

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

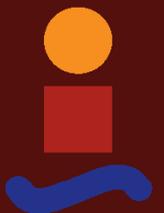
Desarrollo de un termociclador controlado  
electrónicamente para amplificación de ADN usando un  
microcalentador de temperatura fija

Autor: Alejandro Quintero Franco

Tutor: Francisco Perdigones Sánchez

Dpto. Ingeniería Electrónica, Microsistemas  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2020





Trabajo de Fin de Grado  
Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

**Desarrollo de un termociclador controlado  
electrónicamente para amplificación de ADN  
usando un microcalentador de temperatura  
fija**

Autor:

Alejandro Quintero Franco

Tutor:

Francisco Perdigones Sánchez  
Profesor Titular de Universidad

Dpto. Ingeniería Electrónica, Microsistemas  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Universidad de Sevilla  
Sevilla, 2020



Trabajo de Fin de Grado: Desarrollo de un termociclador controlado electrónicamente para  
amplificación de ADN usando un microcalentador de temperatura fija

Autor: Alejandro Quintero Franco

Tutor: Francisco Perdigones Sánchez

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2020

El Secretario del Tribunal



## Agradecimientos

---

Hace 6 años me embarqué en una aventura, una aventura que me ha llevado a mis límites, pero de la que no me arrepiento lo más mínimo. Escribiendo estas líneas la doy por cerrada y me acuerdo de todos aquellos que me han acompañado durante este tiempo.

Gracias a Alejandro Morón, mi fiel escudero. Aquel que conocí el primer día que entré en la escuela y con el que he recorrido este largo camino hombro con hombro. Sin duda mi mayor apoyo dentro de ese edificio rojo en el que hemos pasado tantas y tantas horas. Estoy seguro de que me llevo un amigo para toda la vida.

Gracias a mis amigos, que me han hecho todo más fácil. Por todos esos días en los que me han liberado de todo el estrés que me inundaba evadiéndome de todo. El Ágora purifica.

Gracias a mi familia. A mis abuelos, que tanto se enorgullecen de mí, a mis hermanas, que aunque no lo sepan han sido un gran estímulo y para las que siempre he querido ser un referente, y por supuesto a mis padres, las personas más importantes de mi vida, por su apoyo incondicional después de cada caída y por su aliento cuando más lo necesitaba. Nunca podré agradecerles todo lo que me han dado.

También agradecer a mi tutor Fran, que con su simpatía y sentido del humor me ha hecho sentir en todo momento como en casa, por adaptarse y darme tantas facilidades ante la extraordinaria situación que nos ha tocado vivir.

En definitiva, dar las gracias a todos aquellos que durante este largo camino me han aportado su granito de arena y han colaborado a que hoy dé un paso muy importante en mi vida.

Alejandro Quintero Franco

Sevilla, 2020



## Resumen

---

La reciente pandemia provocada por el COVID-19 ha puesto en boca de todos un término que hasta entonces era desconocido para una gran mayoría de la población, PCR. La crisis sanitaria en la que, parcialmente, aún seguimos inmersos, ha puesto de manifiesto la vital importancia de la microfluídica y del desarrollo de las tecnologías PCB-MEMS para el diagnóstico de enfermedades víricas a nivel mundial.

En este proyecto se hace un repaso de estos conceptos, partiendo de la microfluídica, hasta llegar a nuestro tema de estudio concreto, los dispositivos Lab on PCB para pruebas PCR. Posteriormente, se diseña y desarrolla un termociclador controlado electrónicamente para la amplificación de ADN de muestras de entre 25  $\mu$ l y 50  $\mu$ l, utilizando procesos de fabricación estandarizados y materiales de bajo coste. La extraordinaria situación provocada por el coronavirus nos privó de fabricar el sistema de manera íntegra, pero a nivel de diseño el proyecto se finalizó satisfactoriamente.



## Abstract

---

The recent pandemic caused by COVID-19 has put a term on everyone's lips that until then was unknown to a large majority of the population, PCR. The health crisis in which we are still partially immersed has highlighted the vital importance of microfluidics and the development of PCB-MEMS technologies for the diagnosis of viral diseases worldwide.

In this project, a review of these concepts is made, starting from microfluidics, until we reach our specific study topic, Lab on PCB devices for PCR tests. Subsequently, an electronically controlled thermocycler is designed and developed for DNA amplification of samples between 25  $\mu\text{l}$  and 50  $\mu\text{l}$ , using standardized manufacturing processes and low-cost materials. The extraordinary situation caused by the coronavirus deprived us of manufacturing the system in its entirety, but at the design level, the project was successfully completed.

---

# Índice Abreviado

---

<b>Agradecimientos</b>	<b>vii</b>
<b>Resumen</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>xi</b>
<b>Índice Abreviado</b>	<b>xii</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>xiv</b>
<b>1 Introducción y objetivos</b>	<b>1</b>
<b>2 Estado del arte</b>	<b>6</b>
<b>3 Electrónica del sistema</b>	<b>17</b>
<b>4 Lab On Chip</b>	<b>27</b>
<b>5 Programación del microcontrolador</b>	<b>40</b>
<b>6 Conclusiones y trabajos futuros</b>	<b>46</b>
<b>7 Anexo</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 3.1	Tensión en el punto A y en la salida conforme a la temperatura	20
Tabla 3.2	Tensión en el punto A y en la salida conforme a la temperatura	22
Tabla 3.3	Lista de componentes de la placa eléctrica	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	PCR múltiple para <i>Listeria spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	2
Figura 1.2	Esquema general del proyecto	3
Figura 1.3	Termociclador convencional para pruebas PCR	4
Figura 2.1	Circuito microfluídico de metacrilato	7
Figura 2.2	Dispositivo microfluídico	8
Figura 2.3	Dispositivo Lab on Chip	9
Figura 2.4	Estructura de la plataforma microfluídica	11
Figura 2.5	Esquemático de la plataforma microfluídica	11
Figura 2.6	(a) 3 microcalentadores de cobre integrados en PCB	13
Figura 2.6	(b) Dispositivo PCR de flujo continuo fabricado en PCB con microcalentadores resistivos	13
Figura 2.7	Esquemático de la celda unitaria	13
Figura 2.8	(a) Chip fluídico de poli PMMA (metacrilato de metilo) con 4 cámaras en forma de U	14
Figura 2.8	(b) Fluídico PMMA con 6 cámaras en forma de U	14
Figura 2.8.	(c) Chip fluídico de PMMA en la parte superior de una placa PCB delgada con una capa externa de cobre que homogeneiza la temperatura	14
Figura 2.8	(d) Configuración experimental para mediciones de temperatura durante el termociclado de un chip estático de reacción en cadena de micro polimerasa (microPCR)	14
Figura 2.9	Esquema del diseño de microPCR utilizado para el estudio computacional	14
Figura 2.10	Mercado de los dispositivos microfluídicos entre los años 2013 y 2020	15
Figura 3.1	Circuito de control de temperatura inicial	17
Figura 3.2	Circuito de control de temperatura para 95°C	19
Figura 3.3	Resultados de la simulación para 95°C	20
Figura 3.4	Circuito de control de temperatura para 65°C	21
Figura 3.5	Resultados de la simulación para 65°C	22
Figura 3.6	Circuito del motor paso a paso bipolar con conexión de dos pines	23
Figura 3.7	Esquemático del PCB del control de temperatura y motor	24
Figura 3.8	PCB del control de temperatura y motor en 2D	25
Figura 3.9	Resultado final de la fabricación de la placa electrónica PCB	26
Figura 4.1	Photoplotter	29
Figura 4.2	Diseño en L-Edit del micocanal de 200 $\mu\text{m}$	29
Figura 4.3	Diseño en L-Edit del calentador de 150 $\mu\text{m}$	30
Figura 4.4	Máscara microcanal 100 $\mu\text{m}$	31
Figura 4.5	Máscara microcanal 200 $\mu\text{m}$	31
Figura 4.6	Máscara calentador 150 $\mu\text{m}$	32
Figura 4.7	Máscara calentador 100 $\mu\text{m}$	32
Figura 4.8	Máscara calentador 50 $\mu\text{m}$	32
Figura 4.9	Proceso de fabricación del SU-8	33

---

Figura 4.10	Spin Coater	33
Figura 4.11	Gráfica revoluciones / espesor	33
Figura 4.12	Hot Plate	34
Figura 4.13	Alineadora / Insoladora	34
Figura 4.14	Molde de SU-8 sobre PCB del microcanal de 200 $\mu\text{m}$	35
Figura 4.15	Campana de vacío	36
Figura 4.16	Vertido y curado	36
Figura 4.17	Desmoldado y perforación	37
Figura 4.18	Bonding y curado final	37
Figura 4.19	Máscara del calentador de 150 $\mu\text{m}$	38
Figura 4.20	Calentador de 150 después de la caracterización	38
Figura 4.21	Diseño en L-Edit del microcanal de 500 $\mu\text{m}$	39
Figura 4.22	LOC fabricado en PDMS	39
Figura 4.23	PCB flexible con dos sensores NTC	39
Figura 5.1	Diagrama de bloques de funcionamiento principal	41
Figura 5.2	Sub-diagramas de bloques de funcionamiento	42
Figura 5.3	Simulación del programa en Tinkercad	45



# 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

---

Los dispositivos microfluídicos posibilitan controlar los fluidos y analizarlos a una escala micrométrica, por lo que están revolucionando los campos del análisis químico y biológico. Estos microsistemas, que poseen las ventajas de requerir muestras muy pequeñas, tiempos de respuesta menores y ser portátiles, incorporan las operaciones de ensayo y la preparación de las muestras en un chip. Esto quiere decir, que llevan a cabo las funciones de un equipo de laboratorio convencional. Las aplicaciones existentes para este modelo de microsistemas son ya muy numerosas y abarca desde aplicaciones médicas para examinar fluidos corporales humanos, como sangre u orina, hasta aplicaciones en ingeniería ambiental para observar la concentración de algún contaminante o como un sensor usado en controles de calidad en procesos de producción. [1]

## 1.1 Introducción

El desarrollo de este proyecto de fin de grado se enmarca en el grupo de investigación de Microsistemas, dentro del TIC 109-Grupo de Tecnología Electrónica, perteneciente al departamento de Ingeniería Electrónica. Este es un grupo de investigación consolidado dentro del plan andaluz de investigación de la Junta de Andalucía, cuya calificación en la última evaluación fue de excelente.

Las actividades de investigación que se desarrollan en la línea de investigación de Microsistemas son:

- Diseño de dispositivos y sistemas electrónicos para su aplicación en telemedicina.
- Microsistemas sensoriales, microfluídicos, RF-MEMS y microópticos.

Nuestro proyecto pertenece, más específicamente, a la línea de investigación en aplicaciones biomédicas en dispositivos PCR.

Si hablamos de algunas de las aplicaciones de los dispositivos PCR, podemos, por ejemplo, nombrar su uso para la detección de la listeriosis.

Gracias a los avances en la biotecnología, actualmente somos capaces de desarrollar nuevos métodos para detectar este tipo de microorganismo en alimentos de manera más eficiente, con mayor sensibilidad y disminuyendo los tiempos de detección. Estos métodos rápidos tienen la aptitud de ser altamente específicos y de determinar entre organismos muy parecidos genéticamente. Como es el caso de nuestro tema de estudio, la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), que se utiliza ampliamente como un método rápido de diagnóstico, mediante el cual, además, es posible identificar al mismo tiempo diferentes características genotípicas, como por ejemplo género y especie [2].

Además, la PCR, con su variante múltiple, es una técnica que posibilita determinar la presencia de *Listeria spp.* y verificar la especie de *Listeria monocytogenes* a la par,

reduciendo así el tiempo de detección e incrementando la especificidad del diagnóstico. Además, posee la ventaja de poder amplificar secuencias que codifiquen, por ejemplo, diferentes genes de una misma especie o de diferentes especies a la vez, lo que conlleva reducción del tiempo y del coste de la reacción [3]

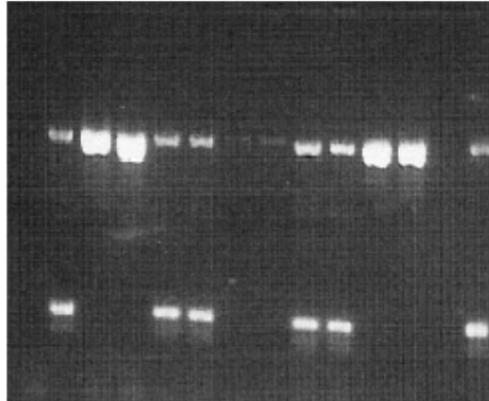


Figura 1.1 PCR múltiple para *Listeria* spp y *Listeria monocytogenes*

Además, otra de las aplicaciones más actuales de estos dispositivos es para el diagnóstico de infección por SARS-CoV-2, el virus que causa la COVID-19, o más conocido coloquialmente como coronavirus, que tanto nos está afectando mundialmente desde hace unos meses.

Las pruebas de PCR, como ya hemos dicho, son una forma bastante fiable de comprobar la existencia de enfermedades infecciosas. Se toman mediante una muestra respiratoria y detectan el ARN del virus, es decir, un fragmento del material genético de un patógeno o microorganismo. Su grado de sensibilidad es alto pero también tienen limitaciones.

La primera es que llevan tiempo, ya que necesitan unas pocas horas para obtener los resultados. Esto implica un límite en la cantidad de pruebas que un solo laboratorio puede llevar a cabo en un día.

Otra limitación es la disponibilidad de reactivos necesarios. La demanda mundial de estas pruebas a raíz de la pandemia ha provocado escasez. La contaminación o la degradación también pueden causar problemas por falsos positivos, cuando alguien no tiene el virus pero la prueba dice que sí lo tiene, o falsos negativos, cuando alguien tiene el virus pero la prueba dice que no lo tiene.

Una última gran limitación de este tipo de pruebas es que solo pueden indicar si alguien tiene el virus en el momento de la prueba. No puede decirnos si ha tenido el virus pero se ha recuperado posteriormente antes de la prueba.

Para esto último, se utilizan los test de detección de anticuerpos, que son mucho más rápidos ya que solo tardan unos 15 minutos en tener el resultado, aunque con una fiabilidad menor a la PCR. Estas pruebas detectan los anticuerpos generados por el sistema inmunitario de nuestro organismo cuando la infección ya ha pasado o nos estamos recuperando.

Normalmente se recomienda utilizarlos de manera complementaria a la PCR, pero en situaciones como esta, en la que se hace necesaria la distribución masiva de pruebas, ambos son de gran ayuda para detectar casos de personas infectadas que no tienen síntomas o los sufren de manera muy leve.

## 1.2 Esquema general del proyecto

Para entender un poco mejor qué queremos hacer en este proyecto, construiremos un pequeño esquema que nos ayude a visualizarlo y comprenderlo.

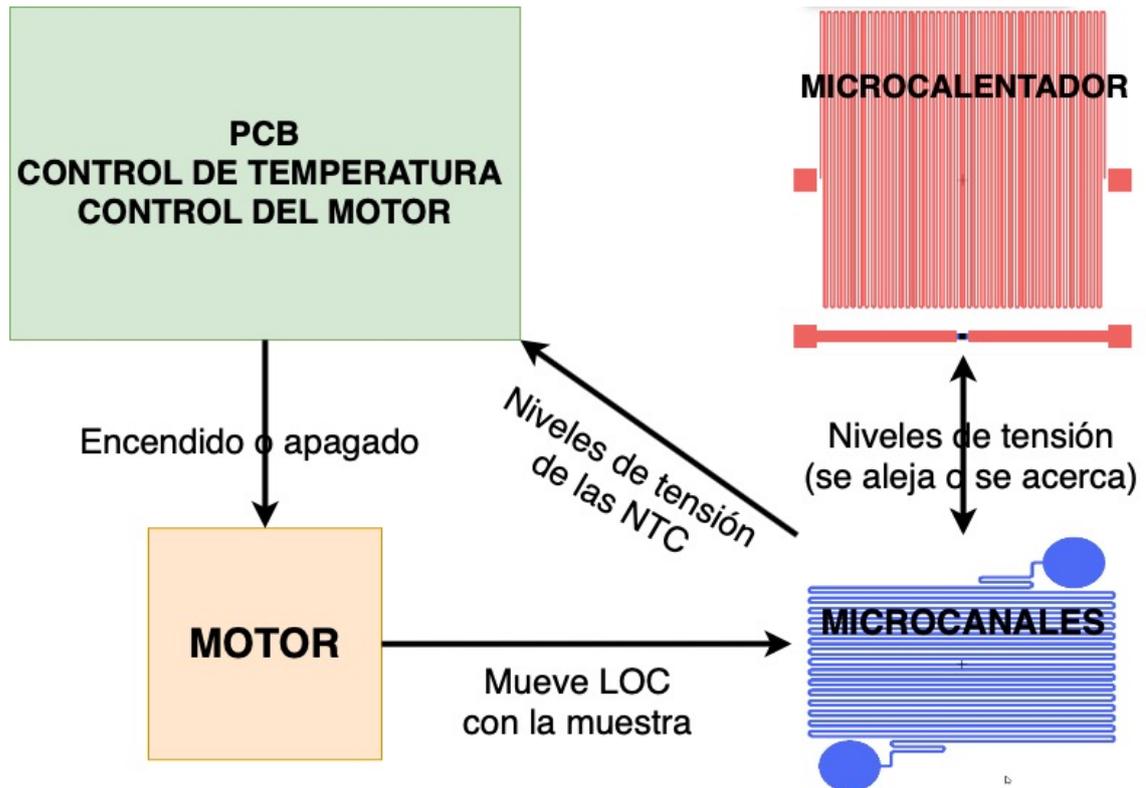


Figura 1.2 Esquema general del proyecto

Básicamente, nuestro proyecto estará formada por un placa electrónica PCB donde estarán integrados los circuitos de control de temperatura y el motor, el motor, los microcanales y el microcalentador.

Este sistema funcionará de la siguiente forma: el microcalentador se alimentará mediante una fuente externa a una temperatura fija de 120°C. La placa PCB leerá los niveles de tensión de unos sensores NTC localizados en el LOC, esta encenderá el motor y este se encargará de mover el LOC con la muestra alejándolo o acercándolo del microcalentador según la temperatura que busquemos.

El sistema pretende imitar el funcionamiento de un termociclador convencional como el de la figura 1.3.

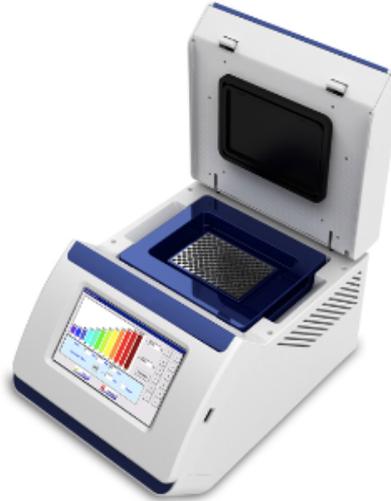


Figura 1.3 Termociclador convencional para pruebas PCR

Desde su descubrimiento estos aparatos pueden tener dos formas de funcionar, la primera y más común es mediante un bloque de resistencia eléctrica. Este se encarga de distribuir la temperatura de manera constante en rangos de tiempo ajustables. Normalmente las temperaturas oscilan entre los 4°C y los 96°C. De esta manera se consigue separar las hebras del ADN necesarias para el estudio.

La otra modalidad es la tecnología Peltier. Esta se refiere a un cambio de temperatura por voltaje eléctrico. Su principal función es generar electricidad que se transforma en temperaturas altas o bajas. Dentro del aparato se encuentran dos semiconductores por juntas de Peltier que hacen el proceso posible. Este método es el preferido por la gran mayoría debido a su eficiencia y precisión con respecto a las muestras y los resultados.

En nuestro proyecto imitaremos la primera propuesta. Un calentador de pistas de cobre a temperatura fija se encargará de calentar la muestra a distintas temperaturas gracias a un motor que moverá el LOC donde se encuentra el fluido, acercándolo o alejándolo del calentador usando rangos de tiempo establecidos.

### 1.3 Objetivo principal

El principal objetivo de este trabajo es el diseño y construcción de un termociclador controlado electrónicamente para amplificación de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando un microcalentador de temperatura fija.

### 1.4 Requisitos y tareas

Los requisitos que de nuestro proyecto serán los siguientes:

- Volumen de la muestra: entre 25  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$
- Temperatura 1:  $65^{\circ}\text{C} \pm 7^{\circ}\text{C}$
- Temperatura 2:  $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Área del metacrilato:  $2 \times 2 \text{ cm}^2$
- Área del PCB: entre  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  y  $2,5 \times 2,5 \text{ cm}^2$
- Sección del microcanal:  $1 \times 1 \text{ mm}^2$

El propósito es realizar dicho ensayo en un dispositivo modular y de tamaño limitado, por lo que sea tenido en cuenta como un dispositivo Lab-on-chip. El dispositivo tendrá dos temperaturas en lugar de tres como suelen tener los termocicladores de ensayos convencionales, aunque la particularidad de nuestro proyecto es que se pueden seleccionar también tres temperaturas.

Las prioridades del dispositivo serán tanto la simplicidad del diseño de este, como que tenga el menor coste posible, usando materiales como cobre, PCB y metacrilato entre otros. Además de los materiales, se buscan también procesos de fabricación estándar. La condición final del trabajo es simplemente que realice la función para la que ha sido construido: la amplificación de muestras de ADN. Para la realización de esto se tienen que establecer unas condiciones y unas tareas asociadas.

Para sacar adelante este proyecto, se comenzaron a realizar las tareas en el siguiente orden:

**Diseño del circuito electrónico para del control de temperatura:** Se realizó la particularización de las resistencias para cada uno de los dos circuitos y la simulación de los resultados, todo mediante Microcap.

**Diseño del Lab-on-PCB:** Lo que envuelve todo lo referido a diseño y fabricación de máscaras del microcalentador y microcanales, incluyendo los sensores NTC.

**Diseño del PCB del motor y control de temperatura:** Incluyendo los circuitos de control anteriores, el motor y el microcontrolador.

**Programación del microcontrolador:** Se encargará del movimiento del motor, encargado de acercar o alejar el fluido del calentador.

**Fabricación del circuito electrónico completo:** Debido a las condiciones extraordinarias que vivimos resultó imposible la fabricación del dispositivo completo.

**Pruebas del dispositivo completo:** Por el mismo motivo anterior, esta última parte también quedó pendiente.

## 2 ESTADO DEL ARTE

---

**E**n este capítulo detallaremos más pausadamente diversos conceptos desde lo más general, la microfluídica, a lo más particular, el Lab-on-PCB para PCR, pasando previamente por los circuitos microfluídicos, Lab-on-Chip y Lab-on-PCB.

### 2.1 Microfluídica

La microfluídica es una tecnología que permite la automatización y multiplexión de equipos de laboratorio, el desarrollo y prueba de fármacos y la generación de dispositivos para diagnósticos *in vitro*, además de buscar escalar y automatizar procedimientos de laboratorio en los campos de la biotecnología y la química [4]. Las minúsculas dimensiones de los canales hacen que se reduzca el consumo de reactivos y que se produzca una menor cantidad de desechos, lo que ahorra gastos y permite que las muestras puedan ser divididas en un mayor número de ensayos. Se pueden replicar reacciones idénticas o ensayos en un solo chip de microfluídica aprovechando un paralelismo y así aumentar el rendimiento, o se pueden integrar varias etapas en un chip complejo para mejorar su facilidad de uso y realizar diagnósticos médicos de manera portátil. Los microcanales también pueden mejorar la velocidad y la precisión de reacciones químicas, así como la velocidad, sensibilidad y repetitibilidad de varios ensayos [5]. Para el uso y fabricación de estos dispositivos microfluídicos se requiere el involucramiento de varias disciplinas de conocimiento. Además tienen muchas aplicaciones en el campo de la medicina, la investigación de biología celular y la cristalización de proteínas.

Dependiendo de los materiales que se utilicen y de los requisitos necesarios para la aplicación a la que sean destinados, el proceso de fabricación de los dispositivos podrá variar. Los primeros dispositivos fueron fabricados por tecnologías desarrolladas por la industria de los semiconductores y de los sistemas electromecánicos (MEMS), utilizando materiales como el silicio y el vidrio. La principal razón de utilizar estos materiales es porque en la industria de la electrónica ya existía el equipo necesario, las técnicas de fabricación establecidas y un amplio conocimiento de cómo realizar los patrones micrométricos. Sin embargo, se empezaron a explorar materiales elastómeros moldeables como el polidimetilsiloxano (PDMS) o el polimetilmetacrilato (PMMA), con los cuales se pueden realizar prototipos rápidos o moldeados por inyección lo cual hace que su fabricación sea más barata [6]. Recientemente, en un intento por disminuir más los costos y explorar en los países en desarrollo se han realizado dispositivos en papel [7].

En este escenario, podemos concluir diciendo que la fabricación de dispositivos microfluídicos están dirigidos en dos direcciones: crear dispositivos baratos y fáciles de fabricar con elastómeros y papel, y por otro lado, desarrollar dispositivos de mayor calidad y resistencia, basados en silicio y vidrio, donde sus costes de fabricación están justificados.

## 2.2 Dispositivos microfluídicos

Un circuito microfluídico básico lo componen los microcanales, a través de los cuales circulan los fluidos, y los puertos de acceso por donde se inyectan y extraen los fluidos. Opcionalmente, también pueden incorporar válvulas y bombas que permitan el movimiento y control de los mismos. El circuito mostrado en la figura 2.1 es una muestra de un dispositivo microfluídico de metacrilato, fabricado durante nuestro proyecto, en el que se distingue claramente los microcanales y los puertos de acceso. En este circuito, las bombas y válvulas pueden aplicarse externamente y no son tema de estudio en este proyecto.



Figura 2.1 Circuito microfluídico de metacrilato

Los circuitos microfluídicos, gracias a las peculiares características que poseen los fluidos a escala micrométrica, presentan novedosos beneficios que pueden ser aplicados en diferentes áreas. Por ejemplo, al reducir el tamaño de los componentes, utilizamos menor volumen de fluidos, es decir, un menor consumo de reactivos. A su vez, esto minimiza costes, permite que pequeñas cantidades de fluidos se exploten aún más y se aminora la producción de desechos. Además, la alta razón superficie - volumen de los pequeños componentes facilita una rápida transferencia de calor, lo que posibilita rápidos cambios de temperatura y el preciso control de ella, lo que nos beneficiará mucho en nuestro trabajo.

Además, debido a las cortas distancias en los dispositivos microfluídicos, el mezclado por difusión es rápido, lo que aumenta la velocidad y la precisión de las reacciones. En los ensayos médicos que se han ido realizando, se han distinguido mejoras como tiempos de medición reducidos, sensibilidad mejorada y selectividad y repetitividad mayores. En los microcanales, el fluido se comporta de manera laminar, lo que permite nuevos procedimientos para llevar a cabo intercambio de solventes y filtrado [8].

Uno de los mayores beneficios de la microfluídica es integrar procesos al fabricar dispositivos con múltiples elementos y funcionalidades. Un chip integrado puede realizar procesos químicos y biológicos desde el principio hasta el fin. Por ejemplo, el muestreo, pre-procesamiento, y medición, que implica un ensayo, llevó al empleo de los términos Lab-On-Chip y Micro Total Analysis System ( $\mu$ TAS) [9]. Realizar todas estas operaciones en un solo chip ahorra tiempo, no es necesario contar con equipos de laboratorios grandes y costosos, y reduce el riesgo de pérdida de muestras o contaminación de las mismas.

En este ejemplo de la figura 2.2, se desarrolla un dispositivo microfluídico de alta densidad que contiene redes de fontanería con miles de válvulas micromecánicas y cientos de cámaras direccionables individualmente. Lo que se intenta en este dispositivo es construir el análogo microfluídico de una matriz de comparación y un dispositivo de almacenamiento de memoria microfluídica cuyo comportamiento se asemeja a la memoria de acceso aleatorio [10].

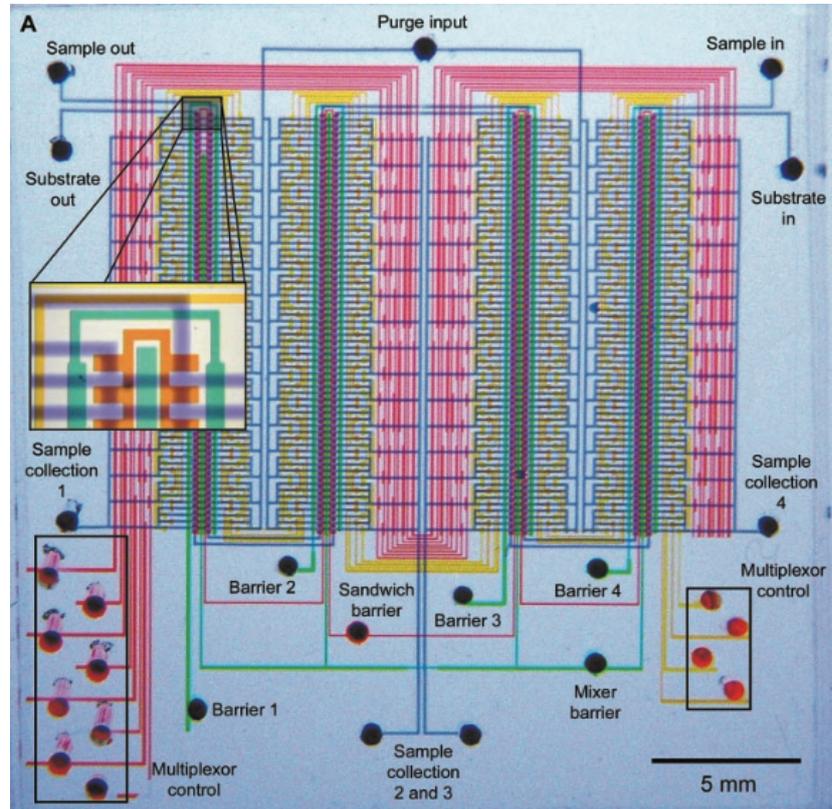


Figura 2.2 Dispositivo microfluídico

Resumiendo, los dispositivos microfluídicos abarcan desde una simple unidad de operación como son mezcladores, separadores, manipulación de partículas, calentamiento, y detección, hasta la incorporación de múltiples unidades de operación formando sistemas complejos conocidos como Lab-on-Chip.

## 2.3 Lab on Chip

Los Lab-on-Chip son dispositivos complejos en el que se integran una o varias funciones de laboratorio. Los Lab-on-Chip pueden llegar a estar formados por millones de nanodispositivos que trabajen de forma conjunta y coordinada para llevar a cabo su función. Son fabricados para que en áreas, que vayan desde unos milímetros a pocos centímetros, se tengan las funciones de un laboratorio en un solo chip con canales, cámaras de difusión, bombas, válvulas y mucho más, con capacidad de manejar volúmenes de fluidos y muestras pequeñas [11]. Es por ello que su desarrollo va en aumento.

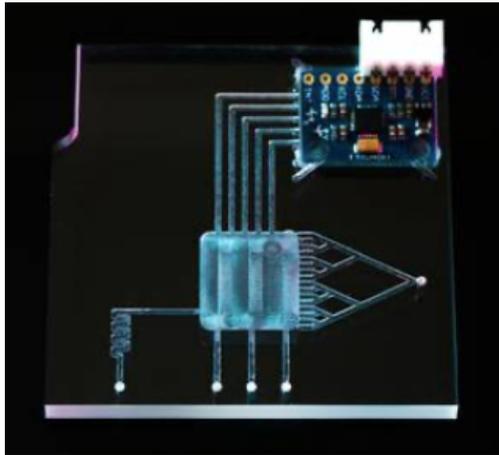


Figura 2.3 Dispositivo Lab-On-Chip

Estas unidades pueden estar compuestas por sistemas microfluídicos, micromecánicos y nanosensores. Son diseñados para manipular volúmenes del orden de los microlitros, nanolitros y hasta picolitros y como interfaces entre la industria médica, la biotecnología, la química y la bioingeniería [12].

Esta reducción en el tamaño hace de este tipo de laboratorio, un dispositivo portátil que facilita el proceso in situ de análisis de muestras de sangre, como en el caso de las ciencias de la salud [13], como también determinar la causa de infecciones.

Las aplicaciones de estos dispositivos son tan amplias como se pueda imaginar, aunque principalmente están orientadas a aplicaciones en medicina para diagnosticar y tratar distintas enfermedades, así como análisis de ADN. Los dispositivos Lab-on-Chip tratan de acercar posturas entre la tecnología microfluídica y la biología molecular.

Los microsistemas Lab-on-Chip presentan nuevas opciones para el control y manejo de células [14], pues son sistemas en los que pueden integrarse componentes fluídicos, ópticos, electrónicos y biológicos [15]. Por ello estos dispositivos han encontrado su espacio en diversos campos de la ciencia, evidenciado en la cantidad de trabajos realizados en las áreas de las ciencias de la salud, farmacéutica y la química [16].

## 2.4 Lab on PCB

La comercialización de dispositivos Lab-on-Chip es actualmente el mayor objetivo dentro de la comunidad de investigación  $\mu$ TAS. Si bien se está demostrando cada vez más una amplia variedad de chips altamente sofisticados que podrían revolucionar la atención médica, la biología, la química y todas las disciplinas relacionadas, muy pocos chips son o pueden ser adoptados por el mercado y llegar a los usuarios finales [17].

El principal factor de inhibición radica en la falta de una tecnología de fabricación comercial establecida. El enfoque de laboratorio en la placa de circuito de laboratorio impreso (Lab-on-PCB), aunque sugerida hace muchos años para la fabricación de microfluídica [18], recientemente ha resurgido como un candidato muy fuerte [19], debido a su potencial de mejora inherente: la industria de PCB, aunque ahora se centra en la electrónica de consumo, está bien establecida en todo el mundo, con instalaciones y procesos de fabricación estandarizados.

Como ya se ha demostrado en varias investigaciones, el enfoque Lab-on-PCB permite una integración perfecta de microfluídica, sensores y electrónica y promete capacidad de ampliación comercial, bajo costo y estandarización de microfluídica [20]. Debido a estas características, los dispositivos Lab-on-PCB pueden ampliarse fácilmente, siempre que se propongan más procesos y prototipos adaptados a la industria de PCB.

Las placas de circuito impreso PCB como plataformas para dispositivos LOC afirman que eliminan la mayoría de los obstáculos impuestos por otros sustratos en la comercialización de dispositivos y sistemas microfluídicos: escalamiento, estandarización e integración a nivel de sistema de dispositivos microfluídicos a un coste mínimo. Estas ventajas se derivan de la explotación de la tecnología de PCB bien establecida, actualmente utilizada de manera rutinaria para la producción en masa de circuitos electrónicos y electrónica de consumo. Por lo tanto, se sugiere que la comunidad microfluídica debería considerar seriamente e investigar más sobre la adaptación a la tecnología de PCB para diversas aplicaciones comerciales en diagnósticos [21].

Tal adaptación a esta tecnología de fabricación facilitaría la estandarización de los componentes microfluídicos, siguiendo el paradigma de la electrónica, y convertiría a los PCB en una plataforma para la integración conveniente del sistema. Se destacarán sus ventajas particulares de aumento de escala, como la producción de bajo coste, las capacidades tecnológicas actuales y el tamaño del mercado de fabricación de PCB en todo el mundo, junto con el interés reavivado en tales dispositivos. La presentación detallada de microfluídicos de laboratorio en PCB ya demostrados,  $\mu$ TAS complejos y biosensores es indicativa de la disponibilidad de esta tecnología para su comercialización y estandarización [22].

### 2.4.1 Plataforma portátil Lab-on-PCB para micromezclado autónomo

Este ejemplo vemos una plataforma portátil Lab-on-PCB de SU-8 que consiste en un sistema de impulsión implementado para micromezclado. El uso de cámaras de aire a presión y microválvulas controladas permite el impulso de muestras para un mezclado autónomo, evitando el uso de bombas externas y mejorando la portabilidad.

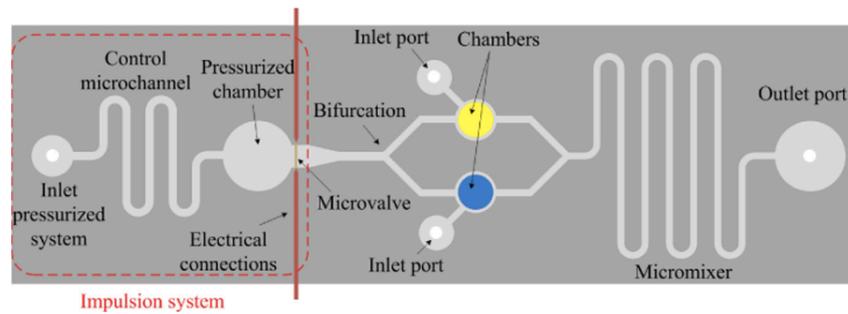


Figura 2.4 Estructura de la plataforma microfluídica

La plataforma está fabricada de FR4 como sustrato de PCB, de cobre para los PADs y los pistas y SU-8 para el circuito microfluídico. La funcionalidad de la plataforma incluye el almacenamiento de presión para propulsar y mezclar fluidos. En adición, este dispositivo es desechable y evita contaminación, por lo que su coste de fabricación es bajo [23].

#### 2.4.1 Lab-Protocol-on-PCB: prototipo de un protocolo de laboratorio en PCB utilizando tecnologías MEMS

En este trabajo de investigación se desarrolla un prototipo portátil de un protocolo de laboratorio mediante la integración de la electrónica, el control y los microfluídicos. El sistema está compuesto por una plataforma microfluídica que se inserta en un dispositivo electrónico, y se fabrica en SU-8 sobre un sustrato de PCB. La plataforma microfluídica implementa el transporte de fluidos, mientras que el módulo electrónico se encarga de la activación, el calentamiento y la interfaz con el usuario. El impulso se basa en la combinación entre las cámaras presurizadas y las válvulas que controlan el paso del fluido.

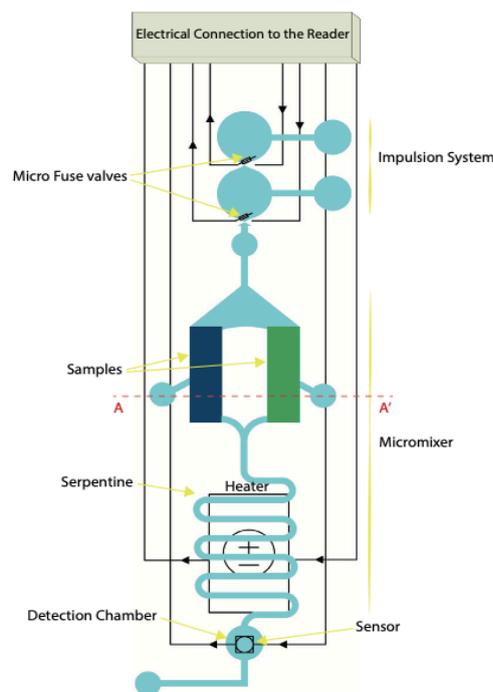


Figura 2.5 Esquema de la plataforma microfluídica

El sistema propuesto es versátil y puede reconfigurarse para diferentes aplicaciones. Este sistema significa una contribución a la integración de protocolos de laboratorio en plataformas portátiles [24].

## **2.5 PCR**

En los últimos años se han explorados los dispositivos microfluídicos basados en placas de circuito impreso PCB como un medio para lograr la estandarización, la integración perfecta y la fabricación a gran escala, allanando así el camino para la comercialización generalizada de prototipos desarrollados.

Ejemplos recientes incluyen la introducción de dispositivos microfluídicos totalmente compatibles con PCB integrados con microcalentadores para lisis celular, extracción de ADN y amplificación [25], así como para la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (PCR) con biosensores electroquímicos integrados basados en PCB y termocicladores [26]. Además, se han desarrollado procesos adaptados a la industria de PCB, no solo para el diseño, sino también para el sellado [27] de microdispositivos extremadamente exigentes para una amplificación rápida de ADN y con bajo consumo de energía, así como la implementación comercial de biosensores electroquímicos basados en PCB fabricados en microsistemas de diagnóstico de ADN [28]. Además, se han introducido dispositivos para procesos posteriores a la amplificación, como la digestión enzimática de ADN [29], mientras que se han desarrollado procesos para funcionalizar materiales relevantes para PCB y mejorar el rendimiento de los dispositivos microfluídicos basados en PCB [30].

El progreso logrado o en desarrollo en los últimos años en microsistemas de diagnóstico basados en PCB ciertamente aplanan el camino para la comercialización de pruebas de diagnóstico basadas en ácido nucleico para enfermedades infecciosas, hasta ahora dominado por PCR realizada en termocicladores convencionales [31].

### **2.5.1 Microdispositivo para amplificación de ADN de flujo continuo, ultrarrápido, de baja potencia, fabricable en PCB.**

Se presenta el diseño y la fabricación de un dispositivo PCR de flujo continuo con un tiempo de amplificación muy corto y bajo consumo de energía. Se utilizan sustratos de PCB de 4 capas disponibles en el mercado, con calentadores micro-resistivos de cobre integrados que se encuentran a muy poca distancia de la red microfluídica, donde tiene lugar la amplificación de ADN.

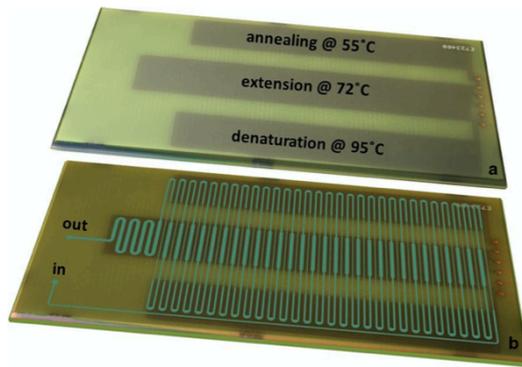


Figura 2.6 (a) 3 microcalentadores de cobre integrados en PCB  
(b) Dispositivo PCR de flujo continuo (no sellado) fabricado en sustrato PCB con microcalentadores resistivos

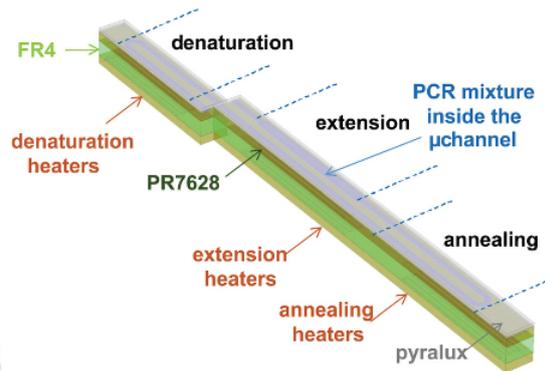


Figura 2.7 Esquemático de la celda unitaria

Los métodos de fabricación propuestos son compatibles con PCB, lo que permite una producción masiva y confiable del dispositivo PCR en la industria de PCB establecida. El chip PCR fue validado con éxito durante la amplificación de dos fragmentos de ADN diferentes. La amplificación exitosa del ADN se demostró en tiempos de reacción totales de hasta 2 minutos, con un consumo de energía de 2.7 W, lo que hace que el PCR presentado sea uno de los dispositivos más rápidos y de menor consumo de energía, adecuado para la implementación en entornos. [32]

## 2.5.2 Termocicladores miniaturizados basados en PCB para amplificación de ADN

En este trabajo, los dispositivos estáticos de reacción en cadena de micropolimerasa (microPCR) que comprenden microcalentadores resistivos integrados en PCB se presentan como termocicladores miniaturizados para una amplificación de ADN eficiente. Su rendimiento se compara con el de los termocicladores convencionales, en términos de eficiencia de amplificación, consumo de energía y duración. Con una eficiencia similar a los termocicladores convencionales, el termociclado miniaturizado a base de PCB logra una amplificación de ADN más rápida, con un consumo de energía significativamente menor. Las simulaciones guían el diseño de tales dispositivos y proponen medios para mejorar aún más su rendimiento.

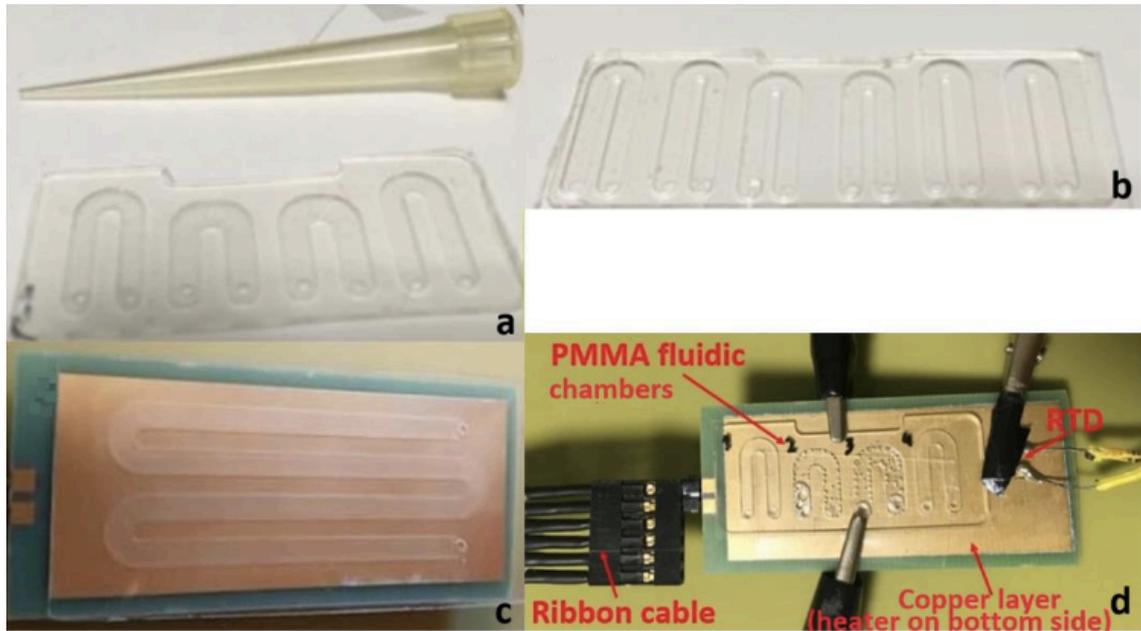


Figura 2.8

- (a) Chip fluídico de poli PMMA (metacrilato de metilo) con 4 cámaras en forma de U
- (b) Fluídico PMMA con 6 cámaras en forma de U
- (c) Chip fluídico de PMMA en la parte superior de una placa PCB delgada con una capa externa de cobre que homogeneiza la temperatura
- (d) Configuración experimental para mediciones de temperatura durante el termociclado de un chip estático de reacción en cadena de micro polimerasa (microPCR)

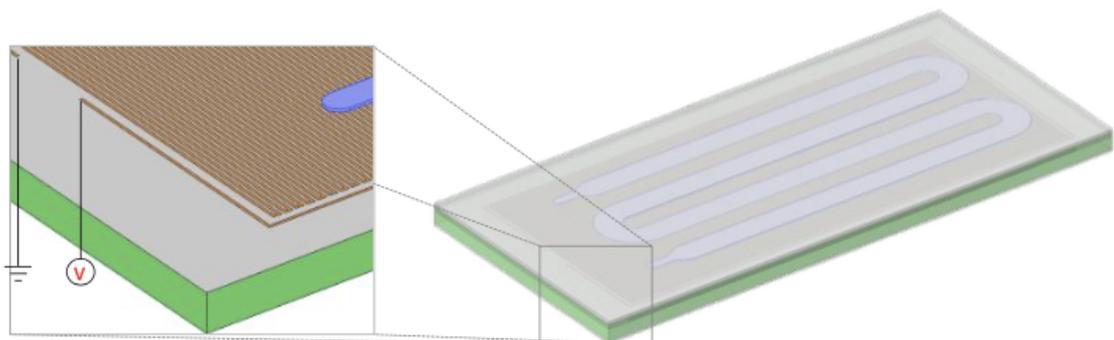


Figura 2.9 Esquema del diseño de microPCR utilizado para el estudio computacional.

La capa de PCB (verde) incorporaba una línea de cobre en forma de meandro (marrón) que funcionaba como un microcalentador. Una capa de PMMA (gris) estaba encima de la capa de PCB e incluía un microcanal que estaba sellado por una capa de poliolefina [33].

## 2.6 Contexto económico

El mercado de los dispositivos de microfluídica crecerá rápidamente debido a una creciente demanda y al rápido retorno de inversión que ayuda a la reducción de los costes y a la miniaturización de los dispositivos de microfluídica. El crecimiento esperado será impulsado principalmente por la investigación farmacéutica y por las aplicaciones "Point of Care" [34]. El número de aplicaciones de patentes para tecnologías de microfluídica ha incrementado aproximadamente de unas 300 por año a casi 4000 por año, lo que indica la rápida adopción de esta tecnología [35].

Actualmente, los dispositivos para microfluídica son ampliamente aceptados en un gran número de aplicaciones. Sin embargo, las ventajas y las motivaciones para adoptar las tecnologías de microfluídica son altamente dependientes de la aplicación a la que van destinadas. Un ejemplo son los dispositivos "Point of Care" cuyo éxito se basa en usar pequeñas cantidades de reactivos, que sean de bajo costo y con una alta sensibilidad. Por el contrario, la ventaja que se presenta al usar estos dispositivos en la industria farmacéutica es que permiten un proceso de automatización y ensayos multiplexados [36].

Los tres segmentos principales del mercado para estos dispositivos son: aplicaciones médicas, diagnósticos in vitro e investigación y producción de aplicaciones. Cada una de estas aplicaciones requiere que se utilice algún material o mezcla de materiales específicos.

El crecimiento de cada una de estas aplicaciones en los últimos años se ubica en tres principales segmentos de aplicación: diagnósticos "Point of Care", diagnósticos clínicos y en la investigación farmacéutica y ciencias de la vida.

Aún siendo una tecnología relativamente nueva, es indudable que la tecnología microfluídica tiene su camino hecho en el mercado. En la figura 2.10 se muestra los resultados de un informe realizado en junio de 2015, donde se ve un amplio crecimiento en el mercado de estos dispositivos en el campo de la biomedicina.

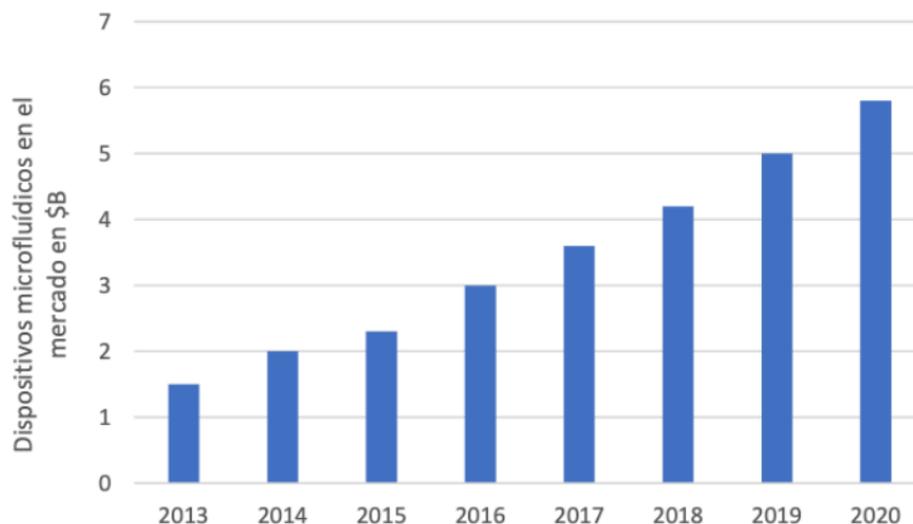


Figura 2.10 Mercado de los dispositivos microfluídicos entre los años 2013 y 2020

Se espera que el mercado mundial de chips de microfluidos crezca a una tasa compuesta anual de aproximadamente 12.4% en los próximos cinco años, alcanzando 5450 millones de dólares en 2024, partiendo de 2700 millones de dólares en 2019. [37]

Particularizando para dispositivos PCR, recientemente se han aprobado subvenciones a proyectos de investigación para paliar los efectos de la pandemia provocada por el coronavirus.

A nivel autonómico, la Junta de Andalucía ha destinado un cuantía de casi 3 millones de euros para el desarrollo de herramientas que ayuden al diagnóstico de la enfermedad y al tratamiento de los pacientes infectados. Este es el caso de los test PCR y test de detección rápidos, gracias a los cuales se detecta el virus incluso entre la población asintomática. [38]

El Gobierno de España, a través del BOE, también ha dedicado en el presupuesto de gasto una cantidad que ronda los 25 millones de euros al instituto de salud Carlos III para proyectos y programas de investigación del virus. [39]

En cuanto a Europa, la Comisión Europea está impulsando la investigación que se necesita con urgencia sobre el coronavirus con 10 millones de euros de su programa de investigación e innovación, Horizonte 2020. [40]

## 3 ELECTRÓNICA DEL SISTEMA

Este capítulo tratará todo lo relacionado con la electrónica de nuestro sistema, es decir, el control de las temperaturas, el control del motor, y el diseño de la placa electrónica PCB donde irán integrados todos los circuitos de control.

### 3.1 Control de temperaturas

En este apartado veremos todo lo que envuelve al control de la temperatura de nuestro trabajo. En primer lugar, realizaremos el diseño de los circuitos de control de temperaturas y a continuación los resultados que cosechan sus respectivas simulaciones.

#### 3.1.1 Diseño y simulación de circuitos

Nuestro objetivo será el diseño del circuito electrónico con el fin de controlar la temperatura. Para ello, partimos de este circuito sin particularizar dibujado en Microcap. El circuito sería el siguiente:

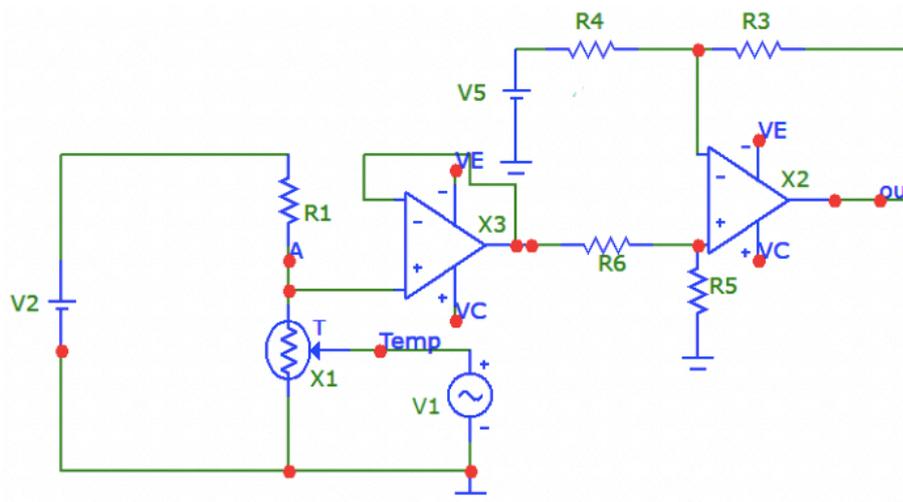


Figura 3.1 Circuito de control de temperatura sin particularizar

Desglosando el circuito por partes, de izquierda a derecha, primero observamos un divisor resistivo que está alimentado por una tensión de referencia a 5 V. Diferenciamos una resistencia fija que está conectada a dicha alimentación y a continuación el punto A. La particularidad de la NTC es que varía su valor de resistencia con respecto a la temperatura según nos indica la fórmula:

$$V_A = \frac{R_{NTC}}{R_{NTC} + R_1} \cdot V_2$$

La NTC la encontramos justo debajo del punto A. Para la simulación de la variación de temperatura que se realizará en el circuito real, se usa una fuente de tensión sinusoidal V1 con una Macro, en la cual el valor de la corriente continua se corresponde con la temperatura a la que está la NTC.

Una vez tenemos la tensión variable VA según la temperatura, tenemos que adaptar el rango de tensiones para que sea apta a la entrada del microcontrolador. Para esto, usamos un amplificador operacional OA, concretamente un amplificador diferencial. También debemos intentar evitar al máximo las pérdidas de corriente por lo que utilizamos otro amplificador operacional conectado al punto A para que funcione como seguidor de tensión. Así, el circuito a la derecha del punto A está aislado del seguidor de tensión, logrando una fiable relación entre los niveles de tensión y la temperatura de la NTC.

A continuación, nos encontramos con el circuito de amplificación. Este recibirá la tensión del punto A y amplificará la señal según la fórmula:

$$V_{out} = \frac{\frac{R_3}{R_4} \left(1 + \frac{R_4}{R_3}\right)}{1 + \frac{R_6}{R_5}} \cdot (V_A - V_5)$$

$$\text{Si } R_3 = R_5 \text{ y } R_4 = R_6$$

$$V_{out} = \frac{R_3}{R_4} \cdot (V_A - V_5)$$

Ya que tenemos que controlar a 65°C y 95°C, esta señal de salida se conecta a un pin de entrada de nuestro microcontrolador para cada circuito.

### 3.1.2 Método resolutivo

Para el diseño y particularización de los circuitos de control de temperatura a 65°C y 95°C llevaremos el cabo el siguiente procedimiento:

1. Determinar el valor de  $R_1$  para que la fuente de tensión  $V_5$  esté prefijada en el circuito
2. Determinar el valor de las resistencias para los casos extremos  $T_{\max}$  y  $T_{\min}$
3. Hallar  $V_{A\max}$  y  $V_{A\min}$  en función de  $R_1$
4. Fijar la tensión  $V_5$  en la fórmula del amplificador
5. Adaptar la señal:
  - $V_{out} = 0$  para  $V_{A\min}$
  - $V_{out} = 4'5$  para  $V_{A\max}$
6. Resolver sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas,  $R_1$  y  $\frac{R_3}{R_4}$

Para llevar a cabo este procedimiento usaremos las fórmulas:

$$R_{NTC}(T) = R_0 \cdot e^{\beta \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} \quad V_A = \frac{R_{NTC}}{R_{NTC} + R_1} \cdot V_2 \quad V_{out} = \frac{R_3}{R_4} \cdot (V_A - V_5)$$

$$R_0 = 10k \text{ y } \beta = 3380$$

### 3.1.3 Diseño para 95°C

Para el diseño del circuito de control de temperaturas a 95°C comenzaremos fijando en la DC de la fuente sinusoidal V1 el valor de la temperatura deseada. A su vez, introduciremos en la amplitud una tolerancia de  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Fijamos para las fuentes V2 y V5 un valor de 5 V y 3.3 V respectivamente. Finalmente, resolveremos el circuito siguiendo el método resolutivo descrito en el apartado anterior quedando de la siguiente forma:

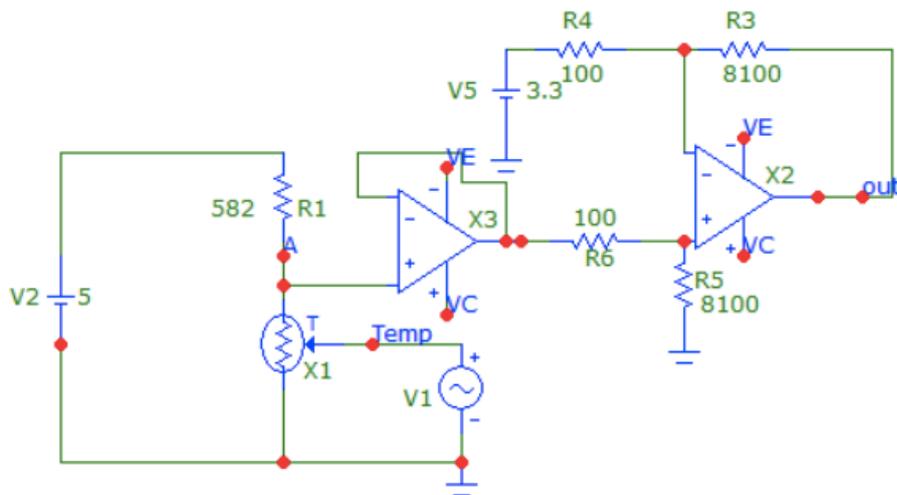


Figura 3.2 Circuito de control de temperatura para 95°C

Se han tenido en cuenta el valor de las resistencias comerciales para que a la hora del montaje del circuito se utilicen el mínimo número de resistencias posibles.

Realizando la simulación para esta configuración del circuito obtenemos estos resultados:

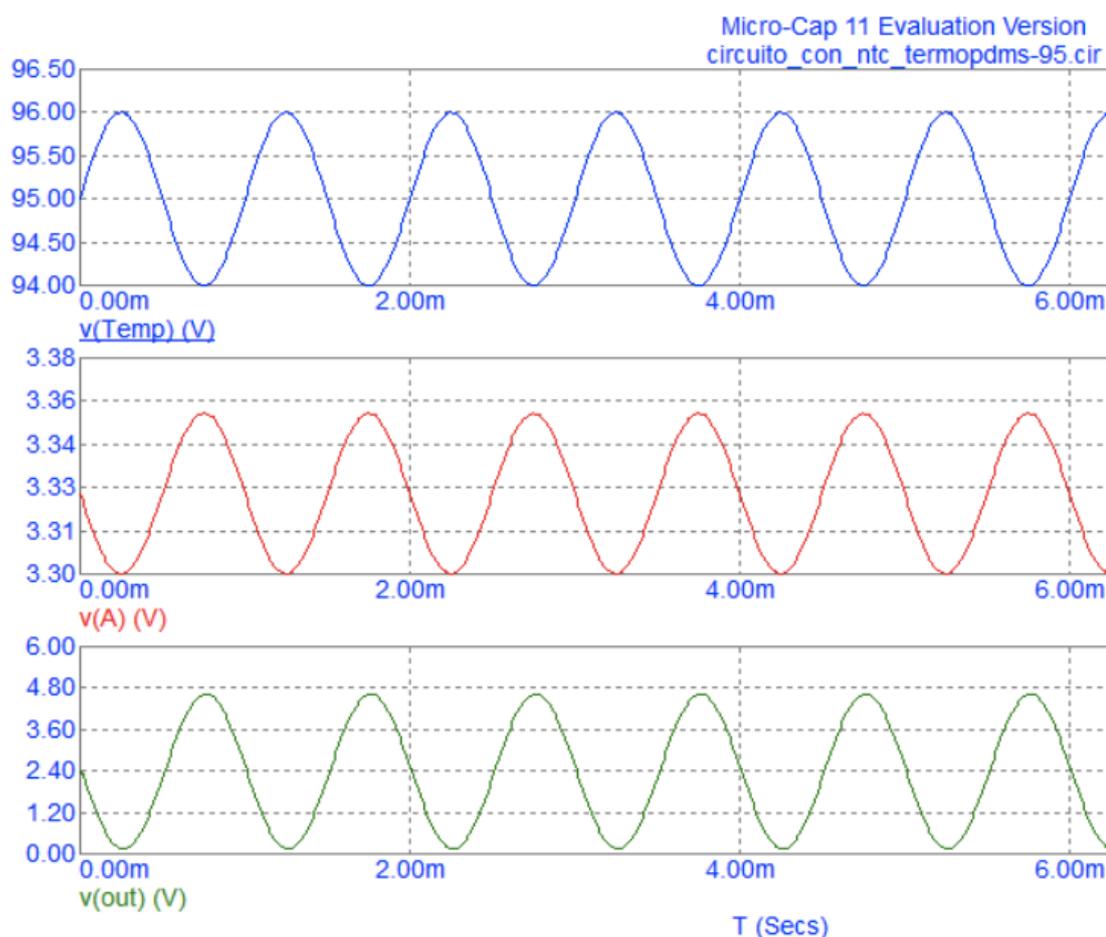


Figura 3.3 Resultados de la simulación para 95°C

Temperatura	$V_A$	$V_{\text{out}}$
96°C	3'33	0'137
95°C	3'33	2'384
94°C	3'356	4'616

Tabla 3.1 Tensión en el punto A y en la salida conforme a la temperatura

Si llevamos al límite nuestro rango de tensión, podemos saber hasta qué temperaturas se podría medir. Fijando una tensión de salida de 5V, obtenemos una temperatura ligeramente inferior a 94°C, concretamente 93'78°C. De igual manera, para una tensión de salida exacta de 0V, la temperatura será prácticamente idéntica a 96°C, ya que la diferencia de tensión es minúscula, así obtenemos una temperatura de 96'007°C.

### 3.1.4 Diseño para 65°C

Para el diseño del circuito de 65°C seguiremos el mismo procedimiento. Introducimos la temperatura en la DC de V1, colocamos en la amplitud una tolerancia, en este caso, de  $\pm 7^\circ\text{C}$ . Fijamos los mismos valores para las fuentes V2 y V5, y resolvemos el circuito siguiendo el mismo método resolutivo:

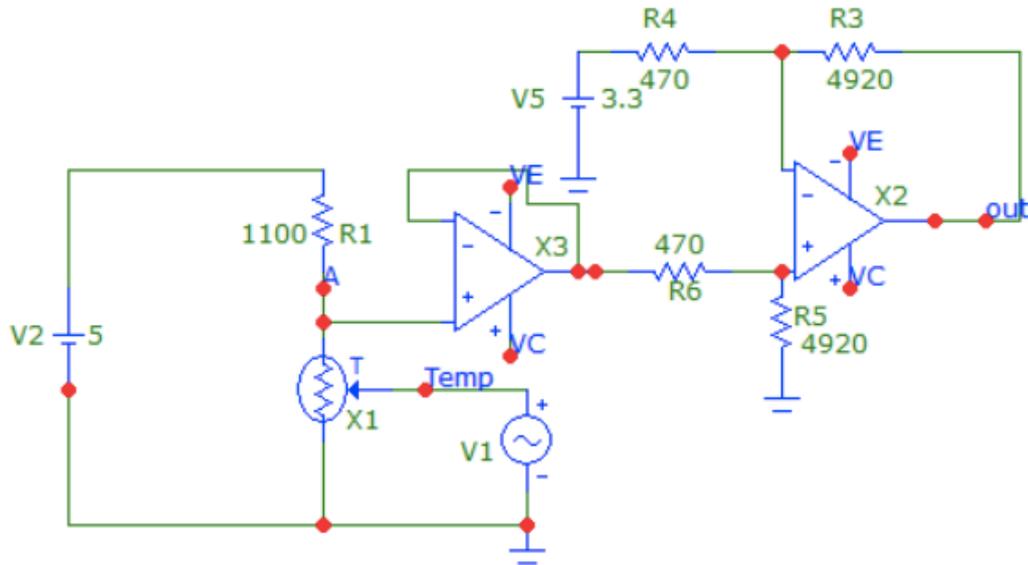


Figura 3.4 Circuito de control de temperatura para 65°C

También se tuvieron en cuenta el valor de las resistencias comerciales para simplificar al máximo su montaje. La simulación de este circuito queda la siguiente manera:

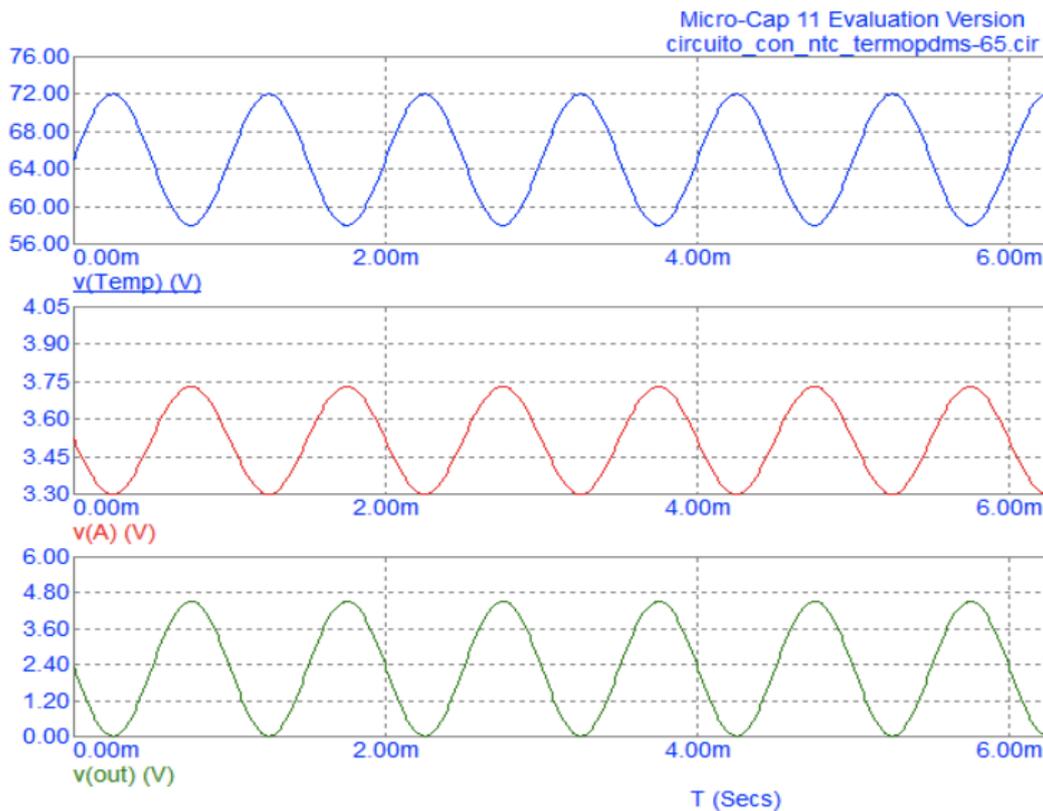


Figura 3.5 Resultados de la simulación para 65°C

Temperatura	V <sub>A</sub>	V <sub>out</sub>
72°C	3'30	0'019
65°C	3'52	2'288
58°C	3'73	4'517

Tabla 3.2 Tensión en el punto A y en la salida conforme a la temperatura

Al igual que en el circuito anterior, aquí también llevamos al límite nuestro rango de tensión para saber qué temperaturas se alcanzan. Fijando la tensión de salida de 5V, se obtiene una temperatura de 56'36°C. La tensión para 72°C ya es prácticamente 0, por lo que no habrá una diferencia notable de temperatura, obtenemos así un valor de 72'008°C.

## 3.2 Control del motor

Con respecto al motor, queremos controlar un motor paso a paso bipolar mediante Arduino. En particular, utilizamos este motor de conexión de dos pines con el integrado L293D de la figura 3.6 que es el más común. De esta manera, solo tenemos que usar dos pines de control e invertirlos. Para esto se encuentran los transistores NPN, que trabajan como un inversor de señal.

De este modo, usaremos solo dos pines de Arduino y con los dos transistores NPN en modo inversor obtendremos los cuatro pines de control necesarios para atacar el integrado L293D.

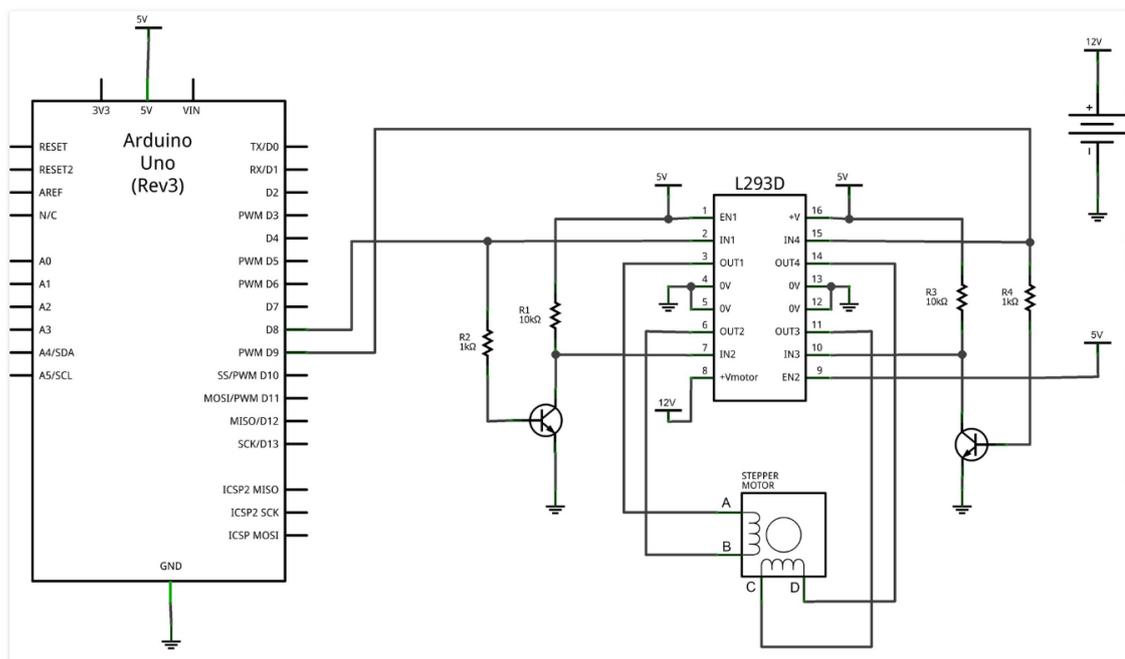


Figura 3.6 Circuito del motor paso a paso bipolar con conexión de dos pines

### 3.3 Diseño y fabricación de la placa electrónica PCB

El siguiente paso será el diseño de la placa electrónica PCB donde estarán integrados tanto los dos circuitos de control a temperatura a 65°C y 95°C, como el motor encargado de mover el LOC con el líquido. Para ello utilizamos KiCad, un software CAD de diseño de PCB.

Vamos a diseñar la placa para que se le pueda acoplar el arduino MEGA. Para ello, abrimos KiCad, abrimos un nuevo proyecto y elegimos la opción “desde plantilla” y seleccionamos “MEGA”. A continuación, abrimos el esquemático y comenzamos a añadir componentes.

Hemos de tener en cuenta la identificación de pines de Arduino Mega para no liar pines de control de temperatura con los del motor. Cada uno ha de tener sus propios pines. Las salidas de arduino que vayan conectadas al motor L293D son digitales, sin embargo, las NTC van conectadas a los pines analógicos.

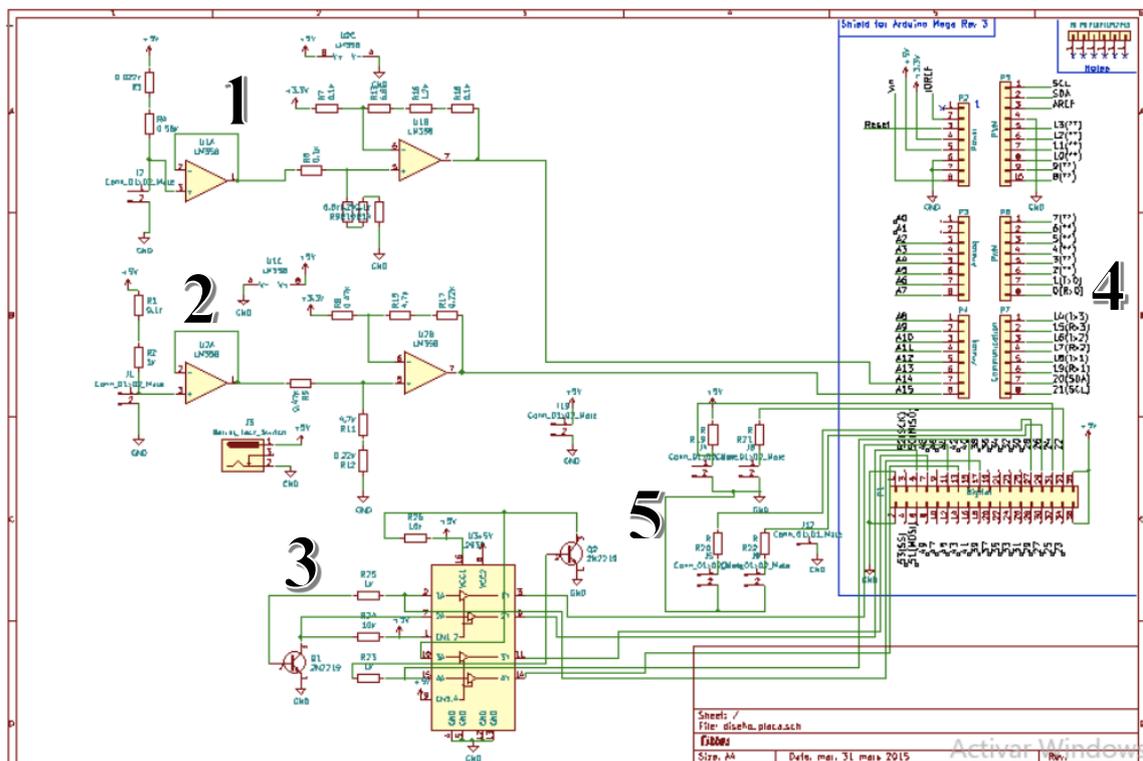


Figura 3.7 Esquemático del PCB de control de temperatura y motor

1. Circuito de control de temperatura a 95°C
2. Circuito de control de temperatura a 65°C
3. Motor L293D
4. Pines de Arduino MEGA
5. Pulsador y LED

Tras el diseño del esquemático, pasaremos al diseño del PCB. El resultado del diseño final del PCB utilizando el mismo software es el siguiente:

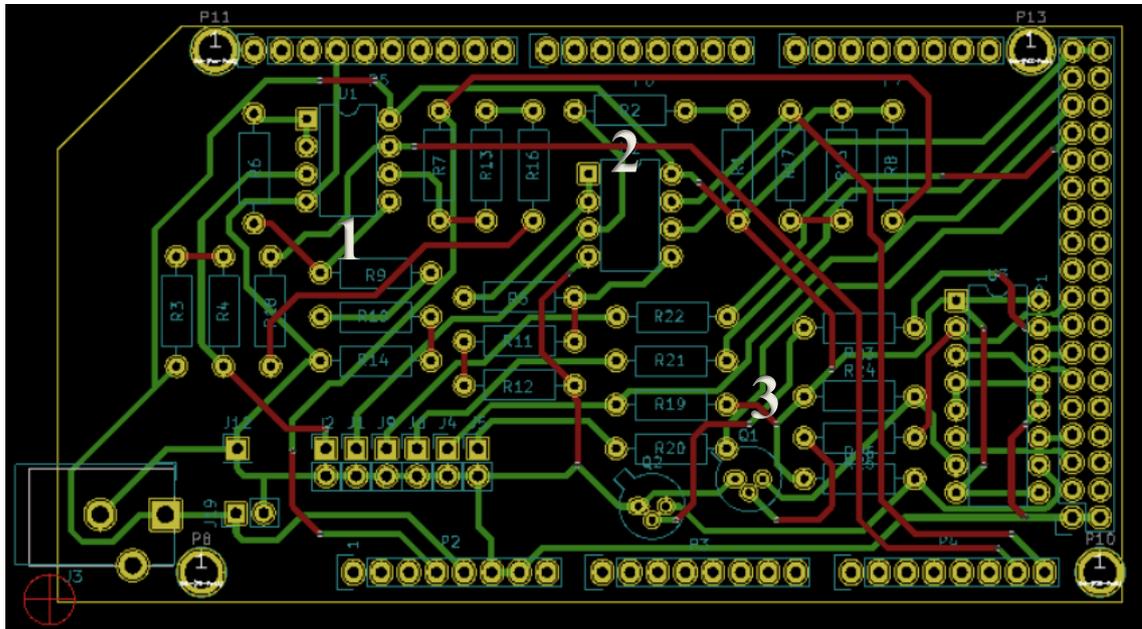


Figura 3.8 PCB de control de temperatura y motor en 2D

A la hora de rutar, debemos tener en cuenta que se suelda por debajo de la placa, y por tanto, todo lo que se vaya a soldar debe estar asociado a una pista verde. En caso contrario, pista roja, el componente tapa el PAD y es imposible soldarlo. Sólo se podrá en el caso de las resistencias y transistores, que se pueden soldar tanto por arriba como por debajo. Esto se debe a que las pistas en verde representan la capa de abajo y las pistas rojas la capa de arriba. En las zonas que no sea posible acceder mediante una pista verde, se utilizarán vías, que hacen de conexiones entre la capa de arriba y de abajo del PCB.

Habrá que evitar poner pistas que formen un ángulo de  $90^\circ$ , preferiblemente poniéndolas a  $45^\circ$  con el fin de eludir problemas en la fabricación. Las pistas tendrán un grosor de  $0,6$  mm.

Los integrados 1 y 2 representan los amplificadores operacionales de los circuitos de control de temperatura. A su alrededor se encuentran las resistencias que van conectadas a estos particularizando cada circuito a  $65^\circ\text{C}$  y  $95^\circ\text{C}$  respectivamente. El conjunto 3 es el del motor L293D compuesto por un integrado al que van conectadas varias las resistencias y los transistores Q1 y Q2.

La lista de componentes de nuestra placa electrónica PCB de control de temperatura y el motor es la siguiente:

LISTA DE COMPONENTES PLACA ELECTRÓNICA	
Componentes	Unidades
Amplificador Operacional LM358	4
Transistor NPN 2N2222A	2
Resistencias	26
Integrado L293D	1

Tabla 3.3 Lista de componentes de la placa eléctrica

Debido a la situación extraordinaria causada por el coronavirus, no pudimos fabricar la placa PCB en el laboratorio de la escuela. Ante esto, se mandó fabricar a JLCPCB, la empresa de prototipos PCB más grande en China, cuyo resultado fue este:

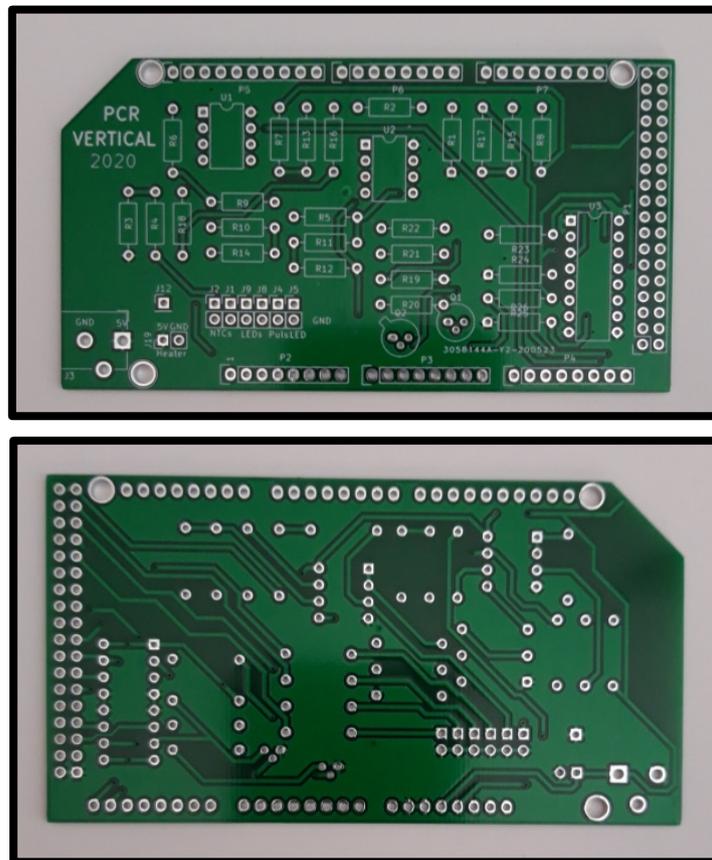


Figura 3.9 Resultado final de la fabricación de la placa electrónica PCB

## 4 LAB ON CHIP

**E**n este capítulo nos pararemos a ver todo lo correspondiente a lo necesario para fabricar el LOC donde estará ubicada nuestra muestra de ADN a analizar.

Estudiaremos todos los materiales indispensables utilizados para fabricar el LOC, detallando las propiedades de los mismos que justificarán su uso; el diseño y fabricación de las máscaras necesarias y los procesos de fabricación del SU-8 y PDMS, especificando los pasos y los instrumentos empleados en cada uno de ellos.

### 4.1 Materiales utilizados

Para la fabricación del Lab On Chip manejaremos múltiples materiales, entre los que distinguiremos PCB rígido y flexible, SU-8, PDMS y metacrilato. La idea es hacer el molde de SU-8 sobre el PCB rígido para posteriormente fabricar el LOC de PDMS. Por otra parte, también podremos fabricar el LOC de metacrilato utilizando una fresadora para obtener una alta precisión y cubrirlo de PCB flexible.

#### 4.1.1 PCB

Las PCBs son placas de sustrato no conductor que se utilizan para montar e interconectar componentes electrónicos mediante rutas o pistas de un material conductor grabadas sobre el sustrato. Todo esto supone una serie de ventajas sobre otros tipos de placas, a las que además podemos añadir:

- Tamaño reducido.
- Bajo coste.
- Alto nivel de repetibilidad y uniformidad de las características eléctricas.
- Fácil identificación y mantenimiento
- Circuitos impresos eliminan la probabilidad de error

La mayoría de la gente asocia el término PCB a una placa rígida, sin embargo, puede referirse a una PCB rígida o flexible. Los PCB flexibles son más conocidos con el nombre de circuitos flexibles, tableros flexibles o placas base impresas flexibles. Como su propio nombre indica, la diferencia entre ellos es que estos pueden ser moldeados, doblados, plegados o retorcidos en arreglos ilimitados.

#### 4.1.2 SU-8

El SU-8 es una fotorresina epoxy negativa diseñada para la realización de estructuras en MEMS. Negativa se refiere a una resina fotosensible por lo que las partes expuestas a luz ultravioleta (UV) convertido reticulado, mientras que el resto de la película permanece soluble y se puede lavar durante el desarrollo [41]. Entre las características que lo hacen apropiado para los microsistemas podemos destacar:

- Buenas propiedades mecánicas y químicas.
- Buena adhesión al cobre y FR4.
- Amplia gamas de espesores: desde 750 nm hasta 500  $\mu\text{m}$  o más.
- Alta relación de aspecto: 10:1 y mayor.
- Es biocompatible.
- De bajo coste.
- Es hidrófobo.
- Es transparente, lo que supone un aspecto importante para usos microfluídicos ya que podemos observar la evolución de los fluidos.

### 4.1.3 PDMS

El polidimetilsiloxano (PDMS) pertenece a un grupo de compuestos orgánicos de silicio poliméricos que se conoce comúnmente como siliconas. El PDMS es el polímero orgánico basado en silicona más utilizado y es muy usado en MEMS para la realización de sistemas microfluídicos. Entre sus características principales podemos remarcar su hidrofobia, biocompatibilidad, transparencia y bajo coste. [42]

- No suele ser fotosensible.
- Se comporta como un material elástico.
- Transparente a frecuencias ópticas y con baja autofluorescencia.
- Buenas propiedades químicas: estable, hidrófobo, oxidación por plasma.
- Biocompatible.
- De bajo coste.

### 4.1.3 Metacrilato (PMMA)

El metacrilato (PMMA) es un material plástico constituido por polímeros del metacrilato de metilo, un éster del ácido metacrilato. Es una alternativa óptima al vidrio y es por ello que se conoce también como vidrio acrílico, con la diferencia de que es muy difícil de romper, muy flexible y más transparente. Sus mayores inconvenientes es su facilidad para arañarse y atraer el polvo.

## 4.2 Diseño y fabricación de máscaras

La mayor parte del proceso de fabricación está basado en el uso de resinas fotosensibles para la creación de estructuras mediante máscaras. Estas máscaras se usan para el diseño del PCB y de las estructuras de SU-8. Están fabricadas usando un Photoplotter, como el de la figura 4.1, con películas sensibles en el rango de la luz roja (670nm). La resolución alcanzada es de 508 x 8000 pp (puntos por pulgada) hasta 8192 x 8000 ppp. La resolución del photoplotter es más que suficiente para las dimensiones de nuestro diseño.



Figura 4.1 Photoplotter

### 4.2.1 Diseño

Para el diseño de las máscaras se utilizó el programa L-Edit, un software CAD dedicado a la creación de layouts.

Para nuestro proyecto realizamos el diseño de 3 máscaras de microcanales distintas. Una de ellas de 500  $\mu\text{m}$  con capacidad para almacenar 50  $\mu\text{l}$  y otras dos con capacidad de almacenamiento de 25  $\mu\text{l}$  de 100 y 200  $\mu\text{m}$ .

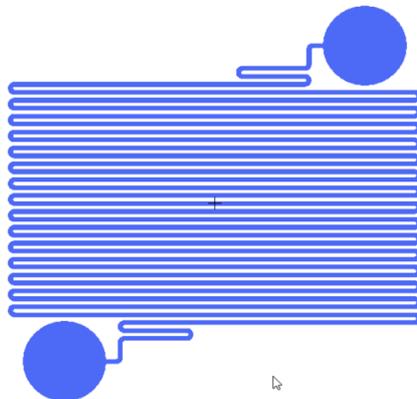


Figura 4.2 Diseño en L-Edit del microcanal de 200  $\mu\text{m}$

La figura es una captura de una máscara tomada directamente desde el programa L-Edit. Se trata del microcanal de 200  $\mu\text{m}$  de espesor y 200  $\mu\text{m}$  de separación entre microcanales. Nuestro microcanal estará compuesto por dos sencillas partes: dos agujeros de entrada y salida por donde se introducirá el fluido y un serpentín donde se almacenará el mismo. Las cámaras de entrada y salida son circulares y de 4 mm de diámetro y es por donde se introduce y se extrae la muestra a analizar.

Con respecto al calentador, se diseñaron tres máscaras, con pistas de 50, 100 y 150  $\mu\text{m}$  de espesor, aunque finalmente nos quedamos con el de 150  $\mu\text{m}$ . La figura 4.3 muestra el diseño final del calentador detallando sus partes:

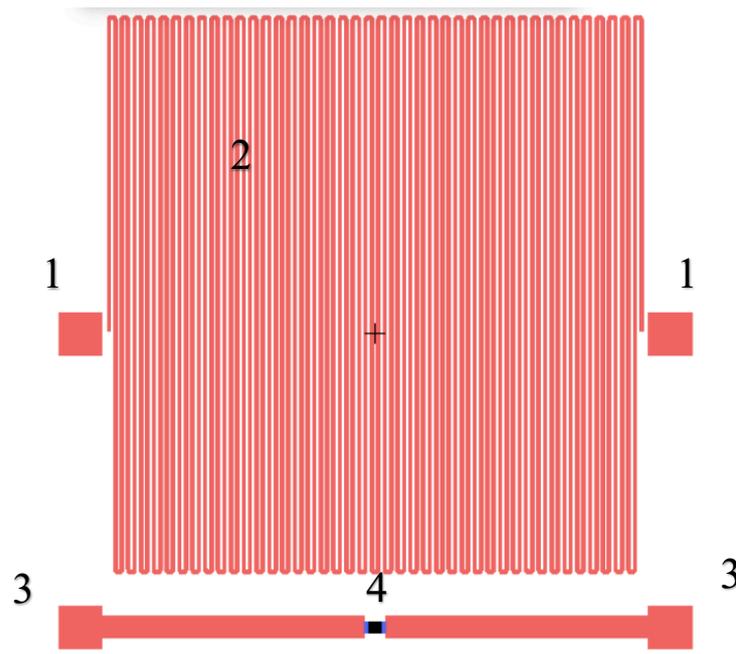


Figura 4.3 Diseño en L-Edit del calentador

1. PADs de conexión para inyectar corriente a las pistas del calentador.
2. Pistas de 150  $\mu\text{m}$  de espesor y 150  $\mu\text{m}$  de separación
3. PADs de conexión para medir temperatura de la NTC.
4. Huella de la NTC, de encapsulado SMD 0402.

#### 4.2.2 Fabricación

Una vez realizado el diseño de las máscaras se procederá a la fabricación de las mismas. Para ello utilizaremos el anteriormente nombrado photoplotter. Para exportar e imprimir el diseño en PDF existe un método para cada programa. Para nuestro caso, el L-Edit, una vez finalizado el diseño de

la máscara, el procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Realizar el camino: File -> Export Mask Data -> GDSII -> Export
2. Abrir LinkCAD y pasar el archivo a la extensión .gbr.
3. Abrir Convert Gerber into bitmap, pulsar en Import y seleccionar el archivo que acabamos de exportar. Lo abrimos y se ajusta el diseño a la esquina superior.
4. En Run Photo USB, seleccionamos la resolución y polaridad, y una vez colocado el fotolito en el Photoplotter, todo esto a oscuras con apenas una tenue luz verde, clicamos en Plot.

Este proceso tardará entre 30 y 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se sacarán los fotolitos y se procederá a su revelado. Esta parte también la tendremos que realizar con luz verde. Sumergiremos el fotolito durante 50 segundos en el revelador, seguidamente 50 segundos en agua, 2 minutos en fijador y finalmente 1 minuto en agua. Una vez terminado, dejaremos secar a temperatura ambiente.

Las figuras 4.4 y 4.5 muestran el resultado final de las máscaras de los microcanales después de realizar el procedimiento anterior. Al contrario que la máscara de 200  $\mu\text{m}$ , que se visualiza a la perfección, los microcanales de la máscara de 100  $\mu\text{m}$  son tan estrechos que a simple vista cuesta visualizarlos.

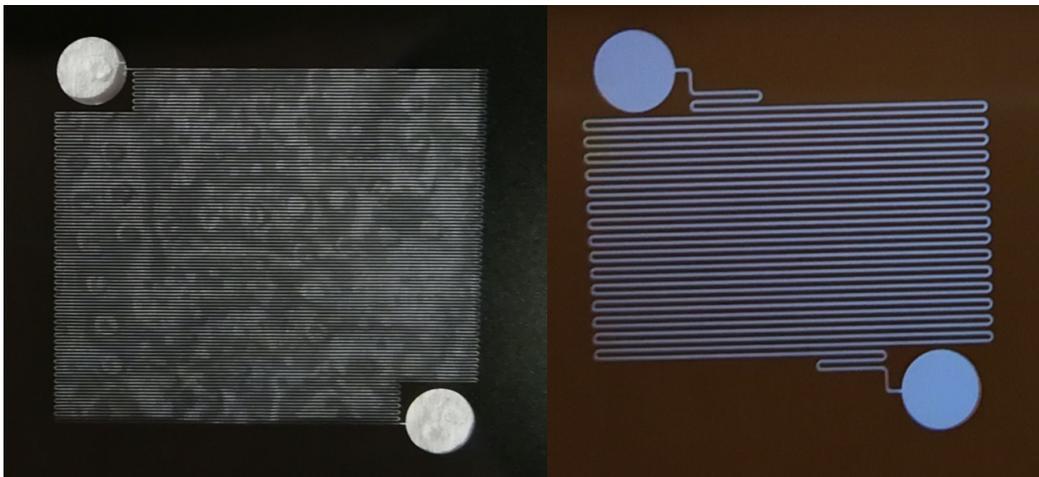


Figura 4.4 Máscara microcanal 100  $\mu\text{m}$

Figura 4.5 Máscara microcanal 200  $\mu\text{m}$

Finalmente no se fabricó la máscara de 500  $\mu\text{m}$ , si no que se utilizó el diseño en L-Edit para fabricarlo en metacrilato utilizando una fresadora. Posteriormente se iba a cubrir con PCB flexible.

Lo mismo ocurre con las máscaras del calentador, en el de 150  $\mu\text{m}$  se pueden diferenciar las pistas a simple vista, sin embargo, en los de 100  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$  sería conveniente utilizar un microscopio para una correcta visualización.

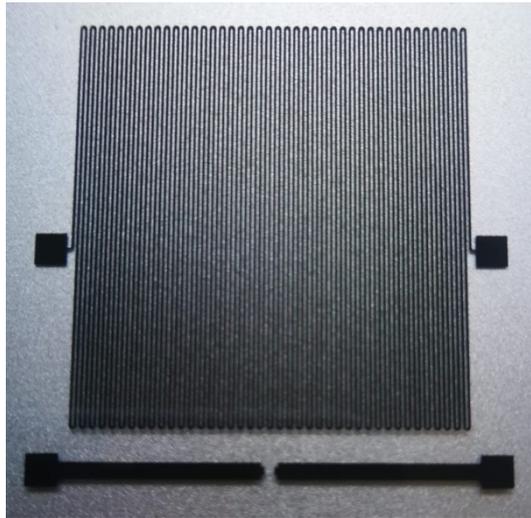


Figura 4.6 Máscara calentador 150  $\mu\text{m}$

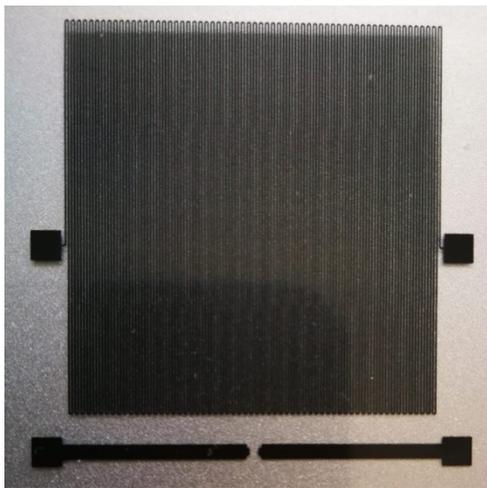


Figura 4.7 Máscara calentador 100  $\mu\text{m}$

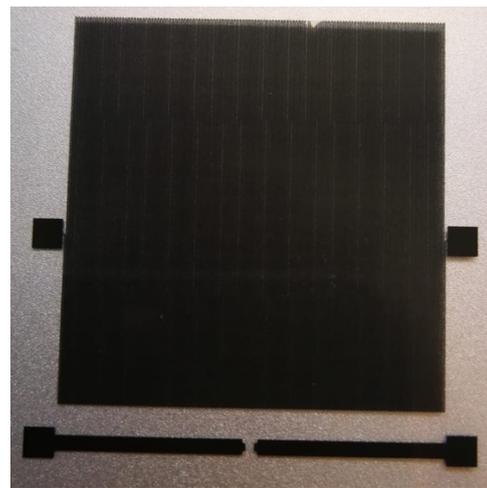


Figura 4.8 Máscara calentador 50  $\mu\text{m}$

### 4.3 Proceso de fabricación SU-8

Una vez tengamos ya las máscaras, procederemos a la fabricación del LOC comenzando el proceso de fabricación del SU-8. Este tiene como función crear el molde de SU-8 sobre la placa PCB rígida para posteriormente fabricar el LOC de PDMS.



Figura 4.9 Proceso de fabricación del SU-8

**1º Limpieza del sustrato:** El primer paso consiste en limpiar el sustrato, en nuestro caso PCB, con acetona e isopropanol.

**2º Spin Coating:** Utilizamos una máquina llamada Spin Coater para depositar el SU-8 sobre el sustrato con un espesor definido. Para conseguir una capa a una altura específica, programamos el Spin Coater a unas determinadas revoluciones. En nuestro caso realizamos una multideposición, la primera de un espesor de  $50\ \mu\text{m}$  y posteriormente otra de espesor  $150\ \mu\text{m}$ , obteniendo un altura final de  $200\ \mu\text{m}$ .



Figura 4.10 Spin Coater

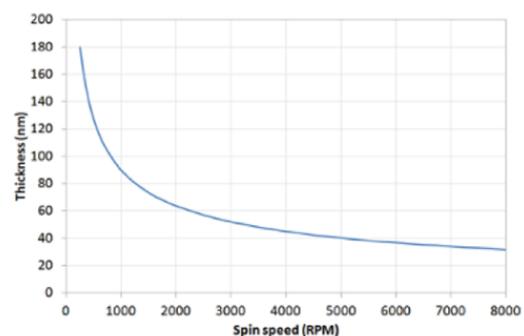


Figura 4.11 Gráfica revoluciones / espesor

**3° Soft Bake:** Usamos un hot plate para mediante calor eliminar el disolvente presente en el SU-8 consiguiendo que se solidifique. El soft bake se realiza durante un corto tiempo a 65°C y luego durante un tiempo mayor a 95°C. Los tiempos dependerán del espesor de la capa.



Figura 4.12 Hot Plate

**4° Exposición:** La exposición del SU-8 se realiza iluminándolo con luz ultravioleta gracias a esta alineadora. Mediante una máscara, nosotros utilizamos la del microcanal de 200  $\mu\text{m}$ , se iluminan las partes que se desean polimerizar y se tapan las que no. Para nuestro caso, haremos una multiexposición, una para cada una de las deposiciones.



Figura 4.13 Alineadora / Insoladora

**5° Post Exposure Bake (PEB):** Volvemos a calentar en el hot plate para polimerizar el SU-8 iluminado. El tiempo de calentamiento depende del espesor de la capa.

**6° Grabado:** Último paso del proceso. Su objetivo es eliminar el SU-8 no polimerizado. Se puede hacer mediante inmersión, como en nuestro caso, o spray. Si es necesario usaremos acetona. Tras el grabado, aclaramos con isopropanol.

La figura 4.14 muestra el resultado final del proceso. Observamos la presencia de un par de burbujas que aparecieron durante la deposición del SU-8 y que no conseguimos hacer desaparecer tras someterlo a calor con el Hot Plate.

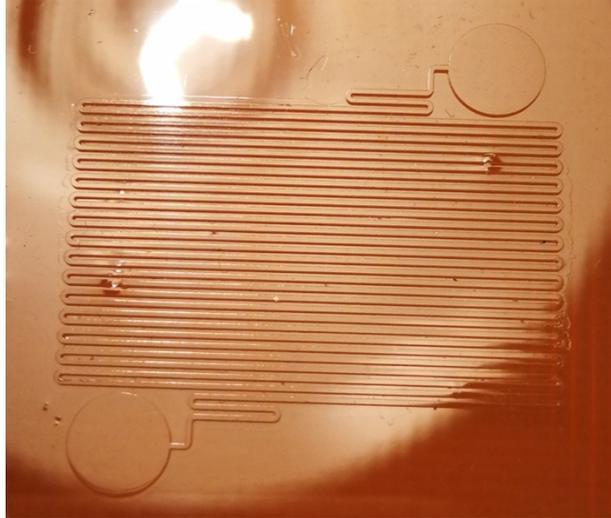


Figura 4.14 Molde de SU-8 sobre PCB del microcanal de  $200\ \mu\text{m}$

## 4.4 Proceso de fabricación PDMS

Fabricado ya el molde necesario en SU-8, como hemos mostrado anteriormente, llegaremos al último paso, la fabricación del LOC en PDMS que utilizaremos finalmente para nuestro proyecto.

**1° Preparación del PDMS:** El proceso comienza haciendo una mezcla prepolímero y agente curador con una proporción 10:1 en peso, la más típica usada, y otra de proporción 20:1. La mezcla se realiza manualmente.

**2° Desgasificado:** Una vez hayamos terminado la mezcla, se mete en una campana de vacío durante unos 15 minutos para eliminar las burbujas que hayan aparecido durante la mezcla.



Figura 4.15 Campana de vacío

**3° Vertido y curado:** La mezcla de proporción 10:1 se echa en el molde y la de 20:1 se deposita sobre una oblea de vidrio a unas determinadas revoluciones en función de la altura deseada usando el Spin Coater. Una vez acabado, se curan en el horno. En nuestro caso estuvieron 45 minutos a una temperatura de 65°C.

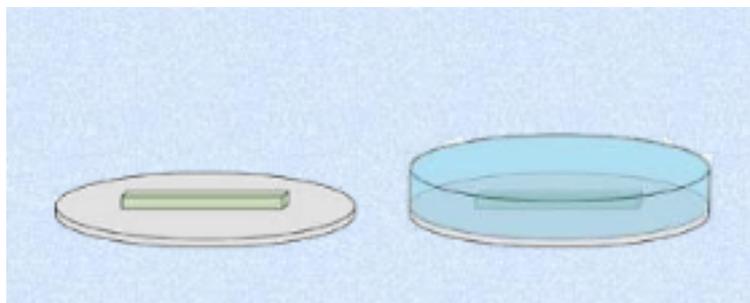


Figura 4.16 Vertido y curado

**4° Desmoldado y perforación:** Una vez curado, se desmolda y obtenemos una réplica del molde en negativo. A continuación, se le hacen agujeros de entrada y salida para poder inyectar fluidos mediante conectores.

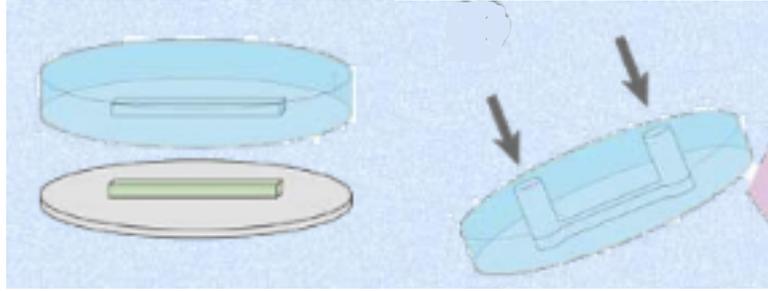


Figura 4.17 Desmoldado y perforación

**5° Bonding y curado final:** Para terminar cerramos el circuito microfluídico con la otra lámina de PDMS que depositamos sobre la oblea de vidrio efectuando previamente el curado parcial de ambos PDMS a 65°C durante 45 minutos (Bonding). Previamente, se desmolda el PDMS de nuestro circuito microfluídico y se le hace los agujeros en los puertos de entrada y salida. Finalmente se mete en el horno para que se suelde.

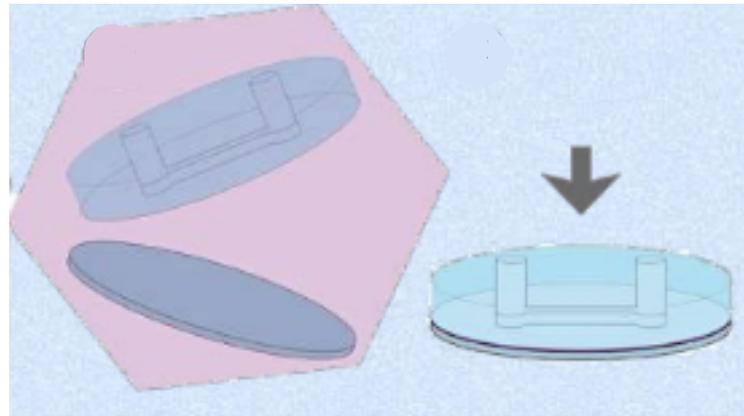


Figura 4.18 Bonding y curado final

## 4.5 Fabricación del calentador

Para llevar a cabo la fabricación del calentador, en primer lugar se recortó una placa PCB en forma cuadrada de aproximadamente 4 cm de lado donde cupiese sin problemas la máscara de pistas de 150  $\mu\text{m}$  fabricada anteriormente.

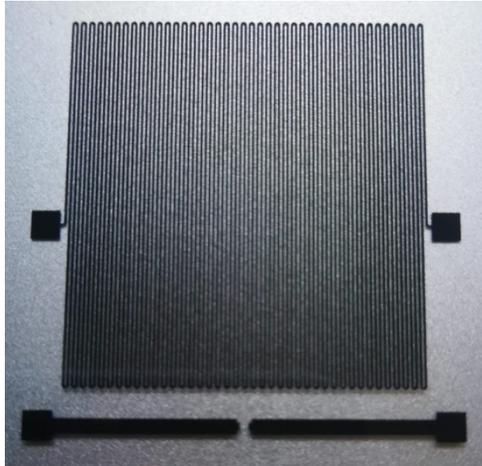


Figura 4.19 Máscara calentador 150  $\mu\text{m}$

Se le aplicó una resina en spray y se calentó durante unos segundos en el Hot Plate. A continuación, se procedió a la alineación e insolación utilizando la máscara nombrada. Se le sometió a 7 ciclos de insolación de aproximadamente 20 segundos cada uno.

Finalmente se llevó a cabo el revelado y el ataque químico del PCB por ambas caras. Tras soldar la NTC y los cables en los PADs orientados a conexión, el resultado es el que se muestra en la siguiente figura 4.20. Se observa como hubo que realizar un pequeño arreglo en las pistas con estaño debido a una discontinuidad que apareció durante el ataque químico. El color oscuro más notable en la parte central se debe a la alta temperatura a la que se sometió durante una de las pruebas realizadas en el laboratorio.

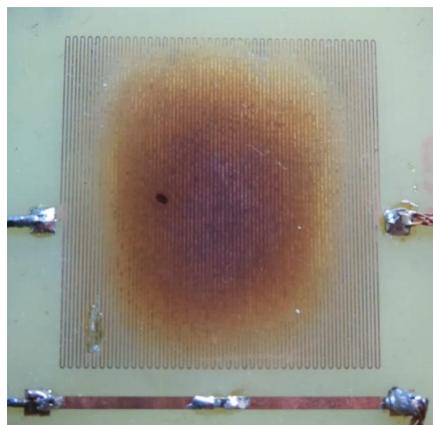


Figura 4.20 Calentador de 150  $\mu\text{m}$  después de la caracterización

### 4.3 Fabricación del Lab on Chip en PMMA

Además de fabricar el LOC en PDMS, también fabricamos otro dispositivo en metacrilato (PMMA) utilizando el diseño en L-Edit de la máscara de los microcanales de espesor 500  $\mu\text{m}$ .

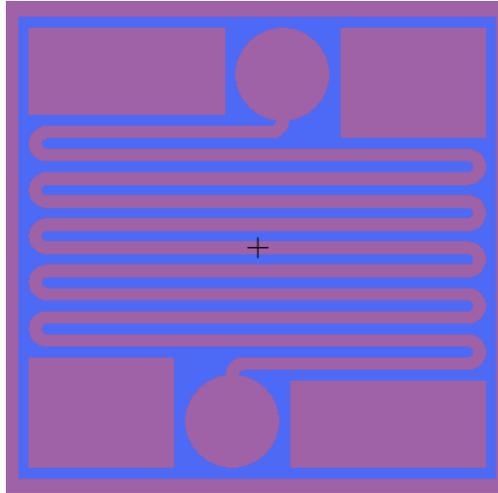


Figura 4.21 Diseño en L-Edit del microcanal de 500  $\mu\text{m}$

Para el fresado de los microcanales en PMMA se utilizó la fresadora CNC del laboratorio de microsistemas de la escuela. Una vez finalizado se hicieron los agujeros en los puertos de entrada y salida. El LOC tiene unas dimensiones de 2x2 cm<sup>2</sup>. La figura 4.22 muestra el resultado final.



Figura 4.22 LOC fabricado en PMMA

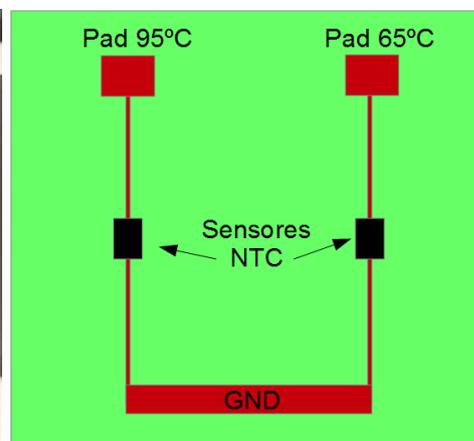


Figura 4.23 PCB flexible con dos sensores NTC

Posteriormente, este dispositivo LOC se iba a cubrir con un PCB flexible con dos sensores NTC como el de la figura 4.23. El pegado se realizaría con un pegamento biocompatible. Los PADS de 95°C y 65°C irían conectados a las lecturas que tenemos como entradas de Arduino, mientras que las resistencias asociadas a las NTC ya están en la placa electrónica PCB.

El modelo de la NTC es “Termistor Murata, Resistencia 10k $\Omega$ , Compensación, Detección, Carcasa 0402, 100mW, 1 x 0.5 x 0.5mm”, y tiene un coste de 10 céntimos la unidad.

## 5 PROGRAMACIÓN DEL MICROCONTROLADOR

---

**E**n este apartado explicaremos el desarrollo e implementación del microcontrolador para programar el movimiento del motor y el control de temperatura en el Lab-on-PCB. Para ello hemos utilizado Arduino, una plataforma de creación de electrónica de código abierto, basada en software y hardware libre.

En primer lugar realizaremos un diagrama de bloques de funcionamiento. Una vez hecho esto, pasaremos a escribir el programa en Arduino.

Con respecto al convertidor analógico-digital, ADC, su funcionamiento es muy sencillo. Los niveles del convertidor abarcan desde 0V hasta 5V. Eso, en el ADC, se corresponde con 0 a 1023, es decir, el 0 iría con los 0V, y el 1023 con los 5V. Sabemos que nuestras señales oscilan aproximadamente entre 0 y 5V. Para su transformación, habrá que saber su valor exactamente y simplemente hacer una regla de tres para pasarlo a 0-1023.

### 5.1 Diagrama de bloques de funcionamiento

Para una mejor organización y limpieza se realizó un diagrama de bloques principal compuesto por otros sub-diagramas.

1. Si está dentro del rango pasa directamente a esperar el tiempo estipulado (continuación del diagrama principal).
2. Si está por debajo de la temperatura mínima de referencia, supongamos 80°C, bajaremos el motor acercando así el fluido al calentador y en consecuencia aumentando su temperatura.
3. En caso contrario, puesto que no está ni dentro del rango ni por debajo de este, se encuentra a una temperatura por encima de la máxima de referencia. Supongamos 100°C, subiremos el motor alejando así el fluido del calentador y en consecuencia disminuyendo su temperatura.

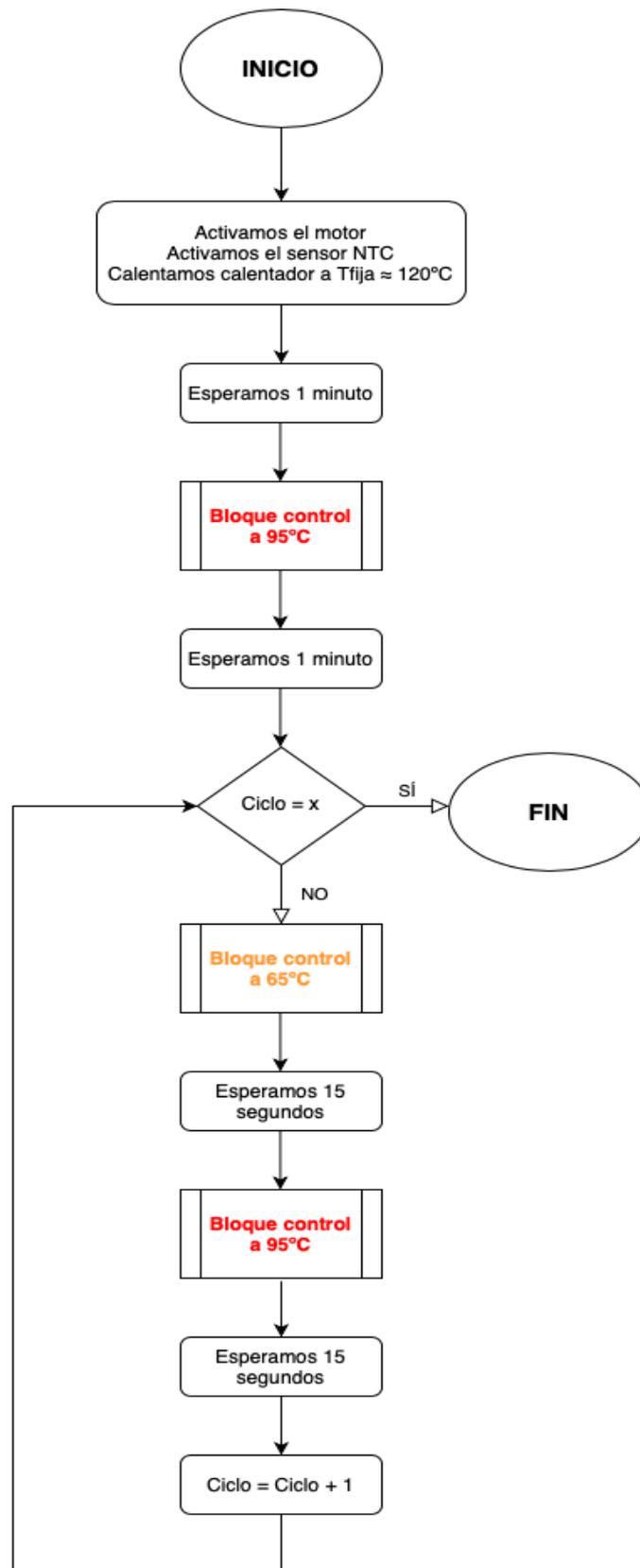


Figura 5.1 Diagrama de bloques de funcionamiento principal

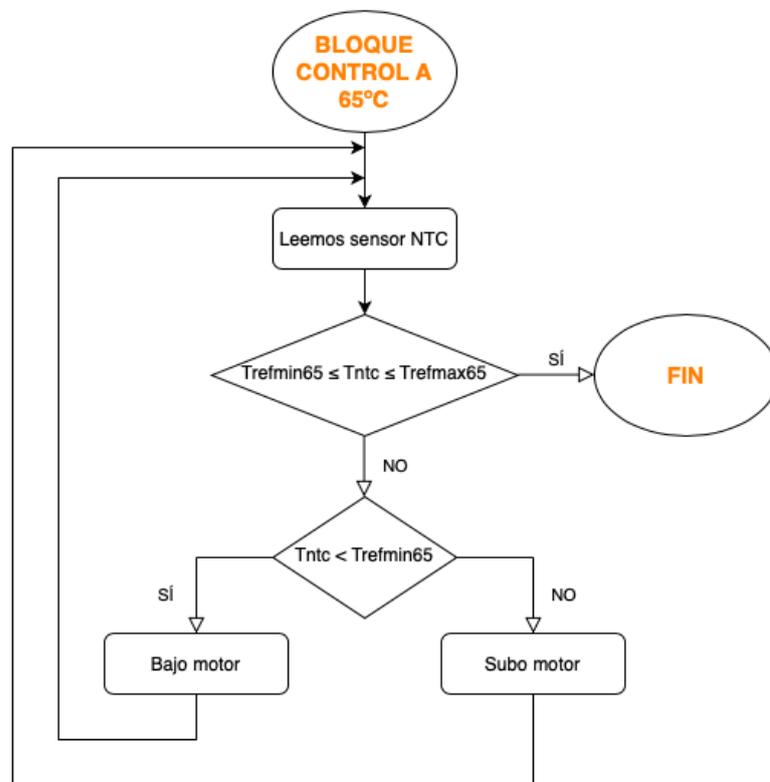
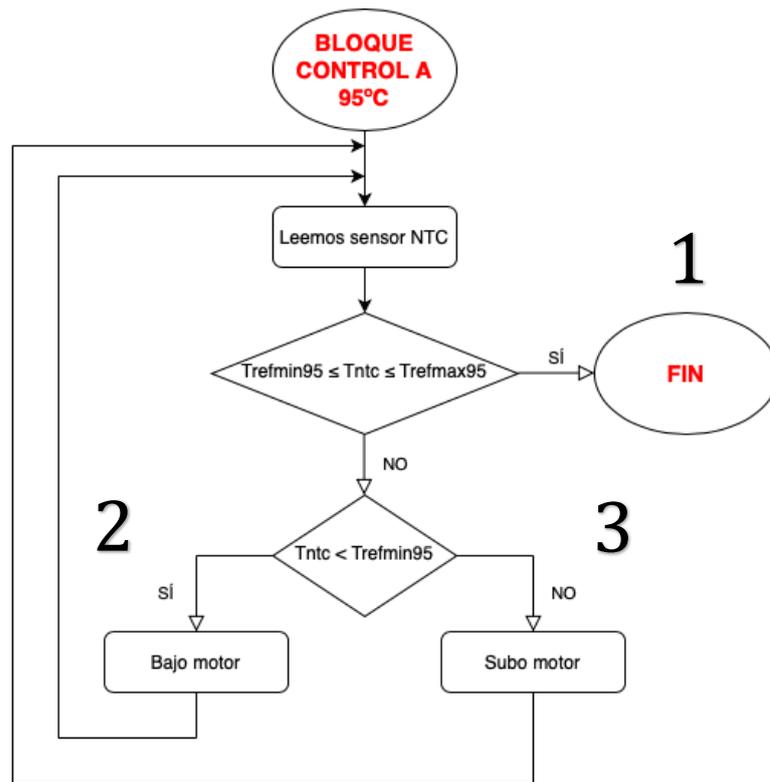


Figura 5.2 Sub-diagramas de bloques de funcionamiento

## 5.2 Descripción del programa

El programa, como podemos ver en el diagrama de funcionamiento, será bastante sencillo.

1. Al principio se activarían tanto el motor como los sensores NTC para los controles de temperatura de 65 y 95°C, a la misma vez que se alimentaría el calentador con la tensión adecuada para alcanzar la temperatura fija deseada de 120°C.
2. Establecemos como tiempo de espera 1 minuto para que el calentador llegue a la temperatura de 120°C.
3. Entramos en el primer sub-diagrama, el bloque control a 95°C. Aquí simplemente leeremos el sensor NTC y preguntaremos si se encuentra dentro de nuestro rango de valores de referencia. Si es así, saldremos de este bloque para continuar con el diagrama principal. En caso contrario, preguntaremos si se encuentra por encima o por debajo de nuestro rango de valores, y en consecuencia moveremos el motor alejándolo o acercándolo del calentador hasta que alcance la temperatura de referencia óptima, 95°C.
4. Una vez alcanzado la temperatura que buscábamos, volveremos a esperar 1 minuto.
5. Comenzamos con un bucle que realizará tantas pasadas como establezcamos.
6. Entramos en el segundo sub-diagrama, el bloque de control a 65°C. Su funcionamiento será exactamente igual que el del bloque de control a 95°C, con la única diferencia que el nuestro rango de valores de referencia será distinto, al igual que la temperatura de referencia óptima, 65°C.
7. Esperamos 15 segundos.
8. Repetimos el paso número 3.
9. Volvemos a esperar 15 segundos.
10. Incrementamos el número de ciclos y si alcanzamos el valor preestablecido, finalizamos el bucle.
11. Si finalizamos el bucle, movemos el motor hasta el origen a la espera de que vuelva a ser utilizado.

### 5.3 Simulación en Tinkercad

En este último apartado del capítulo vamos a comprobar que el programa diseñado anteriormente lleva a cabo su función correctamente. Debido a la crisis sanitaria provocada por el coronavirus, la asistencia a la escuela nos fue imposible, por lo que tuvimos que buscar alternativas lo más válidas posibles para realizar esta comprobación. Finalmente se decidió que la herramienta más adecuada y fiable era Tinkercad.

Para la simulación del programa utilizamos Tinkercad, un software gratuito de modelado 3D en línea que se ejecuta en un navegador web y es conocido por su simplicidad y facilidad de uso.

El Arduino de Tinkercad es el UNO, sólo hay que modificar el nombre de algunos pines y cambiar los valores de temperatura en el ADC adaptándolos a la simulación. El programa será idéntico. El ejemplo de prueba que realizaremos será:

1. Poner el sensor a 30°C y observar que el motor comienza a girar en un sentido, buscando la temperatura establecida de 95°C, y que se para cuando alcanza dicha temperatura y espera un tiempo concreto.
2. Realizar lo mismo que en el apartado anterior pero variando la temperatura hasta que el sensor entre en otro rango y comprobar que también se para y espera el tiempo preestablecido.

Para realizar esta simulación no es necesario montar el circuito de los amplificadores operacionales, aunque sí el del motor. En el software podemos encontrar el integrado L293D que usamos, además de resistencias y transistores.

En primer lugar seleccionamos la protoboard, buscamos los elementos básicos necesarios y realizamos el montaje. Después añadimos un par de sensores de temperatura, uno para cada rango de temperaturas y añadimos unos multímetros para ver la tensión que soportan y así adaptar la temperatura en el ADC. Una vez hecho esto, buscamos el motor CC con codificador y lo alimentamos con una batería de 9 V.

Realizamos la simulación y observamos como el montaje funciona perfectamente, aunque visualmente no se aprecia el movimiento del motor. Para corroborar el correcto funcionamiento añadimos unos leds y osciloscopios, además de utilizar puntos de interrupción en el código.

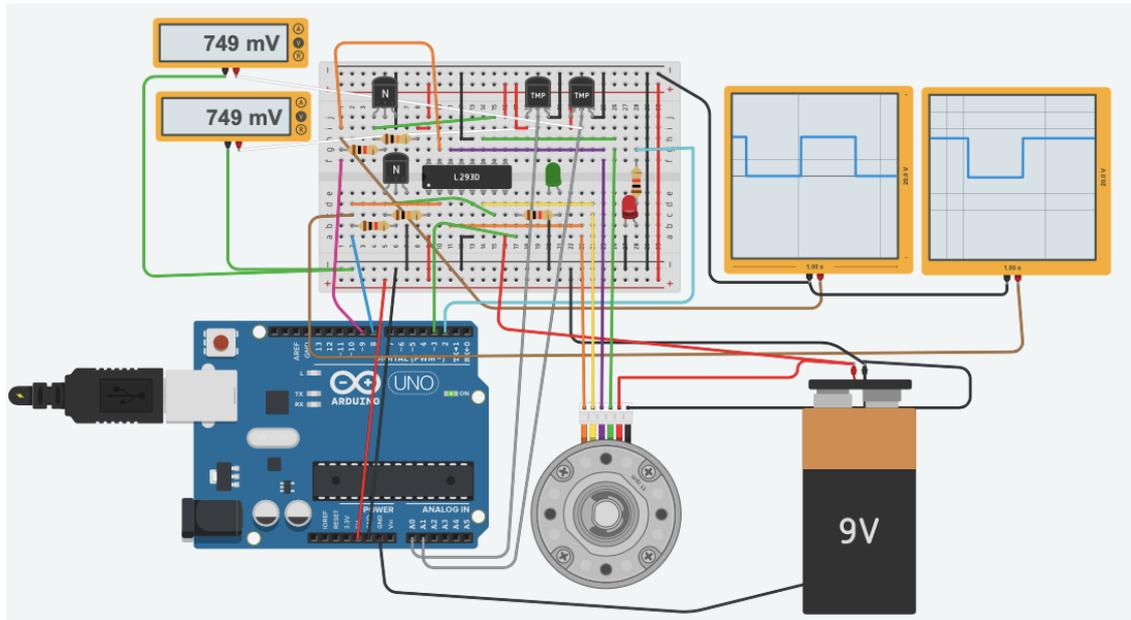


Figura 5.3 Simulación del programa en Tinkercad

Los leds y los osciloscopios nos ayudan a visualizar mejor el funcionamiento. Cuando el rango de temperaturas que busca el motor es el de  $95^{\circ}\text{C}$  se enciende el led rojo, y de igual manera lo hace el led verde con el rango de  $65^{\circ}\text{C}$ . Además, durante los tiempos de espera, en los que el motor permanece inmóvil, vemos gracias al osciloscopio como las ondas se paran igualmente. Tras realizar varias simulaciones observamos que el código del programa diseñado funciona perfectamente.

## 6 CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

**E**l objetivo principal que buscábamos en este proyecto era desarrollar un termociclador controlado electrónicamente destinado a amplificar el ADN mediante la técnica PCR usando un microcalentador a temperatura fija.

Desgraciadamente la extraordinaria situación que nos ha llevado a esta crisis sanitaria provocada por el COVID-19 nos ha privado la posibilidad de desarrollar este proyecto íntegro. Pudimos diseñar y fabricar el microcalentador, el LOC de PDMS encargado de almacenar la muestra, diseñar la placa electrónica PCB encargada del control de temperatura y motor, y programar el microcontrolador. Sin embargo, no pudimos probar el sistema al completo ni ver los supuestos fallos al integrar los diferentes subsistemas. Aún así, a nivel de diseño, el proyecto está completamente terminado.

Además, podemos decir que se consiguieron varios objetivos a priori secundarios:

- **Sencillez en el diseño:** desde el inicio diseñando las máscaras para el microcalentador y los microcanales, tanto los circuitos electrónicos de control de temperatura, como la placa electrónica PCB y el programa del microcontrolador, siempre se ha buscado simpleza y limpieza en el diseño para evitar complejidades y dificultades que resultasen problemáticos durante el desarrollo del proyecto.
- **Fabricación estándar:** los procesos de fabricación utilizados, como la litografía y el wet etching, son simples y están ya estandarizados.
- **Bajo coste:** todos los materiales empleados para la fabricación en el laboratorio fueron de bajo coste tal y como se describe en uno de los capítulos anteriores. La fabricación de la placa electrónica PCB se mandó a realizar a China y tuvo un coste de 3'8 €/ud.

Con respecto a futuras ampliaciones destinadas a mejorar el proyecto y optimizar su funcionamiento se podría decir:

- **Incorporar pulsador de inicio:** una mejora muy sencilla y fácil sería implementar un pulsador con el que controlar el inicio del sistema. Cuando alimentamos el sistema, se empieza a suministrar corriente a los distintos subsistemas lo que no es demasiado correcto ni óptimo. Añadiendo el pulsador podríamos controlar nosotros el inicio del proceso cuando consideremos que se puede iniciar de manera segura.
- **Fabricar una estructura:** una de las ideas que surgieron durante el desarrollo del proyecto fue la posibilidad de diseñar y fabricar una estructura de PMMA donde “encerrar” el microcalentador y el LOC para así minimizar las corrientes de aire que confundiesen a los sensores NTC a la hora de leer las temperaturas.
- **Mejorar programa del microcontrolador:** el programa utilizado para el control del microcontrolador es bastante sencillo pero podría mejorarse. Se podría incorporar que durante las esperas de 15 segundos cuando el LOC se encuentra dentro del rango de temperaturas deseado, se siguiera controlando el motor por si durante este lapso de tiempo la temperatura se saliera del rango en el que nos encontramos.
- **Integrar interfaz gráfica:** una buena mejora del proyecto podría ser incorporar una

pantalla, ya que facilitaría la comunicación sistema usuario y ayudaría a visualizar el funcionamiento del sistema. Gracias a esta pantalla podríamos ver en todo momento el número de ciclo en el que estamos, la variación de temperatura del LOC y los tiempos de espera entre otros.

- **Pruebas biológicas:** se realizan en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). En particular en el departamento de biología molecular. Se haría el termociclado con nuestro dispositivo y la detección para confirmar la amplificación de las cadenas de ADN de la muestra. Es decir, corroborar que nuestro dispositivo realiza correctamente la función para la que ha sido desarrollado.

# 7 ANEXOS

## Lista de componentes extensa de la placa electrónica PCB

"Component Count.:", "53"
"Ref", "Value", "Footprint"
"J1", "Conn_01x02_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x02_P2.54mm_Vertical"
"J2", "Conn_01x02_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x02_P2.54mm_Vertical"
"J3", "Barrel Jack Switch", "Connector_BarrelJack:BarrelJack_CUI_PJ-102AH_Horizontal"
"J4", "Conn_01x02_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x02_P2.54mm_Vertical"
"J5", "Conn_01x02_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x02_P2.54mm_Vertical"
"J8", "Conn_01x02_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x02_P2.54mm_Vertical"
"J9", "Conn_01x02_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x02_P2.54mm_Vertical"
"J12", "Conn_01x01_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x01_P2.54mm_Vertical"
"J19", "Conn_01x02_Male", "Connector_PinHeader_2.54mm:PinHeader_1x02_P2.54mm_Vertical"
"P1", "Digital", "Socket_Arduino_Mega:Socket_Strip_Arduino_2x18"
"P2", "Power", "Socket_Arduino_Mega:Socket_Strip_Arduino_1x08"
"P3", "Analog", "Socket_Arduino_Mega:Socket_Strip_Arduino_1x08"
"P4", "Analog", "Socket_Arduino_Mega:Socket_Strip_Arduino_1x08"
"P5", "PWM", "Socket_Arduino_Mega:Socket_Strip_Arduino_1x10"
"P6", "PWM", "Socket_Arduino_Mega:Socket_Strip_Arduino_1x08"
"P7", "Communication", "Socket_Arduino_Mega:Socket_Strip_Arduino_1x08"
"P8", "CONN_01X01", "Socket_Arduino_Mega:Arduino_1pin"
"P9", "CONN_01X01", "Socket_Arduino_Mega:Arduino_1pin"
"P10", "CONN_01X01", "Socket_Arduino_Mega:Arduino_1pin"
"P11", "CONN_01X01", "Socket_Arduino_Mega:Arduino_1pin"
"P12", "CONN_01X01", "Socket_Arduino_Mega:Arduino_1pin"
"P13", "CONN_01X01", "Socket_Arduino_Mega:Arduino_1pin"
"Q1", "2N2219", "Package_TO_SOT_THT:TO-18-3"
"Q2", "2N2219", "Package_TO_SOT_THT:TO-18-3"
"R1", "0.1k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R2", "1k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R3", "0.022k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R4", "0.56k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R5", "0.47k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R6", "0.1k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R7", "0.1k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R8", "0.47k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R9", "6.8k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R10", "1.2k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R11", "4.7k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R12", "0.22k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R13", "6.8k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R14", "0.1k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R15", "4.7k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R16", "1.2k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R17", "0.22k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R18", "0.1k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R19", "R", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R20", "R", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R21", "R", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R22", "R", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R23", "1k", "Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"

"R24","10k","Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R25","1k","Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"R26","10k","Resistor_THT:R_Axial_DIN0207_L6.3mm_D2.5mm_P10.16mm_Horizontal"
"U1","LM358","Package_DIP:DIP-8_W7.62mm"
"U2","LM358","Package_DIP:DIP-8_W7.62mm"
"U3","L293D","Package_DIP:DIP-16_W7.62mm"

### Código del programa del microcontrolador

```
#include <Stepper.h>

float tiempoinicio = 60000 ; // 1 minuto en milisegundos
float tiempospera = 15000; // 15 segundos en milisegundos
int numero_de_ciclos = 30;
int Tref95 = 510; //referencia de temperatura en el ADC, 95°C
int Trefmax95 = 944; //referencia de temperatura en el ADC, 96°C
int Trefmin95 = 28; //referencia de temperatura en el ADC, 94°C
int Tref65 = 483; //referencia de temperatura en el ADC, 65°C
int Trefmax65 = 924; //referencia de temperatura en el ADC, 72°C
int Trefmin65 = 4; //referencia de temperatura en el ADC, 58°C
float sumatorio = 0;
int pasos = 1; //establecer pasos del motor

//Selección de pines del micro para el motor
Stepper motor(24,38,40); //24 pasos por vuelta en este motor.

void setup() {
  Serial.begin(9600);
  motor.setSpeed(15); //establecer velocidad del motor

  //pinMode(pinEnable, INPUT); // enable pin
  pinMode(38, OUTPUT);
  pinMode(40, OUTPUT);
}

void loop() {

  //El motor se activa con el motor.step(pasos).
  //El sensor no se activa, simplemente se lee, como abajo.
  //Alimento calentador

  delay(tiempoinicio); //Espero 1 minuto
```

```

int Tntc = analogRead(A14); //Leo sensor NTC

    if (Tntc <= Trefmax95 && Tntc >= Trefmin95){ //si está dentro del rango
        delay(tiempoinicio); //espero 1 minuto
    }
    else{ //si está fuera del rango
        while(Tntc < Tref95){ //hasta que alcance los 95°C
            motor.step(pasos); //Bajo motor
            sumatorio++;
            int Tntc= analogRead(A14);
        }
        while(Tntc > Tref95){ //hasta que alcance los 95°C
            motor.step(-pasos); //Subo motor
            sumatorio--;
            int Tntc= analogRead(A14);
        }
        delay(tiempoinicio);
    }
}

for(i=1; i= numero_de_ciclos; i++){ //repite x ciclos

    int Tntc= analogRead(A15); //Leo sensor NTC

    if (Tntc <= Trefmax65 && Tntc >= Trefmin65){ //si está dentro del rango
        delay(tiempoespera); //espero 15 segundos
    }
    else{ //si está fuera del rango
        while(Tntc < Tref65){ //hasta que alcance los 65°C
            motor.step(pasos); //Bajo motor
            sumatorio++;
            int Tntc= analogRead(A15);
        }
        while(Tntc > Tref65){ //hasta que alcance los 65°C
            motor.step(-pasos); //Subo motor
            sumatorio--;
            int Tntc= analogRead(A15);
        }
        delay(tiempoespera);
    }
}

int Tntc= analogRead(A14); //Leo sensor NTC

    if (Tntc <= Trefmax95 && Tntc >= Trefmin95){ //si está dentro del rango
        delay(tiempoespera); //espero 15 segundos
    }
    else{ //si está fuera del rango
        while(Tntc < Tref95){ //hasta que alcance los 95°C
            motor.step(pasos); //Bajo motor
            sumatorio++;
            int Tntc= analogRead(A14);
        }
        while(Tntc > Tref95){ //hasta que alcance los 95°C
            motor.step(-pasos); //Subo motor
            sumatorio--;
            int Tntc= analogRead(A14);
        }
        delay(tiempoespera);
    }
}

motor.step(-sumatorio); // lleva al motor a su posición inicial, si pasos
                        //es distinto de 1 simplemente haría esto:
                        //motor.step(-sumatorio*pasos);

//Apago calentador

```

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barcelona, U.-. U. A. (2016, 2 mayo). *Una tecnolog.* UAB Barcelona. <https://www.uab.cat/web/sala-de-prensa/detalle-noticia/una-tecnologia-innovadora-mejora-la-eficacia-de-los-dispositivos-de-analisis-de-microfluidos-1345667994339.html?noticiaid=1345702820392>
- [2] Oconnor, L.; Joy, J.; Kane, M.; Smith, T.; Maher, M. Rapid polymerase chain reaction/DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. *J. of Food Prot.* 63(3):337-342. 2000.
- [3] Henegariu, O.; Heerema, N.; Dlouhy, S.; Vance, G.; Vogt, P. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotech.* 23(3): 504-511. 1997.
- [4] Eric K Sackmann, Anna L Fulton, and David J Beebe. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 507(7491):181–189, March 2014.
- [5] George M Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442 (7101):368–373, 2006.
- [6] J Cooper McDonald, David C Duffy, Janelle R Anderson, and Daniel T Chiu. Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21: 27–40, 2000.
- [7] Andres W Martinez, Scott T Phillips, George M Whitesides, and Emanuel Carrilho. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, 82(1):3–10, January 2010.
- [8] Robert Michael van Damm. Solvent-Resistant Elastomeric Microfluidic Devices Applications. PhD thesis, California Institute of Technology, 205.
- [9] Y H Ghallab and W Badawy. Lab-on-a-chip: Techniques, Circuits, and Biomedical Applications. Artech House integrated microsystems series. Artech House, Incorporated, 2010. ISBN 9781596934191
- [10] Thorsen, T. (2002). Microfluidic Large-Scale Integration. *Science*, 298(5593), 580-584. <https://doi.org/10.1126/science.1076996>
- [11] Mathias Schulenburg, Cologne. “La nanotecnología. Innovaciones para el mundo de mañana”. COMISIÓN EUROPEA, DG Investigación. 2004, pp. 29-45. Disponible en línea: <http://www.bmbf.de/de/nanotechnologie.php>
- [12] Yonggang Zhu. “Manufacturing & Materials Technology. Project Leader for Microfluidics”. [http://www.dpi.vic.gov.au/DPI/nrensr.nsf/9e58661e880ba9e44a256c640023eb2e/7c7043e7a3935094ca2573210002449c/\\$FILE/CSIRO\\_Microfluidics.pdf](http://www.dpi.vic.gov.au/DPI/nrensr.nsf/9e58661e880ba9e44a256c640023eb2e/7c7043e7a3935094ca2573210002449c/$FILE/CSIRO_Microfluidics.pdf)
- [13] Yu-Chong Tai and Siyang Zheng. “Blood test lab-on-a-chip”. *Electrónica TFOT The future of things*. 2004. <http://www.tfot.info/articles/39/Blood-Test-Lab-on-a-Chip.html>
- [14] Jamil El-Ali, Peter K. Sorger and Klavs F. Jensen. “Cells on chips”. *Nature. International Weekly Journal of Science*, *Nature* 442, pp 403-411, Julio 2006 <http://www.nature.com/nature/journal/v442/n7101/abs/nature05063.html#a1>
- [15] Peter. Ertl. “Development of Lab-on-a-chip for characterization of human cells”. Conferencia presentada en el Lab-on-a-chip World Congress 2007, Edinburgh, Mayo 2007.
- [16] H. Craighead. “Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules.” *Nature. International Weekly Journal of Science*, *Nature* 442, pp 387-393, Julio 2006. <http://www.nature.com/nature/journal/v442/n7101/abs/nature05061.html#a1>

- [17] A. van den Berg. "Profile Albert van den Berg". Professor of BIOS, The lab-on-a-chip Group MESA, University of Twente, The Netherlands. *Lab on a chip*. Vol 4, pp 4N-7N, 2004. <http://www.rsc.org/Publishing/Journals/LC/article.asp?doi=b400106k>
- [18] Merkel, T.; Graeber, M.; Pagel, L. A new technology for fluidic microsystems based on PCB technology. *Sens. Actuators A Phys.* 1999, *77*, 98–105.
- [19] Moschou, D.; Tserepi, A. The lab-on-PCB approach: Tackling the  $\mu$ TAS commercial upscaling bottleneck. *Lab A Chip* 2017, *17*, 1388–1405.
- [20] Metz, S.; Holzer, R.; Renaud, P. Polyimide-based microfluidic devices. *Lab A Chip* 2001, *1*, 29–34.
- [21] Moschou, D.; Greatehead, L.; Pantelidis, P.; Kelleher, P.; Morgan, H.; Prodromakis, T. Amperometric IFN- $\gamma$  immunosensors with commercially fabricated PCB sensing electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 2016, *86*, 805–810.
- [22] G. Jobst , I. Moser , P. Svasek , M. Varahram , Z. Trajanoski , P. Wach , P. Kotanko , F. Skrabal and G. Urban , *Sens. Actuators, B*, 1997, *43* , 121 —12
- [23] Aracil, C., Perdigones, F., Moreno, J. M., Luque, A., & Quero, J. M. (2015). Portable Lab-on-PCB platform for autonomous micromixing. *Microelectronic Engineering*, *131*, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2014.10.018>
- [24] Flores, G., Aracil, C., Perdigones, F., & Quero, J. M. (2018a). Lab-protocol-on-PCB: Prototype of a laboratory protocol on printed circuit board using MEMS technologies. *Microelectronic Engineering*, *200*, 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.08.003>
- [25] Moschou, D.; Vourdas, N.; Kokkoris, G.; Papadakis, G.; Parthenios, J.; Chatzandroulis, S.; Tserepi, A. All-plastic, low-power, disposable, continuous-flow PCR chip with integrated microheaters for rapid DNA amplification. *Sens. Actuators B Chem.* 2014, *199*, 470–478.
- [26] Tseng, H.-Y.; Adamik, V.; Parsons, J.; Lan, S.S.; Malfesi, S.; Lum, J.; Shannon, L.; Gray, B. Development of an electrochemical biosensor array for quantitative polymerase chain reaction utilizing three-metal printed circuit board technology. *Sens. Actuators B Chem.* 2014, *204*, 459–466.
- [27] Kaprou, G.D.; Papadakis, G.; Papageorgiou, D.P.; Kokkoris, G.; Papadopoulos, V.; Kefala, I.; Gizeli, E.; Tserepi, A. Miniaturized devices for isothermal DNA amplification addressing DNA diagnostics. *Microsyst. Technol.* 2016, *22*, 1529–1534.
- [28] Jolly, P.; Rainbow, J.; Regoutz, A.; Estrela, P.; Moschou, D. A PNA-based Lab-on-PCB diagnostic platform for rapid and high sensitivity DNA quantification. *Biosens. Bioelectron.* 2019, *123*, 244–250.
- [29] Papadopoulos, V.E.; Kefala, I.N.; Kaprou, G.; Kokkoris, G.; Moschou, D.; Papadakis, G.; Gizeli, E.; Tserepi, A. A passive micromixer for enzymatic digestion of DNA. *Microelectron. Eng.* 2014, *124*, 42–46.
- [30] Vasilakis, N.; Moschou, D.; Carta, D.; Morgan, H.; Prodromakis, T. Long-lasting FR-4 surface hydrophilisation towards commercial PCB passive microfluidics. *Appl. Surf. Sci.* 2016, *368*, 69–75.
- [31] Mangayarkarasi, V.; Sneka, P.; Sujith, R.; Jayaprakash, J. Ergonomic Diagnostic Tool based on Chip Mini RT-PCR for Diagnosis of Pulmonary and Extra Pulmonary Tuberculosis. *J. Pure Appl. Microbiol.* 2019, *13*, 1185–1190.
- [32] Kaprou, G.D.; Papadopoulos, V.; Papageorgiou, D.P.; Kefala, I.; Papadakis, G.; Gizeli, E.; Chatzandroulis, S.; Kokkoris, G.; Tserepi, A. Ultrafast, low-power, PCB manufacturable, continuous-flow microdevice for DNA amplification. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, *411*, 5297–5307.

- [33] Kaprou, G. D., Papadopoulos, V., Loukas, C.-M., Kokkoris, G., & Tserepi, A. (2020). Towards PCB-Based Miniaturized Thermocyclers for DNA Amplification. *Micromachines*, 11(3), 258. <https://doi.org/10.3390/mi11030258>
- [34] Research Yole Development and Markets. Microfluidic applications in the pharmaceutical, life science, in-vitro diagnosis and medical device market report. Technical Report June 2013, 2013.
- [35] Lisa R. Volpatti and Ali K. Yetisen. Commercialization of microfluidic devices. *Trends in Biotechnology*, 32(7):347–350, July 2014.
- [36] YOLE, “YOLE Status of microfluidics industry 2015”, 2015
- [37] Español, L. M. E. (2019, 7 octubre). *Mercado mundial de inmunoanálisis microfluidos llegará los dos mil millones de dólares en 2025*. Lab Medica en Español. <https://www.labmedica.es/industria/articulos/294779575/mercado-mundial-de-inmunoanálisis-microfluidos-llegará-a-los-dos-mil-millones-de-dólares-en-2025.html>
- [38] Vicerrectorado de investigación - Universidad de Sevilla. (2020, 23 abril). *Subvenciones a proyectos de investigación sobre SARS-COV-2 y COVID-19*. <https://investigacion.us.es/convocatorias/ver/1338>
- [39] Gobierno de España, & Instituto de salud Carlos III. (2020, 17 marzo). *Real Decreto-ley 8/2020, de 17 de marzo, de medidas urgentes extraordinarias para hacer frente al impacto económico y social del COVID-19*. <https://www.boe.es/eli/es/rdl/2020/03/17/8>.
- [40] *Coronavirus: EU mobilises €10 million for research*. (2020, 31 enero). European Commission - European Commission. [https://ec.europa.eu/info/news/coronavirus-eu-mobilises-eur10-million-for-research-2020-jan-31\\_en](https://ec.europa.eu/info/news/coronavirus-eu-mobilises-eur10-million-for-research-2020-jan-31_en)
- [41] Lorenz, H., Despont, M., Fahrni, N., LaBianca, N., Renaud, P., & Vettiger, P. (1997a). SU-8: a low-cost negative resist for MEMS. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 7(3), 121-124. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/7/3/010>
- [42] Sia, S. K., & Whitesides, G. M. (2003). Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *ELECTROPHORESIS*, 24(21), 3563-3576. <https://doi.org/10.1002/elps.200305584>

