gene, ⁸¹ <i>Brugia malayi</i> gene ⁸¹
RPA	100 copies of analyte were detected in 1 h, selective	Stringent reaction condition	2 primers, recombinase, SSB, DNA polymerase, REase Nfo, dNTP	<i>Bacillus subtilis</i> genome ⁸⁴
NEANA	Endonucleases are robust enzymes and tolerate crude samples	Requirement of certain recognition sites in analytes	1 probe, nicking endonuclease, gold nanoparticle	N/A ^o
Exonuclease III aided target recycling approach	20 aM analyte can be detected	Not suitable for RNA	1 probe, exonuclease III	N/A ^o
Junction or Y probes	Works with crude samples	Needs to be combined with other amplification strategies for sensitive detection	Two probes, restriction enzyme	DNA version of hsa-miR-16
Reactivation of enzymatic activity	~10 fM of analyte detected	The formation of DNA protein conjugate is non-trivial and could make the probes expensive	Enzyme (protease, thrombin etc), DNA binding arm	N/A ^o
Concurrent use of polymerase, nicking endonuclease and exonuclease	miRNA detection with 10 fM detection limit at 37 °C and 1 aM at 4 °C. Crude cellular lysate can be used	Several enzymes (polymerase, nicking endonuclease and exonuclease) are needed	Bst polymerase, lambda exonuclease, nicking endonuclease, one MB probe, one primer	N/A ^o

Tabla 1: Parámetros esenciales que pueden ser modulados en la RCA (Tomada de [2]).

Amplificación por Círculo Rodante y Amplificación Círculo a Círculo

Un proceso de amplificación isotérmica de interés particular es la RCA. Este es un proceso enzimático isotérmico donde un pequeño iniciador⁷ de ácido nucleico (DNA o RNA) es amplificado para formar una sola y larga hebra de concatémeros que contiene decenas a centenares de repeticiones en cadena de segmentos de DNA o rna usando una plantilla circular de DNA y polimerasas especiales para DNA o RNA. El uso de la RCA se puede aplicar para métodos de diagnóstico sensibles a diferentes blancos para generar complejas nanoestructuras de DNA (tales como DNA origami, nanotubos, nanocintas y metamateriales basados en DNA [18].

En la RCA pueden ser utilizadas plantillas circulares por la DNA-polimerasa para hacer largas cadenas lineales que contengan múltiples copias de una secuencia dada, las cuales pueden ser detectado por varios métodos [19,2]. Además, la RCA puede ser acoplada con pruebas *padlock* en presencia de analitos específicos para dar sensibilidad a la detección de ácidos nucleicos; esta técnica ya han sido usadas en la detección de diversos genes relacionados a enfermedades [2]. Después de la circularización de la prueba *padlock*, un iniciador y polimerasa de DNA son usados para producir largas secuencias de DNA, el cual puede ser detectado por varios métodos [2].

La versatilidad en la ingeniería de RCA (Tabla 1), la vuelve una exitante herramienta para preparar bloques de construcción de DNA para construir nanoestructuras altamente ordenadas y nuevos materiales que pueden encontrar aplicaciones en la vida real en biosensado e imagenología y bioelectrónica. La RCA ha sido utilizado en la detección de μ RNA, tanto *in vitro* como *in situ* [2].

La C2CA es una poderosa técnica que provee de varias ventajas sobre otros métodos de amplificación, desafortunadamente la C2CA consiste de varios pasos manuales que hacen muy difícil su integración en plataformas microfluídicas.

7 Un iniciador es una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la síntesis del DNA. es requerida para la replicación del DNA debido a que las DNA-polimerasas -las enzimas que catalizan este proceso- pueden añadir nucleótidos a una cadena existente de DNA. La polimerasa comienza la replicación en el extremo 3' del iniciador y copia la cadena opuesta.

DetECCIÓN DE PATÓGENOS

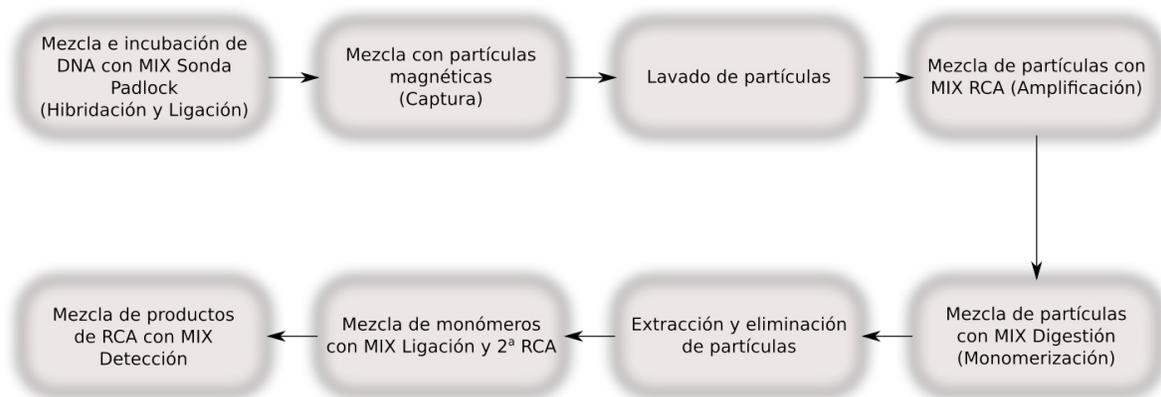


Figura 4: Proceso de análisis de muestras biológicas para detección de patógenos en pruebas de DNA.

Los métodos modernos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas deben gran parte de su desarrollo al descubrimiento de la estructura del DNA, el entendimiento de los mecanismos moleculares genéticos y el desarrollo de la técnica PCR [5]. En la Figura 4 se indica el proceso biológico en la detección del patógeno de interés. Es este el proceso que se pretende integrar en el dispositivo LOC que se intenta desarrollar.

Los exámenes de ácidos nucleicos NAT prometen diagnósticos más rápidos, sensitivos y específicos de enfermedades genéticas, hereditarias e infecciosas [5]. El ensayo⁸ invasor -por ejemplo- es un ensayo de estructura específica, el cual se ha usado en la detección de múltiples genes, μ RNA de varias células y DNA de algunos virus, entre ellos el del papiloma humano [2].

El reconocimiento de patógenos se logra regularmente analizando dos de sus propiedades, el *contenido genético* (mediante pruebas con ácidos nucleicos) o de manera más rápida pero menos precisa, por epítomos⁹ específicos sobre la membrana del patógeno o las toxinas que produce mediante anticuerpos [6].

Uno de los mayores retos en varios esquemas de detección de biológica es el

8 Los ensayos biológicos (o bioensayos) son pruebas empleadas en la determinación de actividad biológica de distintas sustancias (como hormonas y drogas) y/o su impacto en organismos vivos, igualmente son usados en la medición de concentraciones de constituyentes particulares en una mezcla que potencialmente pueden afectar organismos o el medio ambiente. Tales pruebas pueden realizarse en organismos vivos (in vivo) o en tejidos o células (in vitro).

9 la zona de un antígeno a la cual un anticuerpo se alca por si mismo.

etiquetado (en el que se emplean marcadores fluorescentes, enzimas, especies radioactivas o puntos cuánticos) debido al consumo de tiempo que requiere, evitando obtener información en tiempo real. Adicionalmente algunas etiquetas interfieren con la actividad biológica de las especies etiquetadas, por lo que la información obtenida a menudo no es verídica, por lo que el diagnóstico puede ser erróneo. Por ello es deseable desarrollar sistemas de detección libres de etiquetado pero que mantengan o de ser posible, superen la sensibilidad de las técnicas que emplean etiquetación [7,15].

Biosensores

Actualmente existen biosensores (electroquímicos, ópticos, mecánicos y piezoeléctricos) para detección de secuencias de DNA libres de etiquetado [7]. Los ácidos nucleicos son estables y pueden reconocer un amplio rango de blancos con alta selectividad, especificidad y afinidad [20]. Tecnologías como la electroquímica, los biosensores y la microfluídica son propuestas para lograr una aplicación real de sistemas POC. Recientemente, Rackus [21] ha propuesto que las oportunidades son abundantes para métodos relacionados en sensado y monitoreo ambiental, así como en agricultura y los sectores veterinarios.

Los principios de detección para los biosensores se pueden clasificar dependiendo del principio físico de transducción, entre los más comunes se encuentran los ópticos, mecánicos y electroquímicos [22]. De particular interés resulta el grafeno, que puede hacer uso de esos tres tipos de mecanismos para lograr la detección de biomoléculas. Debido a sus propiedades únicas (cristalográficas, físicas, químicas, electrónicas y mecánicas) el grafeno y sus derivados han sido considerados como importantes piezas para la exploración y fabricación de nano/biointerfaces [20].

Algunos retos a superar son la reproducibilidad en el procesado del grafeno, la preparación de grafeno funcional con superficies tratadas, el control de la morfología y la integración con altos rendimientos de biomoléculas al grafeno. A la par de éstas, deben ser cubiertas las carencias en conocimientos respecto a la metodología de interacción de los ácidos nucleicos en las interfaces de grafeno y de los efectos biológicos resultantes de exposición a largo plazo para diferentes células, tejidos, y órganos [20].

Microflujos en Manipulación de Analitos

Una tendencia tecnológica que ha tenido éxito en los últimos tiempos es la integración de pruebas o procesos realizados de manera autónoma. En este ambiente es que surge el concepto de los dispositivos LOC. A manera de una definición para tales dispositivos, podemos decir que son elementos tecnológicos diseñados con la finalidad de realizar de manera secuencial y autónoma un grupo de funciones que en conjunto permite obtener el resultado de un análisis, con las ventajas de emplear una cantidad limitada de recursos (del orden de mililitros a picolitros tanto en reactivos como en muestra), una alta eficiencia en el proceso de análisis y una configuración compacta de tal dispositivo [1,23].

La μ F basada en gotas se considera una configuración adecuada para los POC, ya que elimina la necesidad de válvulas y bombas ya que manipula gotas individuales como bioreactores. Algunos bioensayos ya realizados en este tipo de dispositivos son el PCR y la hibridación de DNA. Otros diseños de dispositivos microfluídicos hacen uso de rendijas producidas por microelevaciones para facilitar el desdoblamiento de partículas superparamagnéticas en las gotas. Esta configuración particular ha sido empleada en la detección de biomarcadores de cáncer de ovarios [6].

La incorporación de la PCR con la microfluídica puede llevar a tiempos más cortos en la reacción debido a su alta rapidez de transferencia calorífica. Actualmente se han desarrollado dispositivos multicanal con control independiente de temperatura para realizar análisis genéticos en paralelo mediante electroforesis¹⁰.

Las μ FP proveen las ventajas del uso minimizado de reactivos y tejidos, velocidades de reacción mayores que derivan en un tiempo reducido de experimentación, la rapidez en la transferencia de masa, capacidad de manipular de forma precisa volúmenes muy pequeños de reactivos y posibilidad de modificar propiedades extensivas debido a la gran proporción de la superficie respecto al volumen (S/V), alto rendimiento, la capacidad de integración para usos multitarea y una alta selectividad a algunos tipos de características subcelulares. Estas características permiten usar los μ FP para posicionar cúmulos de células al interior de un tejido, así como para etiquetar subpoblaciones de células, lo que permite analizar su dinámica con una resolución de unas pocas décimas de segundo [6,1,24].

¹⁰ Las partículas expresan actividad dielectroforética en presencia de campos eléctricos. La fuerza inducida por los campos no uniformes en las partículas polarizadas depende de varios factores, entre ellos las propiedades eléctricas de las partículas, la forma y el tamaño [6].

Una manera simple de entender la relevancia tecnológica de la técnica de μF es a través de una analogía con el campo de la electrónica. Con la aparición de los IC se alcanzó una revolución tecnológica que hizo crecer a pasos agigantados el desarrollo automatizado de la computación y con ello las formas de vida actuales. En la actualidad los mecanismos de automatización de procesos químicos y biológicos se han dado mediante complejos dispositivos y estaciones de trabajo que resultan costosos en recursos materiales, humanos y en el uso de espacios acondicionados para los mismos. Bajo esta analogía, la μF viene a ocupar el lugar del transistor debido a que este campo está dedicado a la miniaturización de sistemas fluidicos así como a su manipulación.

Dispositivos DMF

Una tecnología surgida recientemente es la conocida como DMF, la cual permite la manipulación de muestras en el rango de nL a μL a través de la aplicación de potenciales eléctricos sobre un arreglo de electrodos recubiertos con aislantes hidrofóbicos [1]. A diferencia de los dispositivos μF tradicionales, en los DMF no hay necesidad de redes complejas de microcanales ya que permiten reubicar discretamente las gotas sobre el sustrato, mediante el EWOD en planos bidimensionales [6]. La versatilidad de los DMF es tal, que permite la integración de varios transductores como SPR imaging, FET, y espectroscopía UV/Vis [6].

El campo de aplicación de los DMF es amplio, abarcando la física, química, ciencias de materiales, biología molecular y medicina entre los más importantes. En el campo de la biología molecular, se han implementado en la manipulación y caracterización de muestras de DNA [1]. Estudios en esta dirección implementando la técnica PCR han reportado señales de fluorescencia del DNA amplificado en el chip similares a las obtenidas en un análisis típico en bulto, con la ventaja de una reducción del 50% y 70% en el tiempo del análisis y en el consumo de la muestra, respectivamente. En otras aplicaciones, se han desarrollado los microreactores potenciados por DMF para cultivos automatizados en análisis de microorganismos. Se han reportado también dispositivos DMF con transistores de efecto de campo (FET) para detección y seguimiento del trazado en tiempo real de biomoléculas. Así también, ventajas provenientes de los DMF, son sistemas integrados que permiten análisis de espectrometría de masas en biomoléculas pequeñas más rápidos, directos y altamente sensitivos.

Dispositivos DMF ya han sido diseñados en aplicaciones POC debido a su versatilidad y bajo costo de fabricación, beneficiándose de inmunoensayos basados en perlas magnéticas. Además han sido usados para realizar cultivos celulares, hibridación de DNA y PCR [6]. El recubrimiento de partículas magnéticas con células específicas a sido empleado en dispositivos microfluidicos para la selección de subpoblaciones celulares mediante la aplicación de campos

magnéticos externos [4].

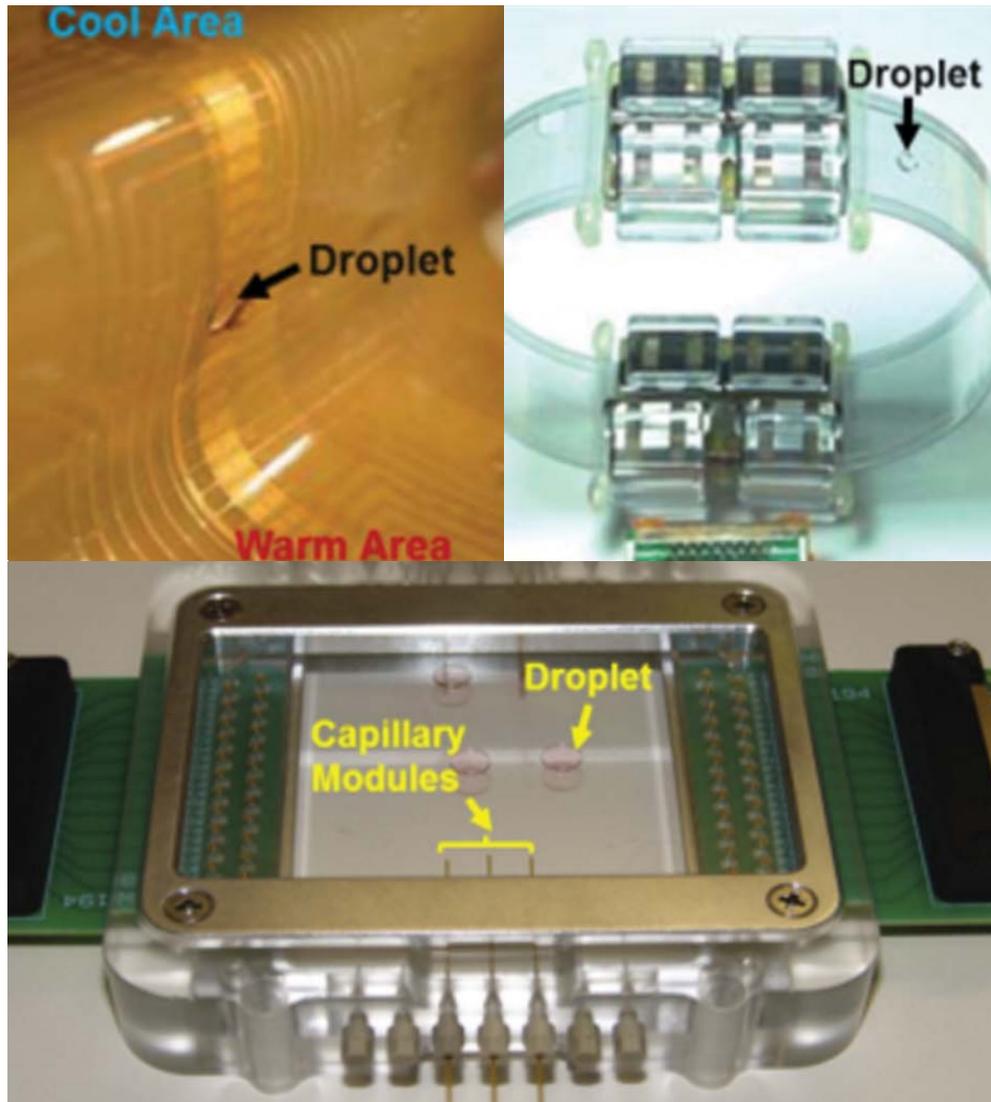


Figura 5: Algunos tipos de dispositivos DMF (Imágenes publicadas en [1]).

EWOD es una técnica comúnmente usada en dispositivos LOC, sus mayores avances han ocurrido en años recientes y se ha vuelto la herramienta más versátil para operaciones en DMF [25,26,27,28], las operaciones de manipulación de la gota incluyen generación, movimiento, mezclado, división y unión. Se entiende actualmente que la forma de la gota está determinada por el balance entre las fuerzas capilares y tensiones eléctricas y que ese balance resulta en un aparente ángulo de contacto macroscópico que concuerda con la aproximación termodinámica clásica. La característica principal que ha convertido al electromojado en la herramienta más recurrida en la manipulación de muestras en

dispositivos LOC basados en DMF es su capacidad de accionamiento (en el orden de ms) y los cambios reversibles de ángulos de contacto superiores a 90°.

Física del mojado

La tensión superficial se puede entender como la energía necesaria para formar una superficie. Esto se explica a través del transporte de moléculas en el bulbo de un líquido hacia la superficie. Dado que en esta acción se deben romper los enlaces por puentes de hidrógeno propios de los líquidos y no son reemplazados, se tiene que perder energía del sistema para formar la superficie. Dicho de otra manera, las moléculas al interior de una fase condensada tienden a experimentar interacciones atractivas hacia las moléculas de la misma fase debido a que en la fase gaseosa la cantidad de moléculas es reducida y por tal, esa interacción no existe o es despreciable, en consecuencia se puede ver a la tensión superficial como la energía necesaria para llevar a una molécula desde el interior de la fase condensada hacia los límites en la interface de los medios.

De manera más formal, se describe a la tensión superficial como la tendencia de una interface a minimizar su área, esta propiedad es característica de interfaces entre distintos materiales y está definida como la energía libre de Gibbs G por unidad de área S bajo una presión p y temperatura T dadas.

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{p,T} \quad (1)$$

Este fenómeno es el que origina una anisotropía energética en ambas fases. Una consecuencia de la anisotropía propia de la interface, es la discontinuidad en la presión hidrostática en la misma superficie. Este salto es modelado por la ley de Young-Laplace:

$$\Delta P = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (2)$$

siendo R_1 y R_2 los radios de curvatura de la interface.

Usualmente en electromojado se emplean gotas de soluciones conductoras sobre sustratos sólidos embebidos en medios gaseosos.

El ángulo de contacto θ_Y es una característica de la línea de contacto de los 3 medios o TCL, definido como el ángulo formado por las interfaces sólido-líquido y líquido-gas, su magnitud está determinado por la tensión superficial de ambas interfaces únicamente, una tensión superficial es asociada a cada interface de

medios inmiscibles, estableciendo un ángulo de contacto θ_Y en el equilibrio.

$$\cos \theta_Y = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad (3)$$

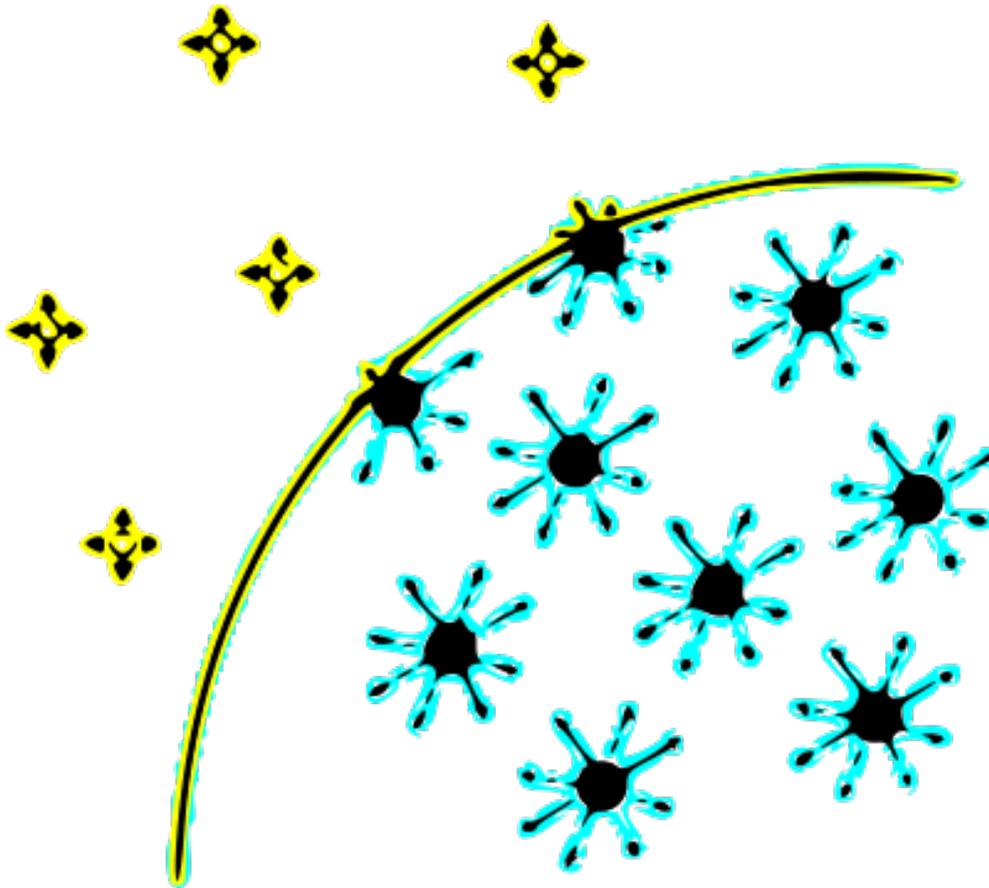


Figura 6: Anisotropía en las interfaces, la cual genera la tensión superficial.

Viendo a esta situación en detalle, es notorio que hay 3 interfaces actuando sobre la línea de contacto con el sólido (el perímetro del menisco). Debemos hablar entonces sobre un equilibrio entre las fuerzas de tensión superficial sobre las interfaces líquido-sólido (γ_{LS}), líquido-gas (γ_{LG}) y gas-sólido (γ_{GS}).

Electromojado

En la derivación de la ecuación (3) se hacen solamente consideraciones termodinámicas en el equilibrio, no obstante para poder entender el fenómeno de EWOD es necesario añadir la contribución eléctrica ($E = \alpha V^2$) al sistema,

correspondiente al potencial V suministrado en el sustrato:

$$0 = \gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{GL} \cos \theta + \alpha V^2 \quad (4)$$

La configuración de tipo capacitor en las terminales simplifica la estimación de tal contribución $E = \alpha V^2$ dado que en este caso la energía almacenada por el capacitor es conocida, siendo de tal forma que

$$\cos \theta_{EW} = \cos \theta_Y + \frac{\epsilon V^2}{2d \gamma_{GL}}, \quad (5)$$

siendo ϵ la constante dieléctrica del medio que separa las terminales (es decir, la película dieléctrica) y D la separación entre las terminales (a saber, el grosor de la película dieléctrica).

Debido a que exceder un potencial crítico del orden de 1 V produce reacciones electroquímicas en la interface sólido-líquido, la técnica de electromojado a evolucionado al EWOD a través de un recubrimiento dieléctrico sobre las terminales, lo cual tiene ventajas adicionales:

1. No hay reacciones electroquímicas indeseadas al aumentar el potencial.
2. Hay una reducción de rugosidades y contaminaciones sobre el sustrato debido al recubrimiento dieléctrico, ya que regularmente es no adsorbente.
3. Mejor control en el cambio $\Delta\gamma_{SL}$.
4. En EWOD es factible lograr cambios a $\Delta\gamma_{LS} = 40^\circ$ aplicando potenciales de 15 V.

Por su parte existen inconvenientes como

1. Menores capacitancias requieren mayores potenciales para obtener ángulos dados.
2. En caso de trabajar con biomoléculas, estas se unen de manera inespecífica en las superficies hidrofóbicas.

Una observación común es que el ángulo de contacto aumenta de acuerdo a hasta cierto voltaje crítico V_c en el cual el EWOD satura, no obstante el mecanismo de saturación sigue siendo desconocido en general. Recientemente se ha demostrado que una superficie superhidrofóbica nanoestructurada satura a 22 V.

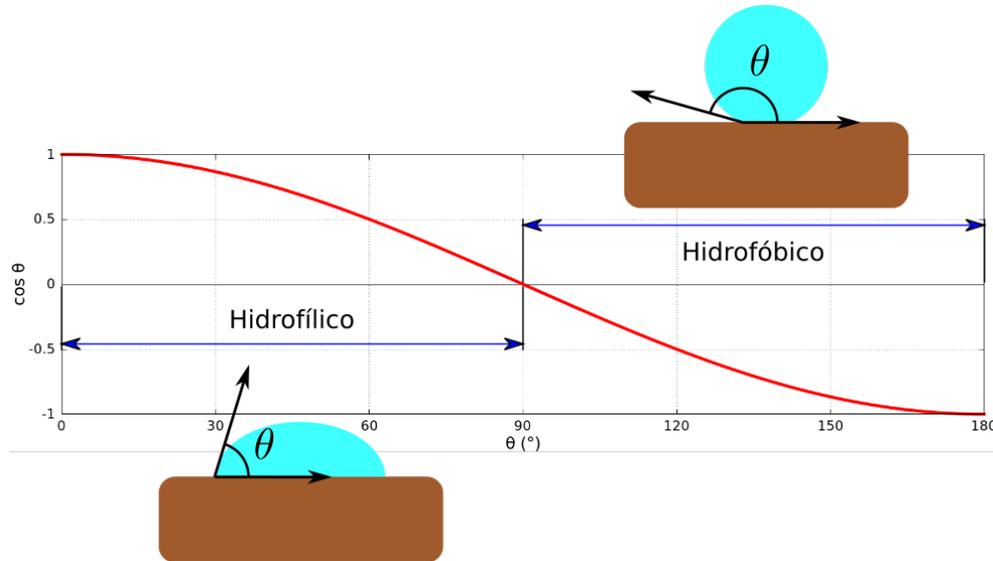


Figura 7: Efecto de la actuación de campos eléctricos sobre el analito.

Microsistemas de Análisis Totales

Recientes avances en el campo de la microfluídica proyectan a los sistemas integrados LOC, también referidos como micro análisis totales (μ TAS) [11], como los futuros dispositivos para el diagnóstico de enfermedades y la detección de ácidos nucleicos, los cuales se pueden llevar a cabo en un tiempo reducido y con capacidad de *multiplexación*¹¹. Solo unos pocos sistemas poc completos han sido logrados en tiempos recientes. Esta escasez se debe según Kim [31], al pobre desempeño en preparación de muestras.

En estos dispositivos implementados para la amplificación de ácidos nucleicos, se prealmacenan reactivos, enzimas e iniciadores, permitiendo la detección-diagnóstico multiplexado [11]. Una interesante alternativa en el campo de los análisis miniaturizados fue reportado por Lutz [32], usando rpa combinada con cartuchos de centrifugas microfluídicas, que incluyen reactivos secos precargados (liofilizados), y un equipo disponible comercialmente que incuba a 37°C y detecta por fluorescencia en tiempo real, para el análisis completamente automatizado de ácidos nucleicos en un sistema LOF.

La PCR es el estándar de oro en el diagnóstico molecular y ha llamado la atención para tratar de implementarse en los sistemas de análisis miniaturizados, aunque también existen otras alternativas. Las reacciones de amplificación isotérmicas

¹¹ Se espera que los sistemas microfluídicos desarrollados para diagnóstico molecular que usan NAT se vuelvan una herramienta central en diagnóstico clínico, tan pronto como los métodos de amplificación de ácidos nucleicos sean mejorados [29,30].

son prometedoras alternativas a la PCR, adicionalmente, los métodos de amplificación isotérmica presentan más opciones para el diseño de microsistemas de análisis de ácidos nucleicos ya que existen numerosos métodos y kits comerciales actualmente disponibles para detección de patógenos (RCA, HDA, LAMP, NASBA, ICANs, SDA, Y EXPAR [11]).

Un hecho importante que no debe ser desestimado es la proporcionalidad entre el consumo de energía de los dispositivos y la temperatura de operación de los métodos de amplificación isotérmica, especialmente en diseños con recursos limitados [11].

Amplificación de DNA y μ TAS en Dispositivos POC

La NAT juega un papel esencial en el diagnóstico molecular. La mayoría de las investigaciones y protocolos clínicos tratan con análisis manuales de muestras individuales por técnicos capacitados, lo cual es un proceso tedioso y demandante de tiempo [29].

La complejidad en el diagnóstico molecular es un reto a vencer. Esta surge de la frecuente incompatibilidad entre varios pasos del proceso: la *lisis* celular, la extracción de ácidos nucleicos y el análisis de componentes de la muestra [5,31]. Avances en las tecnologías que hagan posible la integración completa de estas etapas permitirá que las pruebas de ácidos nucleicos despunten como un estándar en clínicas y laboratorios. Una gran cantidad de trabajo se ha realizado para evitar dificultades y hacer posible los sistemas integrables como un dispositivo LOC. Como resultado de estos esfuerzos, unos pocos sistemas que combinan lisis y extracción han sido desarrollados y luego vinculados a los resultados de un microsistema de análisis [31].

Kim [31] ha discutido y evaluado extensivamente una variedad de métodos microfluídicos de preparación de muestras. Su reporte categoriza los mecanismos de lisis (físicos o químicos), algunos microsistemas de lisis celular y realiza una clasificación de técnicas de purificación de ácidos nucleicos conforme al mecanismo de unión de éstos al sustrato (afinidad a superficies de sílice, interacción electrostática, micropartículas funcionalizadas y filtración de membranas nanoporosas). Las técnicas de lisis celular en microfluídica y la purificación de ácidos nucleicos son comparadas de acuerdo a la facilidad de microfabricación e integración, así como la flexibilidad de la muestra.

Proceso Diseñado

En general el diseño de un dispositivo con las características deseadas no es tan simple debido a que no cabe en un solo campo de conocimiento, por lo que es necesaria la interacción entre expertos en distintas áreas para llevarlo a cabo. Antes de empezar con la realización de un proyecto es conveniente realizar un diseño apropiado del mismo, así como la planeación del desarrollo experimental.

Las preguntas fundamentales previo a comenzar a resolver un problema son *¿porque?*, *¿como?* y *¿que?*. La primera de éstas preguntas encuentra su respuesta justificándose en los puntos expuestos en las sección introductoria. Pasando este punto, las cuestiones del "como" y el "que" serán abordadas adecuadamente en ésta sección.

Bajo un esquema global, se ha pretendido diseñar el proceso completo a mediano y largo plazo de éste proyecto, siempre manteniendo en contacto las vertientes esenciales del conocimiento en la ciencia moderna: Teoría, Experimentación y Simulación. En la Figura 8 se muestra tal integración.

En primer lugar es conveniente entender que conocimientos son necesarios respecto a cada una de las áreas del saber implicadas en el proyecto para luego poder separar bloques de trabajo haciendo especial énfasis en la parte del proyecto que cada uno de los implicados pueda aportar.

Al desarrollar este trabajo de tesis lo que se tiene en mente es montar una serie de tecnologías, integrándolas de tal manera que permitan el objetivo principal del proyecto: crear un dispositivo que de manera autónoma sea capaz de realizar análisis de detección de patógenos en muestras biológicas. Para realizar este fin se ha partido de la observación de que hay que conocer la física del proceso implicado (EWOD), así como de las propiedades de los materiales ha utilizarse, siempre manteniendo la condición de biocompatibilidad con el proceso. Además de ello hay que poseer conocimiento respecto a la manipulación de tales materiales para su procesamiento y posterior automatización. Es de remarcar que el montaje de un prototipo es tan solo la primera parte del proyecto, ya que aunque funcional, debe cumplir ciertas características para su implementación y producción en cantidades significativas. Con esto en mente, es que se procede a la optimización del proceso a través de múltiples técnicas como la simulación computacional o la refinación experimental para obtener retroalimentación y proponer mejoras del dispositivo.

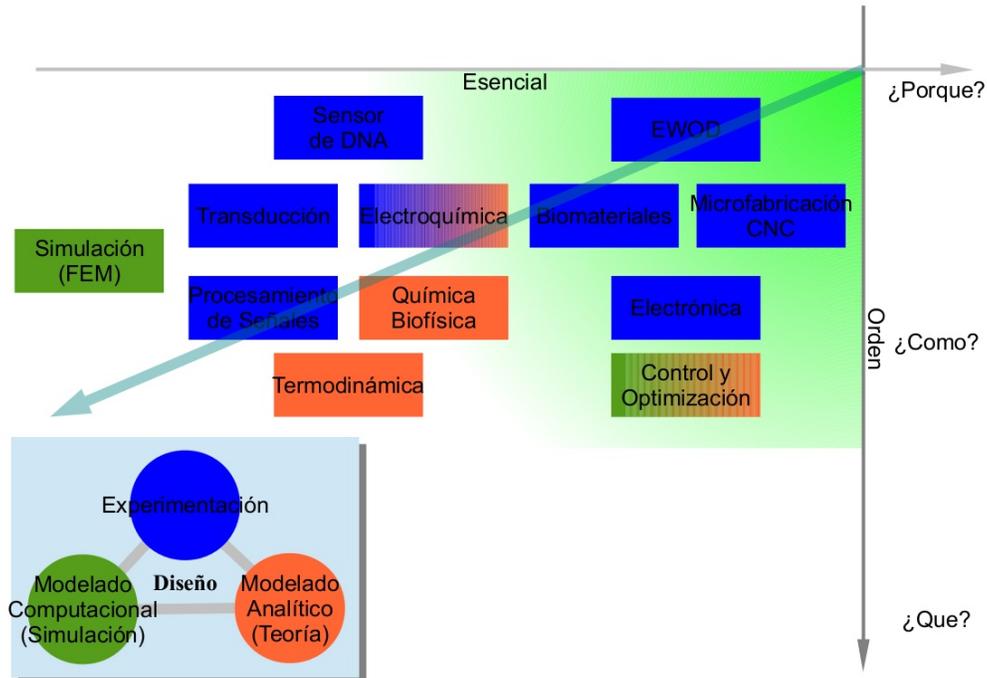


Figura 8: Aplicación de Conocimientos en el Desarrollo del Biosensor: Los conocimientos necesarios para realizar el diseño del Biosensor deseado son muy bastos por lo que es necesario un enfoque multidisciplinario.

Se entiende que a corto plazo el proceso de creación requiere específicamente entender el proceso de manipulación del analito, es decir, controlar el fenómeno EWOD para poder realizar el desplazamiento del analito sobre el sustrato elegido a la par de tener cuidado en los materiales a utilizar y determinar su biocompatibilidad. En esta primera etapa se deben decidir los mecanismos de fabricación con los cuales se pretende generar las estructuras que permitan la tarea planteada.

A mediano plazo será necesario entender los mecanismos de transducción del DNA en un sensor particular para determinar si dicho sensor es específico al proceso que se está siguiendo, para ello será necesario valerse de las herramientas de la electroquímica al describir el tipo de interacción del DNA con el sensor empleado y haciendo uso del conocimiento de las propiedades físicas del mismo DNA. En la adquisición de estos datos será necesario el empleo de adquisición y procesamiento de señales. En esta misma etapa se deberá dar paso al control automatizado del proceso para lograr su optimización.

Finalmente -en los objetivos a largo plazo-, se considera el mejoramiento del prototipo mediante la integración de la etapa de control térmico para el proceso de

desnaturalización del DNA y los pasos del proceso que precisan encubación. Así mismo, en esta etapa final con los datos recopilados durante todo el proceso se puede pretenda efectuar un modelado teórico a través de simulaciones computacionales mediante el método de elemento finito para realizar una retroalimentación y optimización final del prototipo.

Enfoque del diseño

Dadas las características propias del dispositivo que se trata de implementar, es apropiado el uso de la metodología *Top-Down* para el diseño del mismo. Tal metodología se caracteriza ya que el diseño comienza especificando el estado global del sistema y asumiendo que cada componente corresponde a un estado particular del mismo. Luego de ello, se obtiene la solución a través del reemplazo del conocimiento global por las conexiones de las componentes y su posterior refinamiento [33]. Dicho de manera más simplista, para proponer una solución top-down al problema planteado es necesario analizar primero desde una perspectiva general y funcional el problema mismo.

Retomando la hipótesis de trabajo:

"Diseñar un Chip de microfluidez como biosensor para el diagnóstico del virus de papiloma humano de alto riesgo y dar los primeros pasos en su construcción"

es posible reconocer componentes esenciales en el proceso de desarrollo del dispositivo planteado. Funcionalmente se distinguen tres etapas esenciales: procesamiento de analitos para su evaluación, mecanismo de manipulación de los analitos y reactivos, y finalmente, mecanismo de transducción en el análisis. Tales componentes se esquematizan en la Figura 9.

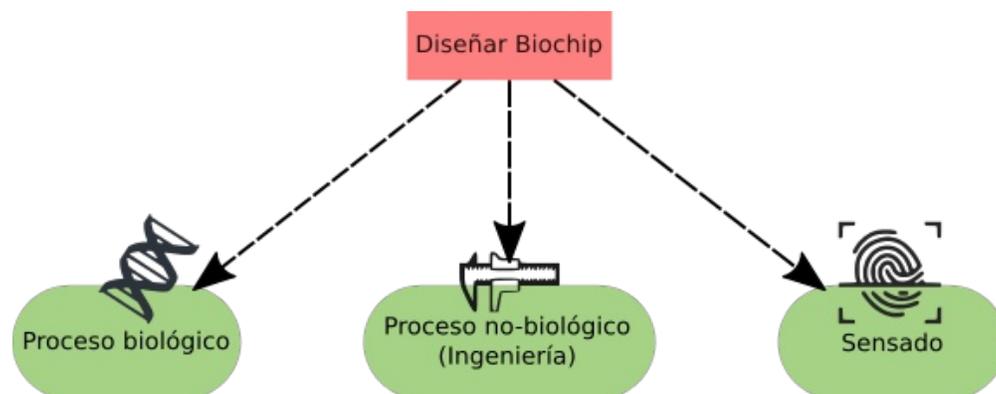


Figura 9: Niveles de desarrollo en la fabricación del dispositivo biosensor autónomo con escalamiento del análisis.

Las etapas principales a considerar en este trabajo son las dos primeras solamente, con especial énfasis en la segunda de ellas debido al perfil, limitaciones y enfoque del proyecto.

Características del proceso

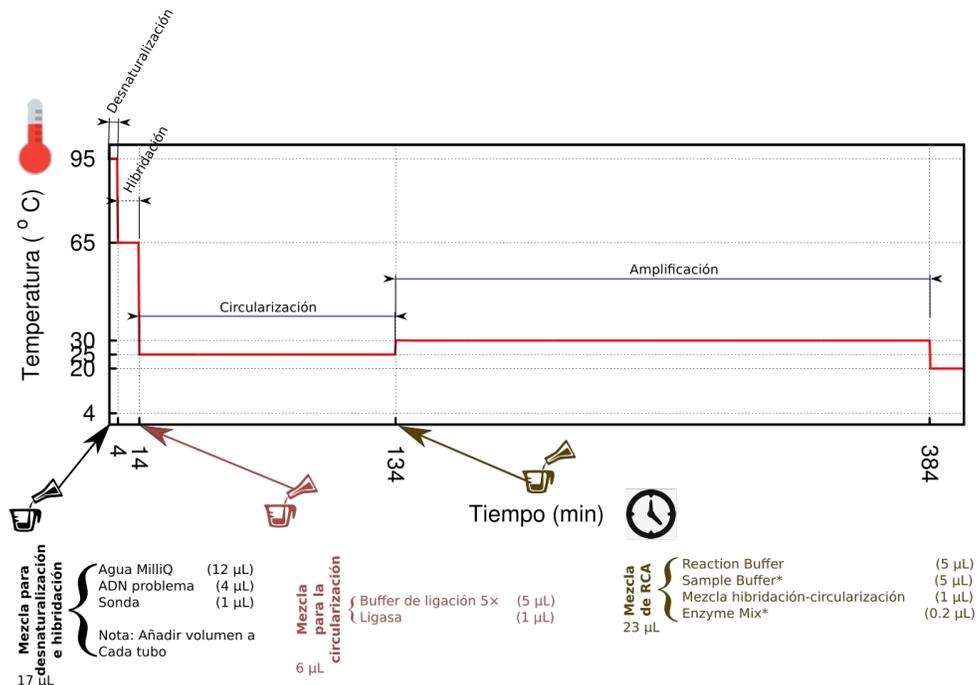


Figura 10: Mecanismo de análisis de patógenos con amplificación RCA.

En primer lugar es necesario entender el procesamiento del análisis del analito, el cual se ilustra en la Figura 10. En ésta, se esquematiza la evolución térmica del analito a través del tiempo y la incorporación de los reactivos propios del análisis. Este es el proceso biológico realizado de manera convencional en la detección del patógeno de interés, y es este el proceso que se pretende integrar en el dispositivo LOC que se intenta desarrollar.

La técnica a implementar de manera autónoma, que acapara la atención de este trabajo es la DMF -como se mencionó previamente en la introducción-, gracias a las bondades ya descritas. Características a considerar en el diseño de dispositivos microfluídicos para explotar su potencial manteniendo simplicidad de operación (para cualquier usuario), son la implementación de microcanales en paralelo, microbombas embebidas, discretización del flujo mediante gotas controlables [6].

Debido a que la integrabilidad de dispositivos microfluídicos para amplificación de DNA en chips de varias muestras biológicas ha ganado extensiva atención sobre las décadas pasadas [22,34] es tan importante la alta sensibilidad en el diseño de bioensayos así como mantener adecuados varios factores, tales como el costo, el tiempo, la complejidad, el rango dinámico y la reproducibilidad.

El conjunto de fenómenos físicos (tanto electrodinámicos como termodinámicos y mecánicos) que son observables y afectan el desempeño del prototipo propuesto deben ser controlados de la manera más óptima posible, por lo que se plantea una composición multicapa con diversos materiales para lograr un mejor resultado, la Figura 11 presenta tal composición.

Las capas necesarias para lograr el EWOD son: circuito eléctrico, película conductora, y las películas dieléctricas, las cuales describen una configuración cerrada del dispositivo. Al respecto de la configuración cerrada se debe mencionar que ha sido elegida dado que en ella la pérdida de analito es reducida dado que el entorno es controlado y no se facilita la pérdida por evaporación. La realización de canales -atípica en dispositivos DMF, también favorece el control del volumen del analito y su reducción en la evaporación, mientras que restringe la posible salida del analito de la pista de terminales que lo guían en el proceso.

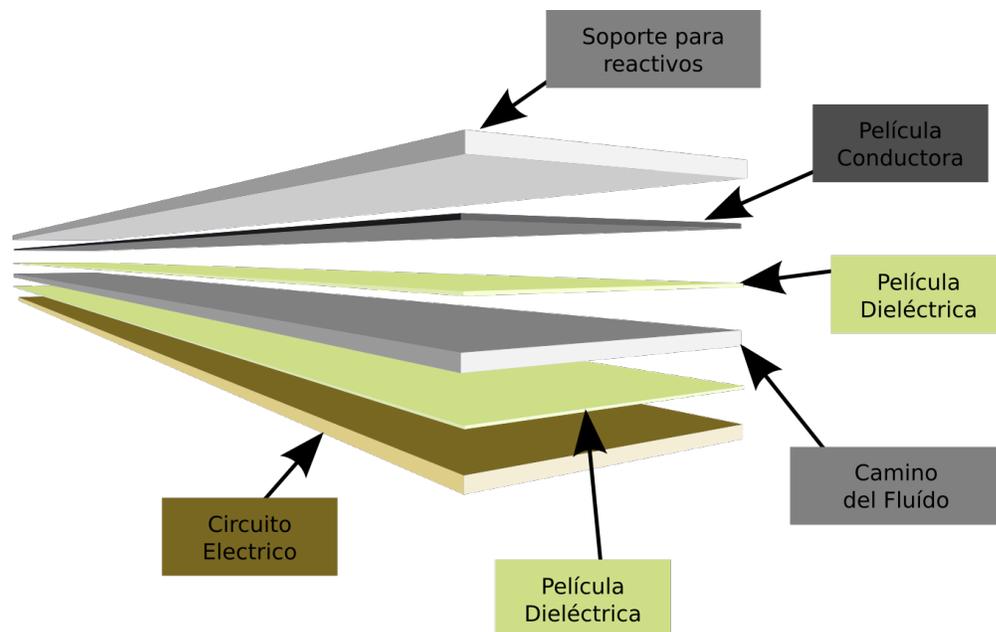


Figura 11: Esquemización de los componentes de manufactura necesarias en la creación del chip.

El uso de las capas dieléctricas es -como se explico previamente- para evitar reacciones redox entre los componentes de la solución electroconductora y el sustrato metálico, la selección de estas capas es crítica para observar el efecto del campo eléctrico sobre el analito. Una de las complicaciones de utilizar un recubrimiento inadecuado es entendible a partir de la ecuación (5) si se toma en cuenta los resultados que demuestran que existe un ángulo de saturación posterior al cual no es posible seguir modificando θ_{EW} por más que se aumente el potencial en el sustrato. Esto significa que una superficie hidrofóbica evidenciará más el efecto EWOD puesto que $\Delta\theta \equiv \theta_{EW} - \theta_Y$ aumentará.

Las características particulares que se pretenden integrar en el dispositivo son:

- El dispositivo será capaz controlar un volumen de μL del analito.
- Deben poderse realizar las operaciones de transporte, mezcla y división de gotas dentro del μTAS .
- Debe ser capaz de controlar localmente las elevaciones de temperatura requeridas por el proceso de amplificación de DNA.

En el desarrollo del análisis de detección se realiza la añadidura específica de ciertas proporciones de reactivos, la cual es importante mantener. De esta observación se puede concluir que el proceso es escalable en tanto se cuente con mecanismos de medición calibrados de manera adecuada.

El dispositivo de medición fundamentalmente empleado en el laboratorio es la micropipeta, la cual tiene una sensibilidad de μL . En base a esta limitación es que se puede determinar que el volúmen actualmente empleado en el análisis puede reducirse a la mitad.

Todas las consideraciones previas han contribuido a plantear un diseño funcional del dispositivo como se muestra en la Figura 12.

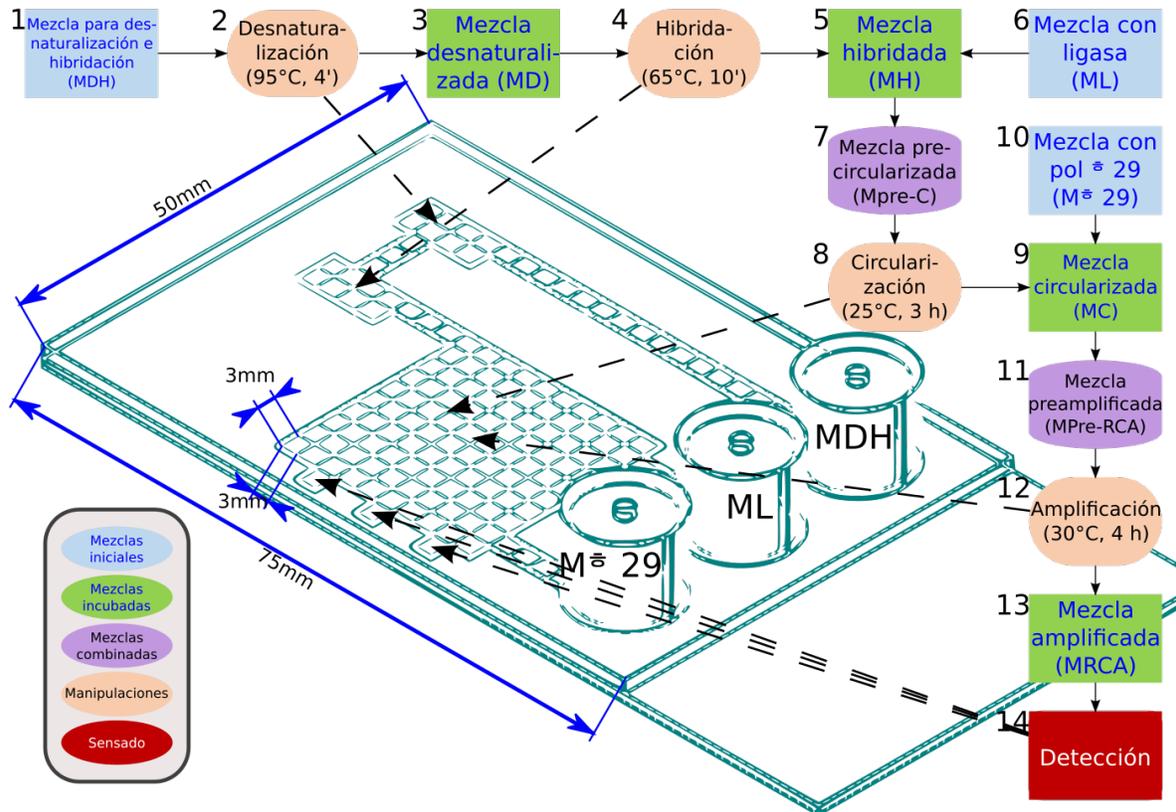


Figura 12: Esquematzación del método propuesto para realizar el análisis en el chip propuesto.

Trabajo Experimental

Dado que es una fase de abordaje y adquisición del conocimiento, se considera que es necesario realizar pasos controlados con la menor cantidad de variables involucrados. Por esta razón es que a pesar de pretender un sistema LOC cerrado, se ha decidido simplificar el sistema empezando la experimentación con un circuito μF abierto en una primera aproximación para luego intentar controlar la configuración cerrada. Se sabe que la configuración abierta permite usar un potencial menor en el sustrato para manipular la gota de solución electroconductor.

En el desarrollo de este trabajo se ha recurrido a distintos materiales y configuraciones con el afán de encontrar los más óptimos para controlar el fenómeno del electromojado. Las componentes evidentes a utilizar en el experimento según la teoría del electromojado son un sustrato conductor, un líquido electroconductor, una fuente de alimentación y un recubrimiento

electroaislante.

Sustrato

La elaboración del sustrato se ha realizado mediante dos métodos: impresión con tinta electroconductora y trazado sobre una placa fenólica para PCB.

La impresión con tinta electroconductora tiene el problema de que es necesaria una deposición de forma muy precisa la cual no es alcanzable mediante los métodos disponibles. Por contraparte, la realización de PCB es simple dado que el proceso de fabricación solo requiere el diseño en un software que genere imágenes vectorizadas para su posterior maquinado en un equipo CNC, este proceso es de mayor simplicidad dado que las placas fenólicas son fabricadas con una película de 35 μm de grosor. El uso de una placa fenólica también es conveniente dado que es un sustrato rígido, lo cual facilitará el control del volumen del analito al interior del chip cuando se logre controlar la configuración cerrada.

Recubrimiento

El recubrimiento de la placa fenólica obedece a dos propósitos simultáneamente, el primero es proveer de un mecanismo de electroaislamiento entre el sustrato y la solución electroconductora, a la vez que debe propiciar las condiciones de tensión superficial adecuadas para el experimento, es por eso que el recubrimiento se realiza en dos etapas de una manera compuesta.

Los materiales empleados para este fin fueron varios, para lograr el electroaislamiento se emplearon diversas películas de HDPE, PE, PTFE, latex y PMMA; para aumentar la hidrofobicidad se recubrió con aceite de oliva, aceite de coco, silika, aceite Baby magic Mennen©, lubricante de base agua, grasa de silicón y repelente de agua Rain-X©.

En la literatura se reporta el uso de distintos aceites comestibles para aumentar el ángulo de contacto entre el analito y el sustrato, algunos de ellos fueron analizados confirmando tal condición, no obstante el aumento del ángulo fue opacado por la reducción en la movilidad del analito. A manera de prueba de concepto se realizó análisis mediante un plano inclinado para determinar la movilidad del analito soportado sobre el sustrato tratado con Rain-X© y el mismo sustrato tratado con aceite mineral. Los resultados de tal prueba mostraron un ángulo de desprendimiento $\theta \approx 48^\circ$ y $\theta \approx 58.4^\circ$ respectivamente.

A pesar de obtener buenos resultados con el aumento del ángulo de contacto a

través de algunos tipos de aceite, este método debe evitarse debido a que la movilidad del analito se ve mermada, a la par que no se puede garantizar reproducibilidad por las variaciones en la composición entre distintos lotes de la producción de los mencionados aceites. La hidrofobicidad lograda mediante el tratamiento del sustrato con el repelente ha resultado suficiente para observar el fenómeno de electromojado, sin embargo aún es deseable optimizar la superficie con un recubrimiento de mayor hidrofobicidad.

Solución Electro-conductora

Las soluciones probadas fueron NaCl disuelta en agua, $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y un líquido iónico formado por ácido acrílico y cloruro de etilamonio.

El uso de el ácido acrílico resulta contraproducente ya que disuelve varios tipos de polímeros, específicamente los probados en el recubrimiento electroaislante. Las soluciones salinas resultaron mejor opción, la solución empleada finalmente se obtuvo mediante la solubilización de hidróxido de cobre pentahidratado $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disuelto en agua desionizada en una proporción 3gr:10ml.

Prototipo

La dinámica de trabajo empleada para realizar el prototipo presentado partió de determinar el campo eléctrico necesario para observar el fenómeno de EWOD, para lo cual se emplearon distintas fuentes de alimentación en DC, variando en el rango de 0-25kV, a partir de lo cual se estableció que un voltaje en torno a $V_a \approx 2\text{kV}$ es apropiado para realizar el desplazamiento del analito considerando la selección realizada de materiales. Este resultado dista en gran medida de los presentados en la literatura donde se indican voltajes de actuación V_a considerablemente menores.

El efecto de desplazamiento lateral logrado mediante EWOD fue observado en una placa PCB recubierta con una película de PMMA la cual fue tratado con el repelente de agua para cristales Rain-X© en una placa ranurada mediante una fresadora CNC con un potencial $V_a = 1.8\text{kV}$ con un switcheo manual entre las terminales.

Durante esta primera etapa algunas observaciones en la conmutación de las terminales activadas en el sustrato apuntaron a que el suministro de DC de forma pulsada facilita el desplazamiento de la SEC, siendo así, es que se procedió a montar un circuito eléctrico para realizar la conmutación de manera pulsada a alta frecuencia. Para este fin se implemento el uso de un transistor tipo MOSFET

de canal N en modo trabajo *enhancement* con matrícula *BSP89*. Este transistor fue elegido dado que como cualquier MOSFET permite una frecuencia de conmutación alta llegando a los MHz, pero adicionalmente es capaz de controlar una alta potencia.

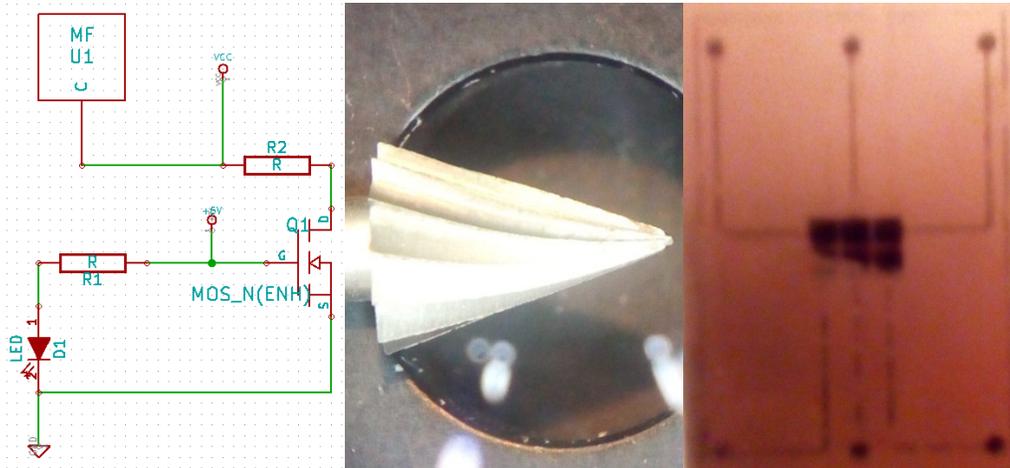


Figura 13: Fabricación del dispositivo μ TAS

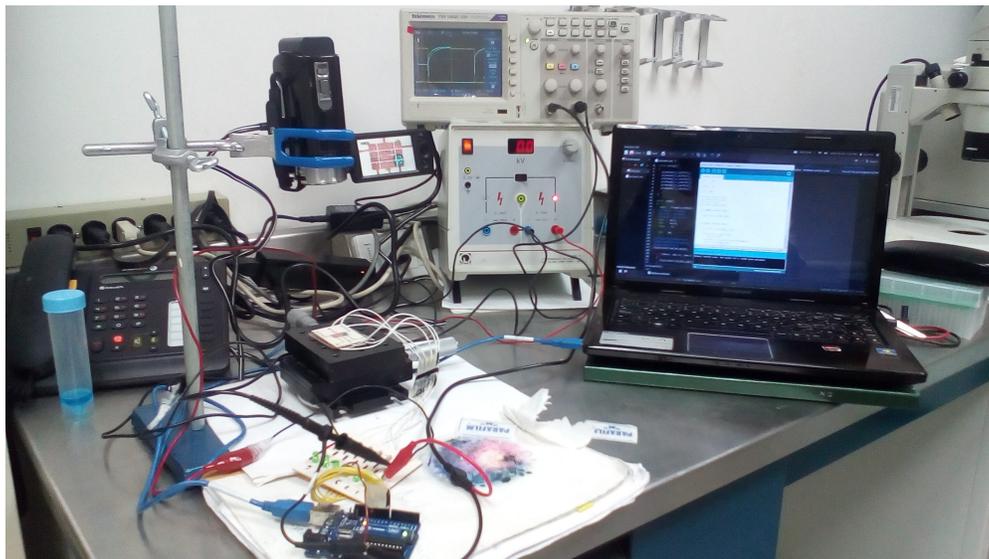


Figura 14: Sistema experimental montado.

Para conocer las capacidades del transistor y determinar la mejor forma de dar el estímulo al analito se realizó una modulación por ancho de pulso. En la Figura 15 se observan los resultados obtenidos para distintas relaciones $R_{0/1}$, los dos canales mostrados son los correspondientes al pin *Gate* (G) y al pin *Drain* (D) del transistor. Las mediciones se realizaron suministrando un potencial $V_a=172V$ mediante una fuente de ensamble propio y la adquisición mediante un

osciloscopio con una atenuación 1x para G y 10x para la terminal D. Los parámetros variados en este barrido fueron la relación $R_{0/1}$ y la frecuencia del pulso de DC.

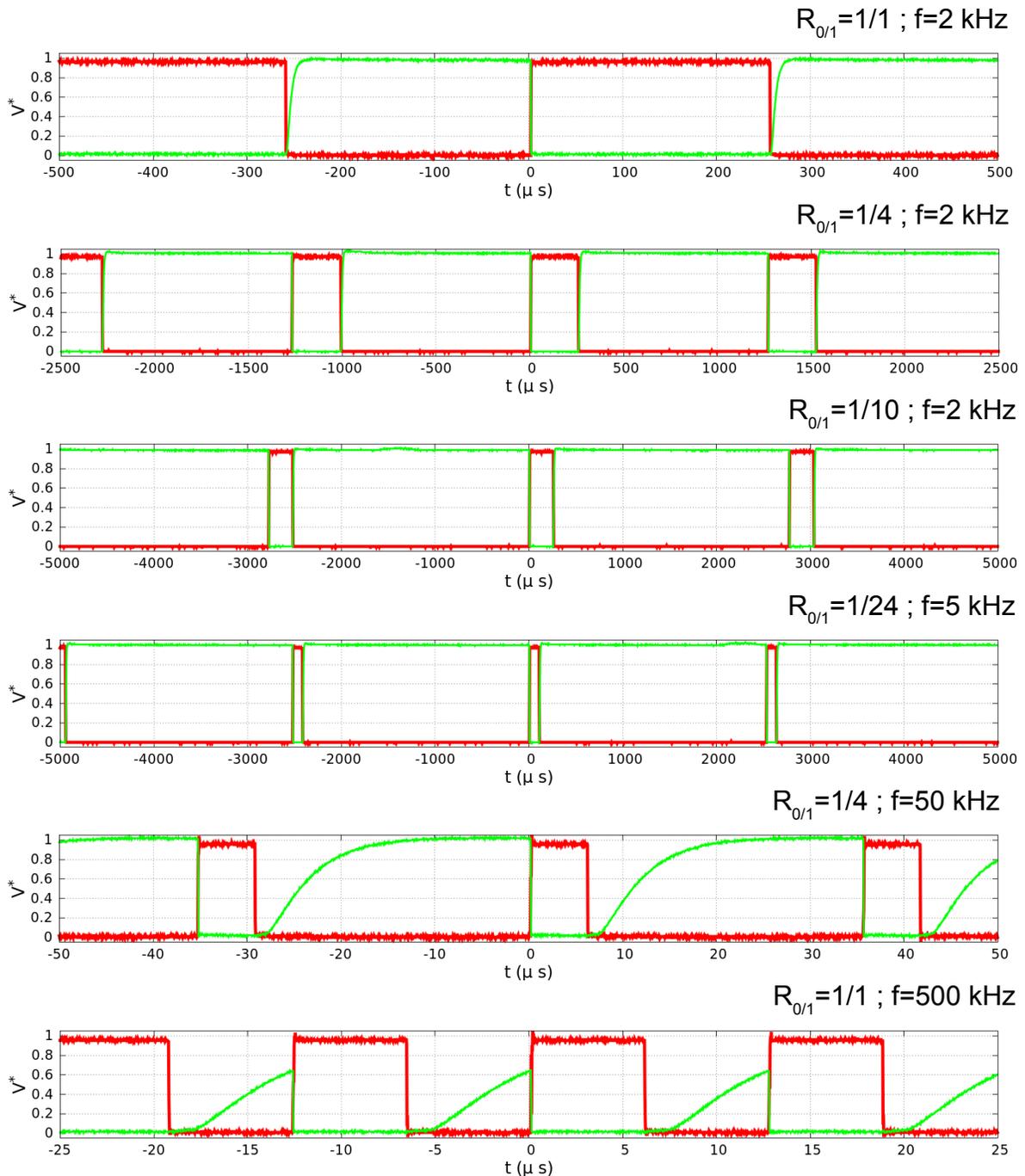


Figura 15: Respuesta a variaciones de frecuencia f y relación $R_{0/1}$ sobre el ancho del pulso en el transistor.

La relación $R_{0/1}$ se define como $R_{0/1}=t_{off}/t_{on}$, siendo t_{off} la parte del periodo del pulso en el cual se mantiene el estado lógico bajo y t_{on} la parte en que se mantiene el estado lógico alto. Dado que el mayor interés en este análisis es la observación de los pulsos de entrada y salida en los puertos mencionados del transistor, los voltajes en todas las gráficas fueron reducidos con el valor nominal de la fuente en cada entrada ($V_G=5V$ para G y $V_D=172V$ para D) y apreciar la deformación del perfil del pulso en D.

Dado que para controlar el puerto G es necesaria la aplicación de una diferencia de potencial V_{GS} entre G y D, es entendible a partir del esquema eléctrico (Figura 13) que la compuerta D invierte el estado lógico de G. Se puede observar también el efecto de la frecuencia de conmutación f_c y de $R_{0/1}$. A medida que f_c aumenta, el flanco de subida sufre una deformación cada vez más notoria, deformación que impide que se alcance el voltaje suministrado en S cuando $f_c \sim 10^5 \text{Hz}$.

En la Figura 14 se puede apreciar el sistema experimental montado durante el desarrollo de este trabajo. Este sistema consiste de un soporte para EWOD conectado a un circuito eléctrico automatizado mediante una tarjeta Arduino UNO. La adquisición de imágenes fue realizada con una cámara Sony Handycam© DCR-SX22 y el seguimiento de los pulsos fue realizado con un osciloscopio. El suministro de energía se realizó mediante una fuente Leybold de 10kV y alternativamente con una fuente de fabricación propia de 172V.

Al realizar el montaje experimental mostrado, no fue posible observar nuevamente el EWOD ni el desplazamiento lateral. Esto se debe -probablemente- a las limitaciones de ambas fuentes usadas. La fuente Leybold a pesar de alcanzar adecuadamente el potencial necesario para observar el efecto esperado, no es capaz de soportar la corriente de $I_L \approx 0.12A$ requerida por el circuito. Por el contrario la segunda fuente puede soportar una corriente $I_L \approx 0.25A$ pero solo es capaz de suministrar $V_p=172V$.

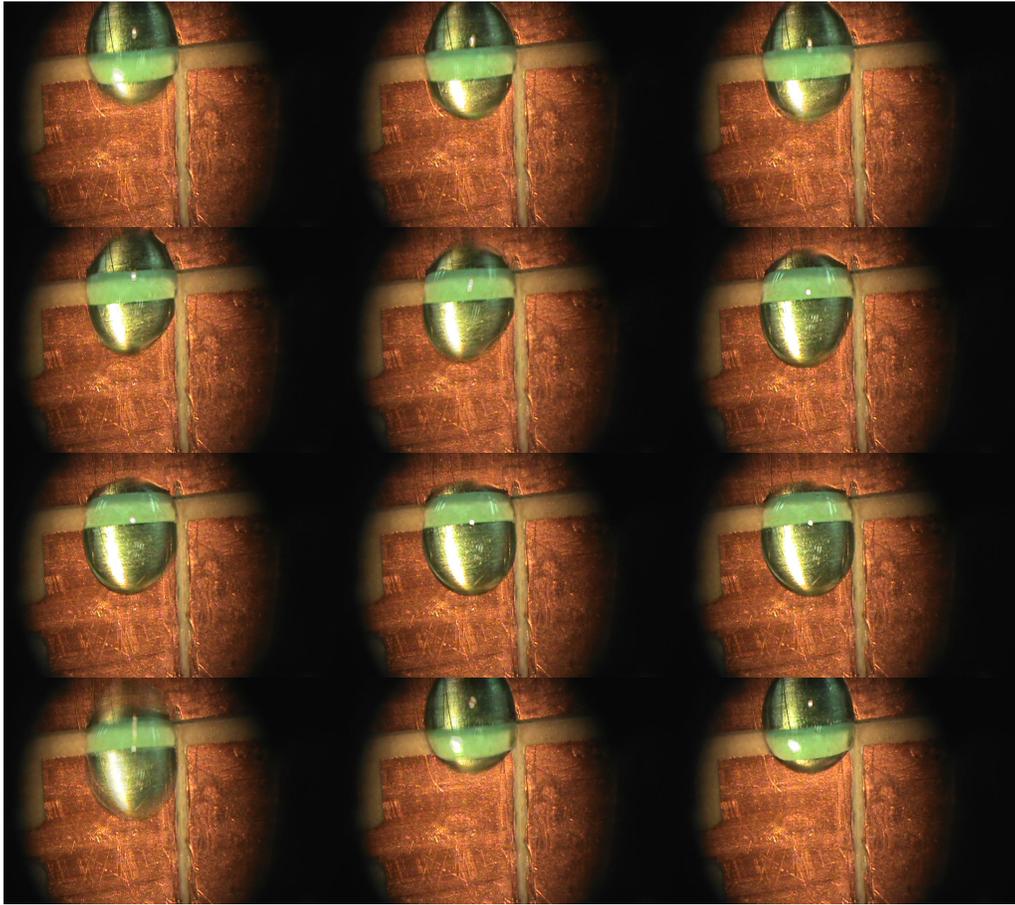


Figura 16: Fotogramas capturados durante la activación alternada de las terminales del chip de EWOD.

Refinamiento del diseño

Los resultados encontrados hasta este punto muestran el desplazamiento del analito pero con el inconveniente de requerir un campo eléctrico demasiado alto. Es sabido de la literatura que el efecto de un campo eléctrico puede producir la desnaturalización del dsDNA, por lo que resulta conveniente una estimación del campo eléctrico E requerido para tal caso y modificar el diseño del chip en caso de ser necesario.

Dado que el proceso de desnaturalización depende del método particular en el que se esté realizando el análisis, es conveniente emplear los datos particulares del análisis que se habrá de implementar en nuestro dispositivo.

En el caso analizado se logra la desnaturalización del analito de dsDNA mediante la elevación de temperatura hasta los 95°. Es razonable pensar que la energía suministrada para realizar esta elevación de temperatura es la mínima necesaria para comenzar el proceso de desnaturalización y por ende, es el límite máximo de energía suministrable por el dispositivo para evitar afectar de manera indeseable al analito. Dadas las condiciones del análisis es aceptable determinar tal suministro de energía a través de las propiedades térmicas del agua, que es el componente principal en la solución.

La propiedad intrínseca que nos puede ser útil en esta estimación es la capacidad calorífica volumétrica definida como

$$C_V \equiv \frac{1}{V} \frac{\Delta U}{\Delta T} \quad (6)$$

siendo ΔU la energía suministrada, el ΔT incremento en temperatura y V el volúmen de la solución de analito.

La configuración de tipo capacitor en las terminales del dispositivo determina que la energía almacenada a la cual está expuesto el dsDNA es

$$U = \frac{\epsilon A}{2d} (\Delta V)^2 \quad (7)$$

siendo A el área de la terminal, D el grosor de la película electroconductora, ΔV el voltaje aplicado en las terminales y ϵ la capacidad dieléctrica del material de la misma película, siendo relacionada con la capacidad dieléctrica del vacío ϵ_0 mediante $\epsilon_r \equiv \epsilon/\epsilon_0$.

También es sabido que en la configuración de capacitor, el campo eléctrico E escala con el voltaje aplicado entre las placas del capacitor a través de la relación $E = \Delta V/d$, lo cual es conveniente ya que ΔV es el parámetro manipulado directamente en la experimentación.

Si se considera de las relaciones (6) y (7) que $\Delta U = U$, se tiene que

$$\Delta V = \sqrt{\frac{2V C_V \Delta T}{\epsilon_0 A}} \sqrt{\frac{d}{\epsilon_r}} \quad (8)$$

Dadas las constricciones impuestas en el diseño y en el proceso de desnaturalización, se observa que los únicos parámetros libres son propios de la película dieléctrica, por lo cual la elección del material y las dimensiones de la misma son críticas para no afectar el análisis ha implementar.

En la Figura 17 se muestran algunas estimaciones para distintos materiales candidatos a usarse en el dispositivo. Valores característicos de la permitividad dieléctrica de distintos materiales comunes son tabulados en la Tabla 2.

Material	Permitividad eléctrica ϵ_r
PTFE/Teflon	2.1
Polyethylene/XLPE	2.25
Polyimide	3.4
Polypropylene	2.2-2.36
Mica	3 - 6
Carbon disulfide	2.6
Electroactive polymers	2-12
Silicon dioxide	3.9
Silicon	11.68
Titanium dioxide	86-173
Strontium titanate	310
Barium strontium titanate	500
Barium titanate	1200-10,000 (20-120 °C)
Lead zirconate titanate	500-6000
Calcium copper titanate	>250,000

Tabla 2: Permitividad eléctrica relativa de algunos materiales.

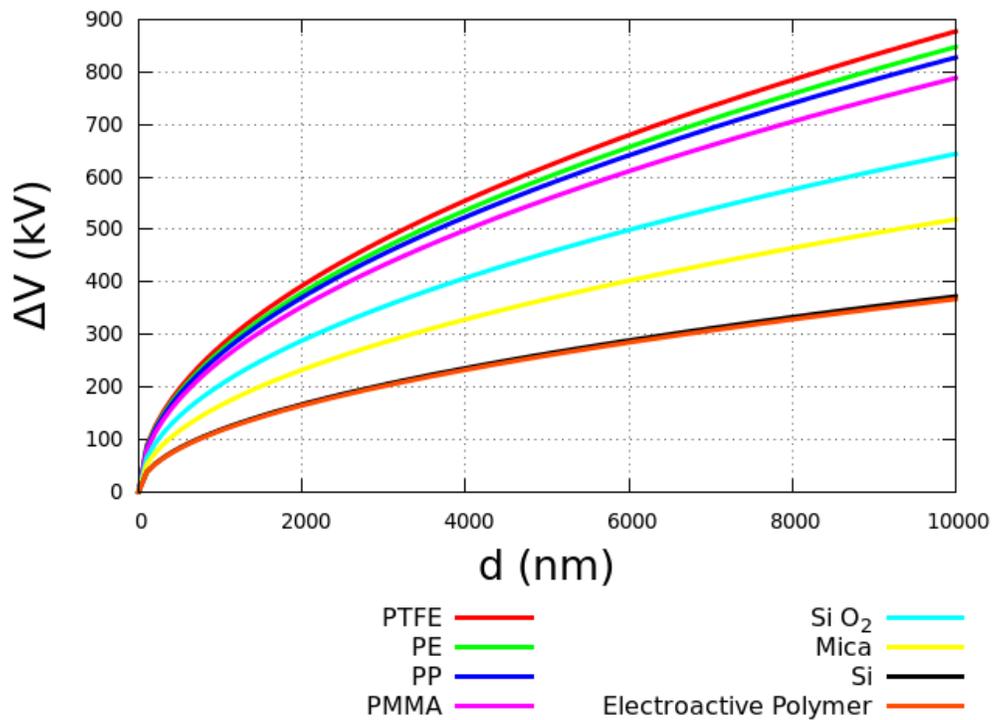


Figura 17: Estimación de los potenciales límite para evitar la desnaturalización del dsDNA en el chip debido al campo eléctrico.

Bajo esta aproximación se aprecia que en el caso de los materiales poliméricos -los cuales son potencialmente aplicables dada su relativa sencillez de manipulación- el voltaje requerido para desnaturalizar el dsDNA es muy alto, por lo que no representan una limitante considerable para el diseño, no obstante existe una posible limitación que debe ser considerada en su momento, esta es la *rigidez dieléctrica* del material.

Material	Rigidez dieléctrica (MV/m)
Helio	0.15
Aire	0.4 - 3.0
Alumina	13.4
Aceite de silicio, Aceite mineral	10 - 15
Benceno	16
Polietileno	18.9 - 21.7
Agua pura	30
Vacío	20 - 40
Teflon	60
Mica	20 - 70
SiO ₂	> 1000
Parafina	13.9

Tabla 3: Rigidez dieléctrico de algunos materiales comunes.

La rigidez dieléctrica $R=V/d$ se define como la relación existente entre el potencial sostenido entre las cargas y la distancia necesaria para que el material pierda su rasgo de aislante y se convierta en un conductor. En la Tabla 3 se muestran algunos valores de diversos materiales. Comparando el voltaje limitado por la desnaturalización y por la rigidez dieléctrica, se puede determinar el valor $d_0=\Delta V/R$ en el cual se separan las regiones en las cuales domina uno o el otro fenómeno. Realizando un cálculo de órdenes de magnitud para determinar tal valor se observa que $d_0\sim 1m$, es decir, ambos efectos son equiparables cuando el grosor de la capa dieléctrica es aproximadamente un metro, lo cual para efectos prácticos resulta irrelevante. De lo anterior se deduce que la principal limitante en la selección del material es la rigidez dieléctrica del mismo.

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

Los experimentos llevados a cabo hasta ahora se han realizado mediante la variación de distintos parámetros: voltajes aplicados, configuración de las terminales en los sustratos, solución iónica y recubrimientos hidrofóbicos en la interface sólido-líquido.

En la literatura se ha abordado el fenómeno del EWOD también mediante la actuación de un voltaje en corriente alterna en la terminal, pero dadas las limitaciones de espacio y las complejidades técnicas en el ensamble de un dispositivo de este tipo (control transistorizado y múltiples fuentes de corriente alterna), se ha evitado su implementación en el desarrollo de este que pretende ser un sistema de análisis compacto y portátil. No obstante se ha dado la aproximación mediante pulsos de DC de manera controlada, como ya también se ha reportado en la literatura.

Observaciones importantes a considerar en el desarrollo experimental de este tipo de dispositivos son las siguientes:

- El uso de soluciones iónicas a base de ácido acrílico son inconvenientes debido a que este es un disolvente de varios polímeros, como el HDPE.
- A partir de la ecuación del electromojado (5) se puede apreciar que al analizar la variación del ángulo θ como función del voltaje V es conveniente elegir un recubrimiento tal que en condiciones de $V=0$, $\theta \approx 180^\circ$ es decir, que la superficie debe ser altamente hidrofóbica para que sea más apreciable la variación al encender el campo en el sustrato. Esta observación implica que $\gamma_s \gg 1$.
- A menor distancia entre la terminal y la gota, será mayor la cantidad de líneas de campo atravesando a esta última por lo que el efecto del campo eléctrico sobre ésta será más evidente. Es decir, una reducción en el grosor del recubrimiento facilitará el control del fenómeno de electromojado, necesiándose un menor voltaje de actuación.
- Debido al grosor de los recubrimientos disponibles (PMMA, HDPE, PTFE, PE, PP) para realizar las pruebas o a la incapacidad de controlarla, resulta conveniente buscar nuevas alternativas, ya que los campos eléctricos requeridos para observar el fenómeno de EWOD son sumamente altos y de especial inconveniencia en la fase de control automatizado del proceso.
- Los métodos de recubrimiento electroaislante empleados no son aún los más optimizados ya que no se cuenta con los mecanismos apropiados para

obtener de manera estandarizada el grosor adecuado del mismo recubrimiento.

- La hidrofobicidad lograda mediante el tratamiento del sustrato con el repelente ha resultado suficiente para observar el fenómeno de electromojado, sin embargo aún es deseable optimizar la superficie con un recubrimiento de mayor hidrofobicidad. Para lograr un mejor resultado, en base a la literatura en reología se sugiere utilizar recubrimientos con ciclopentasiloxano o triclorosilano.

El no tener una superficie del sustrato tratada adecuadamente, complica de manera considerable el controlar el EWOD, dado que si el sustrato no es suficientemente hidrofóbico a pesar de lograr el efecto de mojado, la gota no es capaz de desplazarse sobre la superficie. Adicionalmente si la película que recubre el sustrato es demasiado gruesa, el potencial requerido para observar tal efecto es considerablemente alto, lo cual es un problema en la automatización electrónica del proceso, ya que dadas las dimensiones propias del circuito, se facilita la generación de arcos eléctricos entre las pistas o componentes del mismo circuito. Esta situación se puede evitar mediante la inmersión del sistema eléctrico en un medio electroaislante, pero entonces la manipulación del dispositivo se complica y a pesar de ser portátil ya no es un dispositivo tan amigable para usuarios inexpertos.

Los métodos de fabricación empleados resultan de utilidad pero podría mejorarse. En la literatura [35] se encuentran diversos casos reportados en los que se consiguen recubrimientos con grosores en el rango de 200-700 nm, no obstante dichos métodos no son tan simples de llevar a cabo y son comparablemente costosos. A pesar de las carencias de nuestro método, el objetivo de maquinar dispositivos de bajo coste y fácil portabilidad es alcanzable.

Es de hacerse notar que el camino de experimentación llevado a cabo hasta el momento a ayudado al planteamiento de un proceso -o flujo de trabajo- en la fabricación del dispositivo μ TAS en vías de estandarización:

1. Diseñar el circuito eléctrico mediante alguna técnicas de PCB.
2. Diseñar el área de trabajo del análisis mediante técnica de serigrafía (impresión por apantallamiento o transfer en su defecto).
3. Realizar el recubrimiento del area de trabajo mediante CVD de las películas electroaislante e hidrofóbica.

Durante la realización de este trabajo ocurrieron observaciones inesperadas pero que se podrían explicar mediante la teoría electromagnética con no mucha

complicación. En particular, en el desarrollo de los experimentos se pudo apreciar el efecto de realizar el EWOD sobre una solución iónica en dos casos particulares: con carga neta $Q=0$ y $Q\neq 0$. La sencillez de manipulación de la gota aumenta en tanto la carga neta se aleja del equilibrio electrostático. Esto probablemente se debe a la configuración empleada donde las terminales en el sustrato son puestas a $V_a=1800V$ mientras a la gota ionizada de manera positiva, simultáneamente se le acercaba la terminal negativa de alimentación, creandose un efecto análogo al de las mesas de Hockey con aire, *i.e.*, el sustrato repele a la gota por lo que la fricción se reduce en el contacto de la gota con el sustrato, de manera que el disipamiento de velocidad ocasionado por éste, se reduce drásticamente.

Perspectivas

La cantidad de trabajo a realizar como consecuencia de esta primera etapa de desarrollo del dispositivo es grande. Los problemas técnicos encontrados en cada paso del desarrollo merecen cada uno de una profundización en el entendimiento de ellos. Debe aún perfeccionarse un método estandarizado de deposición de películas electroaislantes e hidrofóbicas. De especial interés resulta el entender el efecto de la carga neta del analito en el proceso de EWOD.

Una etapa que no se experimento en este trabajo pero esta considerado en la parte de diseño del mismo es la integración de un sistema embebido en el chip que permita elevar y controlar la temperatura de la muestra de manera localizada. Por ésto, esa sería una nueva fase obligada en la continuación del dispositivo que se pretende alcanzar.

Una vez demostrada la utilidad del dispositivo, podría extenderse su uso para diagnosticar múltiples condiciones genéticas e infecciones o contaminaciones, generadas por microorganismos de interés médico, agropecuario y/o ambiental.

Acrónimos

ASSURED	Affordable Sensitive Specific User-Friendly Rapid Equipment-Delivered (Suministro de Equipo Amigable al Usuario, Asequible, Sensitivo y Específico)
CNC	Computer Numerical Control (Control numérico computarizado)
CVD	Chemical Vapor Deposition (Deposición química de vapores)
C2CA	Circle-to-Circle Amplification (Amplificación Círculo a Círculo)
DC	Direc Current (Corriente directa)
DMF	Digital Microfluidics (Microfluídico Digital)
DNA	Deoxiribonucleic Acid (Acido desoxiribonucleico)
dsDNA	Double Stranded DNA (DNA de cadena doble)
EWOD Dieléctricos)	ElectroWetting-on-Dielectrics (Electromojado sobre
FET	Field Effect Transistor (Transistor de efecto de campo)
HCR Hibridación)	Hybridization Chain Reactions (Reacción en Cadena de
HDA de la Helicasa)	Helicase Dependent Amplification (Amplificación Dependiente
HDPE	High Density Poli-Ethylane (Polietileno de alta densidad)
HPV	Virus de Papiloma Humano
ICANs Nucleic Acids Quiméricos)	Isothermal and Chimeric Primer-initiated Amplification of (Amplificación de Acidos Nucleicos Iniciadores Isotérmicos y
IC	Integrated Circuits (Circuitos Integrados)
LAMP Mediada por Bucles)	Loop-Mediated Isothermal Amplification (Amplificación

LOC	Lab-on-a-Chip (Laboratorio en un chip)
LOF	Lab-on-a-Foil (Laboratorio en una Hoja)
MFP	Microfluidic Probes (Pruebas microfluídicas)
MOSFET	Metal-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor (Transistor metal-óxido-semiconductor de efecto de campo)
NAD	Nucleic Acid Detection (Detección de Acidos Nucleicos)
NASBA	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (Amplificación Basada en Secuencias de Acidos Nucleicos)
NAT Nucléicos)	Nucleic Acid Technology (Tecnología Basada en Acidos Nucléicos)
NESA	Nicking Endonuclease Signal Amplification (Amplificación por Señal de Mellado de Endonucleasa)
NENNA	Nicking Endonuclease Assisted Nanoparticle Activation (Activación de nanopartículas asistida por Mellado de Endonucleasa) (NENNA)
PCB	Printed Circuit Boards (Placas de circuitos impresos)
PCR Polimerasa)	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PE	Poli-Ethylane (Polietileno)
PMMA	Poly(methyl-methacrylate (Poli-metilmetacrilato)
POC	Point-of-Care (Sitio de Atención)
POCT	Point-of-Care Testing (Pruebas en el Sitio de Atención)
PP	Poly-Propilane (Polipropileno)
PTFE	Polytetrafluoroethylene (Politetrafluoroetileno)
RCA	Rolling Circle Amplification (Amplificación por Círculo Rodante)
RNA	Ribonucleic Acid (Acido Ribonucleico)

RPA	Recombinase Polymerase Amplification (Amplificación por Recombinasa y Polimerasa)
SEC	Solución Electroconductora
SDA	Strand Displacement Amplification (Amplificación por Desplazamiento de Hebras)
SMART	Signal Mediated Amplification of RNA Technology (Amplificación Mediada por Señales de Tecnología RNA)
ssDNA	Single Stranded DNA (DNA de cadena sencilla)
TCL	Triple Contact Line (Linea de contacto triple)
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
μ F	Microfluidic (Microfluídicos)
μ RNA	Micro-Ribonucleic Acid (Microácido Ribonucleico)
μ TAS Totales)	Micro-Total Analysis systems (Microsistemas de Análisis Totales)

Referencias

[1] Mais J. Jebrail, Michael S. Bartsch, and Kamlesh D. Patel. Digital microfluidics: a versatile tool for applications in chemistry, biology and medicine. *Lab on a Chip*, 12, 2012.

[2] Lei Yan, Jie Zhou, Yue Zheng, Roembke Benjamin T. Gamson, Adam S., Shizuka Nakayama, and Herman O. Sintim. Isothermal amplified detection of dna and rna. *Molecular BioSystems*, 10, 2014.

[3] Sakda Jampasa, Wanida Wonsawat, Nadnudda Rodthongkum, Weena Siangproh, Pattamawadee Yanatatsaneejit, Tirayut Vilaivan, and Orawon Chailapakul. Electrochemical detection of human papillomavirus dna type 16 using a pyrrolidinyI peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and bioelectrónica*, 54, 2014.

[4] Jian Chen, Jason Li, and Yu Sun. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab on a chip*, 12, 2012.

[5] Pascal Craw and Wamadeva Balachandran. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*, 12, 2012.

[6] Amir M. Foudeh, Tohid Fatanat Didar, Teodor Veres, and Maryam Tabrizian. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for pointof-care diagnostics. *Lab on a chip*, 12, 2012.

[7] Wei Pang, Hongyuan Zhao, Eun Sok Kim, Hao Zhang, Hongyu Yu, and Hu Xiaotang. Piezoelectric microelectromechanical resonant sensors for chemical and biological detection. *Lab on a chip*, 12, 2012.

[8] Xiaole Mao and Tony Jun Huang. Exploiting mechanical biomarkers in microfluidics. *Lab on a Chip*, 12, 2012.

[9] Xiaole Mao and Tony Jun Huang. Microfluidic diagnostics for the developing world. *Lab on a chip*, 12, 2012.

[10] L. Mahmoudian, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Nilsson, and Y. Baba. Rolling circle amplification and circle-to-circle amplification of a specific gene integrated with electrophoretic analysis on a single chip. *Anal. Chem.*, 80:2483–2490, 2008.

doi: phv10.1021/ac702289j. URL <http://dx.doi.org/10.1021/ac702289j>.

[11] Mark R. Hartman, Roanna C. H. Ruiz, Shogo Hamada, Chuanying Xu, Kenneth G. Yancey, Yan Yu, Wei Han, and Dan Luo. Point-of-care nucleic acid detection using nanotechnology. *Nanoscale*, 5:10141–10154, 2013.

doi:phv10.1039/C3NR04015A. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C3NR04015A>.

[12] Malte Kuhnemund, Daan Witters, Mats Nilsson, and Jeroen Lammertyn. Circle-to-circle amplification on a digital microfluidic chip for amplified single molecule detection. *Lab Chip*, 14:2983–2992, 2014.

doi: phv10.1039/C4LC00348A. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C4LC00348A>.

[13] Maluf Nadim and Williams Kirt. *An Introduction to Microelectromechanical Systems Engineering*. Artech House, 2004.

[14] James D. Watson, Michael Gilman, Jan Witkowski, and Mark Zoller. *Recombinant DNA*. Scientific American Books, 1992.

[15] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2008.

[16] James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine, and Richard Losick. *Molecular Biology of the Gene*. Pearson-Benjamin Cummings, 2004.

[17] Peter J. Asiello and Antje J. Baeumner. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab Chip*, 11:1420–1430, 2011.

doi: phv10.1039/C0LC00666A. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C0LC00666A>.

[18] M. Monsur Ali, Feng Li, Zhiqing Zhang, Kaixiang Zhang, Dong-Ku Kang, James A. Ankrum, X. Chris Le, and Weian Zhao. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem. Soc. Rev.*, 43:3324–3341, 2014.

doi: phv10.1039/C3CS60439J. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C3CS60439J>.

[19] Kae Sato, Atsuki Tachihara, Bjorn Renberg, Kazuma Mawatari, Kiichi Sato, Yuki Tanaka, Jonas Jarvius, Mats Nilsson, and Takehiko Kitamori. Microbead-based rolling circle amplification in a microchip for sensitive dna detection. *Lab Chip*, 10:1262–1266, 2010.

doi: phv10.1039/B927460J. URL <http://dx.doi.org/10.1039/B927460J>.

[20] Longhua Tang, Ying Wang, and Jinghong Li. The graphene/nucleic acid nanobiointerface. *Chem. Soc. Rev.*, 44:6954–6980, 2015.

doi: phv10.1039/C4CS00519H. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00519H>.

[21] Darius G. Rackus, Mohtashim H. Shamsi, and Aaron R. Wheeler. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chem. Soc. Rev.*, 44:5320–5340, 2015.

doi: phv10.1039/C4CS00369A. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00369A>.

[22] Jongho Jeon, Dong-Kwon Lim, and Jwa-Min Nam. Functional nanomaterial-based amplified bio-detection strategies. *J. Mater. Chem.*, 19:2107–2117, 2009.

doi:phv10.1039/B816690K. URL <http://dx.doi.org/10.1039/B816690K>.

[23] Kirby Brian J. *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*. Cambridge University Press, 2010.

[24] Mohammad A. Qasaimeh, Sébastien G. Ricoult, and David Junker. Microfluidic probes for use in life sciences and medicine. *Lab on a chip*, 13, 2013.

[25] Berthier Jean and Brakke Kenneth A. *The Physics of Microdroplets*. Wiley-Scrivener, 2012.

[26] Ya-Pu Zhao and Ying Wang. Fundamentals and applications of electrowetting: A critical review. *Reviews of Adhesion and Adhesives*, 1, 2013.

doi: phv10.7569/RAA.2013.097304.

[27] Frieder Mugele and Jean-Christophe Baret. Electrowetting: from basics to applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17, 2005.

doi: phv10.1088/0953-8984/17/28/R01.

[28] Lautrup B. *Physics of Continuous Matter*. CRC Press, 2011.

[29] Chen-Min Chang, Wen-Hsin Chang, Chih-Hung Wang, Jung-Hao Wang, John D. Mai, and Gwo-Bin Lee. Nucleic acid amplification using microfluidic systems. *Lab Chip*, 13:1225–1242, 2013.

doi: phv10.1039/C3LC41097H. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C3LC41097H>.

[30] P.-A. Auroux, Y. Koc, A. deMello, A. Manz, and P. J. R. Day. Miniaturised nucleic acid analysis. *Lab Chip*, 4:534–546, 2004.

doi: phv10.1039/B408850F. URL <http://dx.doi.org/10.1039/B408850F>.

[31] Jungkyu Kim, Michael Johnson, Parker Hill, and Bruce K. Gale. Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification. *Integr. Biol.*, 1:574–586, 2009.

doi: phv10.1039/B905844C. URL <http://dx.doi.org/10.1039/B905844C>.

[32] Sascha Lutz, Patrick Weber, Max Focke, Bernd Faltin, Jochen Hoffmann, Claas Muller, Daniel Mark, Gunter Roth, Peter Munday, Niall Armes, Olaf Piepenburg, Roland Zengerle, and Felix von Stetten. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (rpa). *Lab Chip*, 10:887–893, 2010.

doi: phv10.1039/B921140C. URL <http://dx.doi.org/10.1039/B921140C>.

[33] Valentino Crespi, Aram Galstyan, and Kristina Lerman. Top-down vs bottom-up methodologies in multi-agent system design. *Autonomous Robots*, 24(3):303–313, 2008. ISSN 1573-7527.

doi: phv10.1007/s10514-007-9080-5. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s10514-007-9080-5>.

[34] Junhong Min, Joon-Ho Kim, Youngsun Lee, Kak Namkoong, Hae-Cheon Im, Han-Nah Kim, Hae-Yeong Kim, Nam Huh, and Young-Rok Kim. Functional integration of dna purification and concentration into a real time micro-pcr chip. *Lab Chip*, 11:259265, 2011.

doi: phv10.1039/C0LC00320D. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C0LC00320D>.

[35] Michael G. Pollack and Richard B Fair. Electrowetting based actuation of liquid droplets for microfluidic applications. *Applied Physics Letters*, 77, 2000.