



Universidad de Oviedo

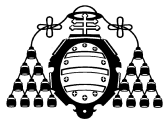
**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**DISEÑO DE UN MICROCHIP DE  
ELECTROFORESIS EN PAPEL CON DETECCIÓN  
ELECTROQUÍMICA INTEGRADA**

**ANDREA GONZÁLEZ LÓPEZ**

**Julio 2015, Oviedo**



**MARÍA TERESA FERNÁNDEZ ABEDUL**, Profesora titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “DISEÑO DE UN MICROCHIP DE ELECTROFORESIS EN PAPEL CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA INTEGRADA”

ha sido realizado por la alumna ANDREA GONZÁLEZ LÓPEZ bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 12 de JULIO de 2015

Fdo: M.Teresa Fernández Abedul

## **AGRADECIMIENTOS**

*Una vez terminado este trabajo me gustaría expresar mi agradecimiento:*

*Al Dr. Agustín Costa García, Catedrático del Departamento de Química Física y Analítica, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación que dirige.*

*A mi tutora, la Dr. María Teresa Fernández Abedul, por haberme apoyado desde el primer momento, haber confiado en mí y haberme transmitido su entusiasmo y su alegría cada día, incluso cuando las cosas no salían como debían de salir.*

*A Pablo García Manrique, que me ha sufrido y aguantado en mis momentos de desesperación, que no fueron pocos. Gracias por haberse involucrado tanto en este proyecto, sin él, estoy segura que aun seguiría atascada con las medidas en el InkScape.*

*A los demás integrantes del grupo de investigación por haberme acogido desde el primer día, sobre todo a Myriam y Lía, que también me han animado y apoyado en los días difíciles.*

*A mi madre, que sin saber nada de Biología, ni de Química Analítica se ha preocupado por este trabajo y me ha apoyado durante todo el curso, uno de los más difíciles a los que me he enfrentado en todos estos años de estudio.*

*A mis amigas, en especial a Lucía y María, porque siempre hemos compartido logros y fracasos. Una vez compartieron el suyo conmigo y ahora (por fin) me toca a mí compartirlo con ellas.*

*Y por último a Pablo Valcárcel, sin él, sin su apoyo incondicional y sin su fe ciega en mí, no habría sido capaz de llegar a escribir estas líneas. Gracias por estar siempre a mi lado.*

*A todos vosotros, un profundo agradecimiento,*

Andrea

**VERSIÓN REDUCIDA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER:**

**Diseño de un microchip de electroforesis en papel con  
detección electroquímica integrada.**

## **ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. LA MINIATURIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA: EL CONCEPTO DE $\mu$ TAS	1
1.2. LA ELECTROFORESIS CAPILAR COMO MÉTODO DE DETECCIÓN	1
1.3. MICROCHIPS DE ELECTROFORESIS	2
1.3.1. Historia de los microchips de electroforesis	2
1.3.2. Operaciones básicas en un microchip de electroforesis	2
1.4. DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EN PAPEL	4
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>7</b>
3.1. DISEÑO DE UN MICROCHIP DE ELECTROFORESIS EN PAPEL	7
3.2. INCORPORACIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN	7
3.3. OPTIMIZACIÓN DEL DISEÑO	7
3.4. DETECCIÓN DE EPINEFRINA	8
3.5. SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE COMPONENTES EN UNA MEZCLA	9
3.6. PERSPECTIVAS DE FUTURO	10
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>11</b>

# INTRODUCCIÓN

---

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

## **1.1. LA MINIATURIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA: EL CONCEPTO DE $\mu$ TAS**

La Miniaturización de procesos analíticos y de herramientas en Química Analítica es una tendencia básica que ha cobrado importancia a lo largo de los años. El objetivo principal es la reducción de la denominada “escala de trabajo”.

Los objetivos generales de la miniaturización pueden resumirse en: contribuir a la automatización, consistente en la sustitución total o parcial de la intervención humana en los procesos analíticos, y a la simplificación; mejorar procesos ya descritos y abordar nuevas problemáticas analíticas. Todo esto lleva a una serie de ventajas como puede ser el abaratamiento de costes, una menor cantidad de muestra necesaria y una menor generación de residuos tóxicos.

Sin embargo, el concepto de miniaturización no tuvo impacto hasta que apareció el concepto de MTAS o microsistema total de análisis en los años 90. Se trata de dispositivos en los que se consigue miniaturizar e integrar todas las operaciones previas de un proceso analítico.

## **1.2. LA ELECTROFORESIS CAPILAR COMO MÉTODO DE SEPARACIÓN**

Una de las técnicas que por su gran aplicación en el campo de la analítica ha sido objeto de la miniaturización es la electroforesis. La electroforesis es una técnica de separación que se basa en el movimiento de especies en presencia de un campo eléctrico.

Pese a ser una de las técnicas más utilizadas en sus diferentes plataformas para la separación de proteínas, ADN o ARN, presenta algunas desventajas: el llamado efecto Joule, que consiste en el calentamiento del medio conductor cuando una corriente fluye a través de él influye en la velocidad de separación y limita el uso a potenciales bajos lo que lleva a una menor resolución y a una separación menos eficiente.

Todos estos problemas o inconvenientes mejoran cuando se pasa a hablar de la electroforesis capilar

Emplear un capilar, con un diámetro interno menor de 200  $\mu$ m, como canal para la electromigración ofrece muchas ventajas. El aumento la relación superficie/volumen permite disipar muy bien el calor generado por el efecto Joule y es posible aplicar

# INTRODUCCIÓN

---

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

potenciales altos, de hasta 30000 voltios. Lo que lleva a unas separaciones más eficientes. Además, se disminuye la cantidad de buffer y de muestra necesaria.

## **1.3. MICROCHIPS DE ELECTROFORESIS**

### **1.3.1. Historia de los microchips de electroforesis**

Puesto que la electroforesis capilar es una técnica que trabaja con pequeños volúmenes y proporciona separaciones rápidas y de alta resolución, es una técnica que encaja a la perfección en la tecnología de los microchips.

Llegados a este punto es importante introducir el término de microfluídica, introducido por George M. Whitesides como el campo que manipula fluidos en pequeños canales a una escala de micrómetros.

Los dispositivos microfluídicos utilizan longitudes de separación cortas, lo que lleva a poder aplicar potenciales muy altos, dando lugar a una separación muy eficiente. Además, se reduce mucho la cantidad de muestra utilizada, siendo del rango de los nL.

El primer microchip de electroforesis que se construyó fue utilizando vidrio como material soporte, pero desde entonces, el campo ha evolucionado y se han diseñado microchips de electroforesis sobre materiales cerámicos, polímeros y más recientemente, sobre resina epoxi.

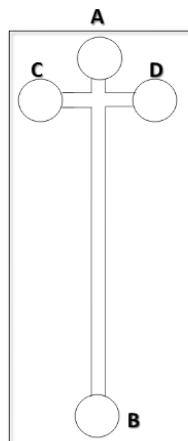
Uno de los objetivos más actuales es reducir costes y desarrollar dispositivos sobre soporte papel, idea que se introducirá al final de este apartado.

### **1.3.2. Operaciones básicas en un microchip de electroforesis**

Un microchip de electroforesis sencillo presenta la estructura que se muestra en la Figura 1. Consta de cuatro depósitos y un formato en forma de cruz latina, donde dos canales, el más corto denominado canal de inyección, se cruza con el denominado canal de separación.

# INTRODUCCIÓN

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo



**Figura 1-** Esquema de un microchip de electroforesis.

En este tipo de microchips pueden realizarse tres operaciones básicas:

- **La inyección.** En este caso de tipo electrocinética en la cual, se aplica un potencial entre los depósitos C y D permitiendo la introducción de la muestra en el canal.
- **La separación.** En la que se aplica una diferencia de potencial entre los depósitos A y B con el fin de que la porción de muestra situada en la intersección de la cruz, fluya por el canal de separación, separándose en función de su relación masa/carga.
- Y finalmente **la detección**, la cual tiene lugar cerca del depósito B.

La detección sin duda es la parte más importante en un microchip de electroforesis. Se han acoplado diversas técnicas como por ejemplo la Fluorescencia inducida por Láser (LIF en inglés) o la Espectrometría de Masas.

Sin embargo, desde el punto de vista comercial, es la electroquímica la más adecuada. Además, es una técnica de fácil miniaturización y barata. Aunque sea necesario trabajar con especies electro activas, es cierto que existen muchas más moléculas que son electroquímicamente activas que las que son fluorescentes por naturaleza. Además es una técnica que se puede integrar por completo en el microchip, cumpliendo a la perfección las características de un  $\mu$ TAS.

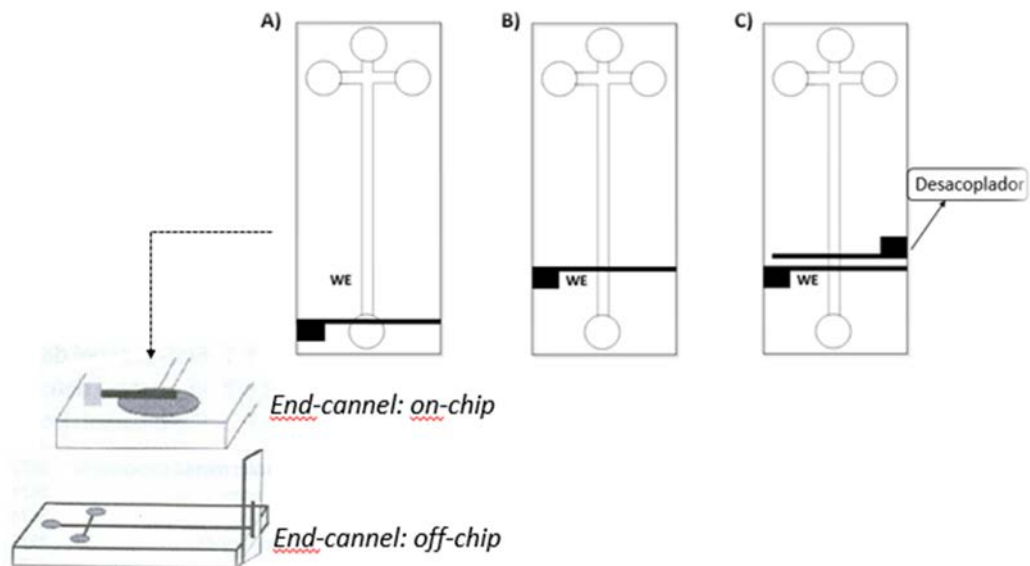


# INTRODUCCIÓN

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

Dentro de la detección electroquímica existen tres posibilidades de integración en un microchip de electroforesis [Figura 2].

- La figura 2.A, corresponde a un diseño **end-channel**. Aquí, el electrodo de trabajo se sitúa justo al final del canal de separación. Incluye dos subtipos: **end-channel on chip** y **end-channel off chip**
- La figura 2.B, corresponde con un diseño **in-channel**. Aquí el electrodo de trabajo se sitúa directamente sobre el canal de separación.
- Y la figura 2.C, que se corresponde con un diseño **off-channel**, al cual se le añade un desacoplador que envía el voltaje a tierra.



**Figura 2-** Modos de detección electroquímica. A) Detección end-channel, B) detección in-channel y C) detección off-channel. Se representa el electrodo de trabajo como WE.

## 1.4. DISPOSITIVOS ANALÍTICOS EN PAPEL

Como bien se mencionó con anterioridad, uno de los recientes objetivos además de la miniaturización es la disminución de costes y esto se hace posible con el uso del papel. Es aquí cuando aparece el término de  $\mu$ PADS (en español: dispositivos analíticos microfluídicos basados en papel).

La elección del papel como material para la fabricación de estos dispositivos tiene varias ventajas, como el hecho de que es **bio compatible**, **químicamente modificable**: se le

## INTRODUCCIÓN

---

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

pueden añadir gran variedad de grupos funcionales que se pueden unir covalentemente a proteínas, ADN o pequeñas moléculas. Es de **fácil destrucción**, los dispositivos pueden incinerarse de forma fácil y segura después de ser usados y **es flexible**.

Todo esto hace posible que este tipo de dispositivos en papel puedan ser utilizados como método de diagnóstico de bajo coste en países en desarrollo.

La clave de estos dispositivos es que pueden analizarse fácilmente y no requieren equipamiento caro ni entrenamiento para su manejo.

Los  $\mu$ PADS se pueden fabricar mediante diferentes técnicas, como puede ser la fotolitografía. Y aunque cada método tiene sus ventajas y sus inconvenientes, es la impresión en cera la que conlleva menos pasos y la más adecuada ya que permite:

- Fabricar una gran cantidad de dispositivos en una sola remesa
- Diseñar canales microfluídicos sobre el papel
- Y todo esto, además, con un muy bajo coste.

## OBJETIVOS

---

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

Por todo lo anterior recogido en el apartado 1 de esta memoria, el objetivo de este Trabajo Fin de Máster es:

**Diseñar un microchip de electroforesis en soporte papel con detección electroquímica integrada.**

Para el cuál, se fijaron los siguientes objetivos específicos:

- Diseño de la nueva plataforma microfluídica: transferir los microchips de electroforesis comerciales en pyrex a soporte papel.
- Integración de la detección electroquímica: diseño y puesta a punto de diferentes tipos de electrodos.
- Puesta a punto de la nueva plataforma microfluídica: separación y detección de analitos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

### **3.1. DISEÑO DE UN MICROCHIP DE ELECTROFORESIS EN PAPEL**

El primer paso fue diseñar el primer prototipo sobre papel. Para ello, se tomaron las medidas de un microchip comercial y se transfirieron a papel mediante el programa informático InkScape.

Para conseguir pasar del modelo en 2D que nos ofrece la impresión en papel a un modelo en 3D, se decidió adoptar la disposición de origami. Esta disposición consta de 3 capas de papel, con tres funciones diferentes: la primera, y superior, es para proporcionar el grosor adecuado al microchip, la segunda es donde ocurrirá la electroforesis y la tercera para evitar que el holder y sus conexiones se mojen con la disolución.

Se diseñó un prototipo sobre papel con tan sólo canal de separación.

### **3.2. INCORPORACIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN**

El siguiente paso es la incorporación del sistema de detección. Se incorporaron tres tipos de electrodos diferentes, el primero de ellos, electrodos de tinta de carbono. Para ello, al prototipo 3 y mediante el programa InkScape, se le añadieron dos canales sobre los que se añadió la tinta de carbono.

El segundo tipo de electrodos a incorporar fueron los de pasta de carbono, ayudándonos de una máscara a modo de plantilla sobre la que se diseñaron los canales.

El tercer y último tipo de electrodos incorporados son los hilos de Pt. Puesto que la idea principal es desarrollar un dispositivo de bajo coste, se decide crear una plantilla externa con los electrodos. Esta plantilla se coloca dentro del origami y puede reutilizarse cambiándola de un microchip a otro.

### **3.3. OPTIMIZACIÓN DEL DISEÑO**

Después de estudiar el funcionamiento del microchip con diferentes diseños y estudiar la precisión intra e interelectródica de cada tipo de electrodo, se decide finalmente escoger el microchip de electroforesis en papel con electrodos de tinta de carbono integrados como modelo definitivo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

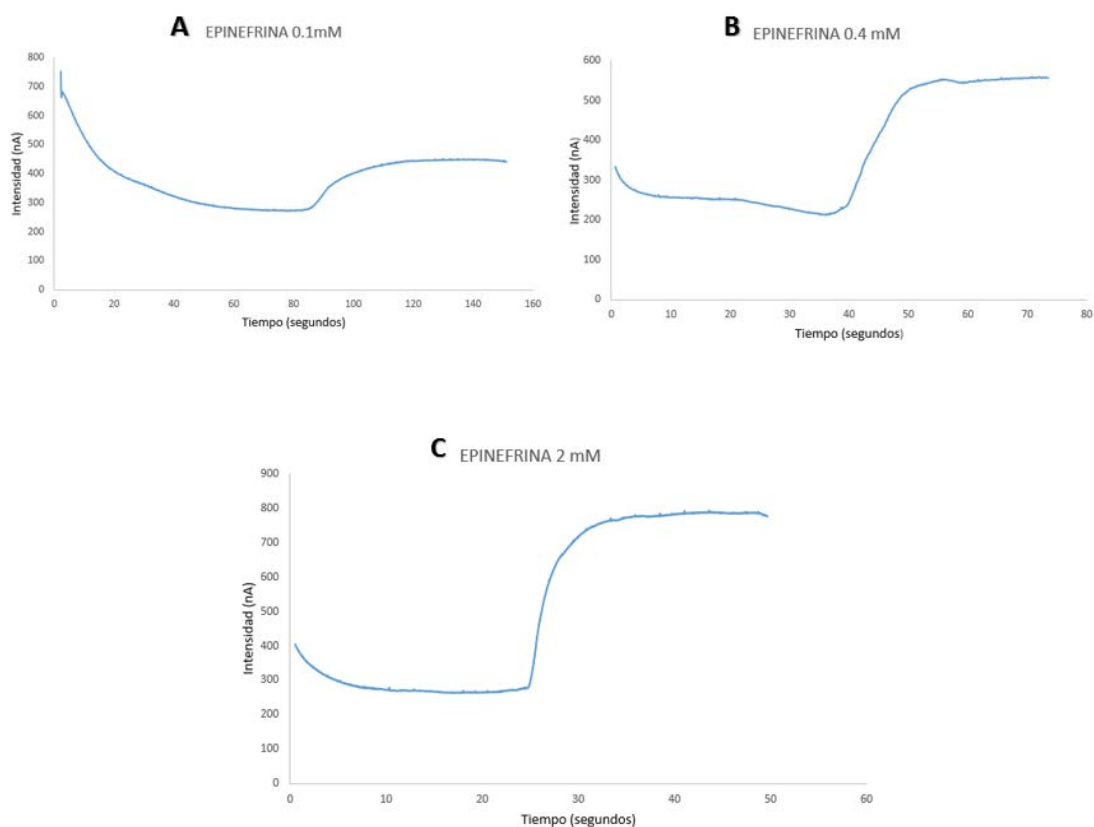
### 3.4. DETERMINACIÓN DE EPINEFRINA

El siguiente paso fue realizar un estudio cuantitativo de la epinefrina sobre los mismos.

Con el fin de conocer el intervalo de concentraciones de trabajo, se prepararon 8 disoluciones con concentraciones crecientes de epinefrina: 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2 mM.

Como nuestro prototipo solo contiene canal de separación, no se puede realizar inyección de la muestra por lo q se espera una meseta a la llegada del analito a la zona de detección en vez de un pico como ocurre sobre los microchips comerciales.

En la Figura 3 se muestran los electroferogramas correspondientes a las concentraciones 0.1, 0.4 y 2 mM.

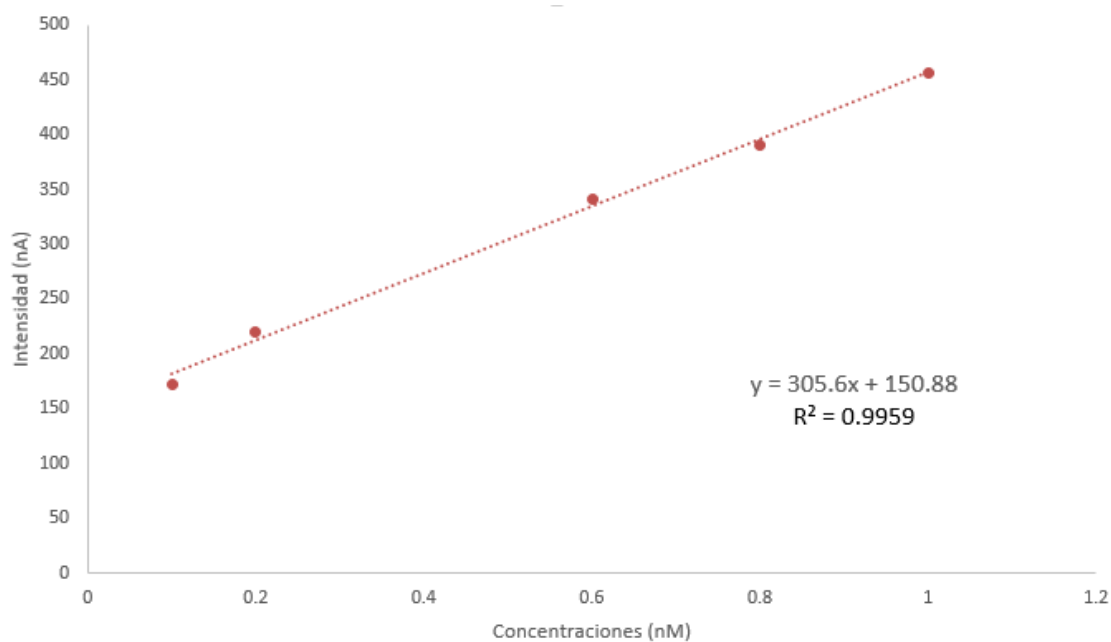


**Figura 3-** Electroferogramas para la epinefrina **A.** 0.1 mM **B.** 0.4 mM y **C.** 2 mM

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

En vistas a los resultados obtenidos, se representa la recta de calibrado tomando el tramo lineal en la Figura 4.



**Figura 4-** Recta de calibrado de seis puntos para las concentraciones crecientes de epinefrina correspondientes al tramo lineal.

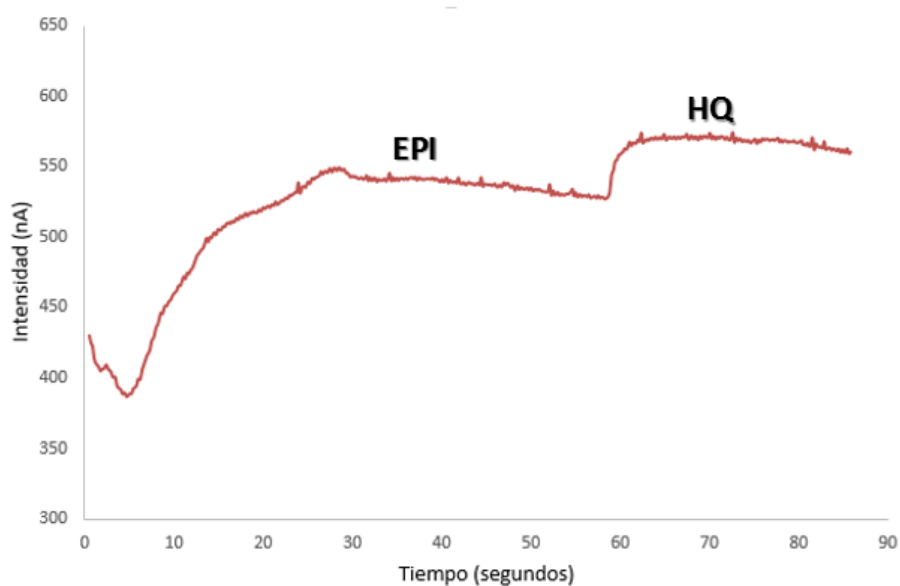
### 3.5. SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE COMPONENTES EN UNA MUESTRA

El último paso en el desarrollo de este microchip de electroforesis en papel fue comprobar su aplicación a la separación de componentes presentes en una mezcla.

Bajo determinadas condiciones de trabajo se obtuvo el electroferograma representado en la Figura 5, quedando demostrado que este diseño es capaz de separar dos componentes en menos de 100 s.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo



**Figura 5.** Electroferograma de una mezcla de epinefrina 2 mM e hidroquinona 2 mM.

Se observa en la Figura 5 la separación de los dos componentes de la mezcla. En un primer lugar, con un  $t_M$  de 10 segundos, comienza la señal para la llegada de la epinefrina y en segundo lugar, se observa una segunda meseta correspondiente a la llegada de la hidroquinona con un  $t_M$  de 60 segundos.

### **3.6. PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Una vez demostrado que con un diseño *end-channel, on-chip* es posible la detección, la separación y la cuantificación sobre un microchip de electroforesis en plataforma papel, habría que optimizar las distintas etapas, optimizando los parámetros en cada caso.

En primer lugar, habría que optimizar los potenciales de detección así como el voltaje de separación, siendo lo más importante la optimización de la precisión entre los diferentes microchips.

El siguiente paso, sería incorporar la inyección. Para ello se pasaría a optimizar un nuevo prototipo sobre papel ya desarrollado. Posteriormente se podría pasar a estudiar posibles aplicaciones. Sobre todo en el campo de la clínica, pudiendo incorporar un nuevo paso en el proceso como sería la reacción analítica, siendo muy interesante el desarrollo de inmunoensayos o la incorporación de reacciones enzimáticas para la detección de posibles productos.

## CONCLUSIONES

---

TFM. Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Universidad de Oviedo

En base a los resultados obtenidos a lo largo del trabajo experimental recogido en esta memoria de Trabajo Fin de Máster, se pueden postular las siguientes conclusiones:

1. Se ha conseguido diseñar un nuevo microchip de electroforesis en soporte papel.
2. Se ha integrado con éxito la detección electroquímica sobre el mismo, acoplando diferentes tipos de electrodos (tinta de carbono, pasta de carbono e hilos de platino) mediante un diseño *end-channel, on-chip*.
3. Se ha puesto a punto un microchip de electroforesis en soporte papel con electrodos de tinta de carbono integrados, el cuál es capaz de:
  - Detectar el analito de interés con precisión
  - Determinar diferentes concentraciones del analito de interés
  - Separar y detectar diferentes componentes en una mezcla



