

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Sección de Posgrado y Segunda Especialización Profesional**



**“Dispositivos Lab-on-a-chip y ópticos para mediciones distribuidas con aplicaciones en biomedicina”.**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON  
MENCIÓN EN FÍSICA**

**MAG. GERMÁN YURI COMINA BELLIDO**

**ASESOR LOCAL: DR. JOSÉ SOLÍS VELÍZ  
ASESOR EXTERNO: DR. DANIEL FILIPPINI**

**2014**

**LIMA-PERÚ**

Tesis Dedicada

A mi madre Dora Ana Bellido Ojeda  
Por su ejemplo de vida, su inmenso amor y todo su apoyo , desde siempre.  
A mi tía Edith por su amor, su “apoyo logístico” y cariño.  
A Anita por ese maravilloso amor que tenemos y por ser como es.

## RESUMEN

En la presente tesis se han investigado métodos y dispositivos con el objetivo de construir prototipos útiles que permitan medir de forma distribuida variables de interés biomédico, en especial para aplicaciones en diabetes y tuberculosis.

Los dispositivos “Lab-on-a-chip” (LOC) para microfluídica son sistemas miniaturizados de análisis los cuales usan volúmenes pequeños de muestras y reactivos. Ofrecen una alternativa compacta a la instrumentación clásica con una performance equivalente pero en una plataforma que puede ser desechable.

Se investigó y desarrolló un método económico y eficiente para la micro-fabricación de LOCs usando una impresora 3D. Éste método novedoso (reportado en <sup>23</sup>) permitió por primera vez fabricar LOCs con geometrías complejas y con múltiples capas en polidimetilsiloxano, sin usar el equipamiento especializado clásico ni facilidades de cuarto limpio. Se desarrolló un LOC multicapa que integró una zona funcionalizada la cual posee una respuesta dinámica de la absorción de luz relacionada con la concentración de la glucosa en una solución (0mM-10mM). Se mostró que un “Smartphone” es una buena plataforma de medición de la variación de la respuesta óptica del LOC, pudiendo medir las variaciones temporales de la respuesta óptica con una resolución en tiempo de 0.011%, lo cual es una ventaja, respecto a resolución con la que se mide intensidad (0.39%) incrementándose la resolución de medida en más de 35 veces. Éste dispositivo tiene muchas potencialidades para ser usado en el control de pacientes con diabetes.

El método de la observación microscópica de susceptibilidad de medicamentos (MODS) es una técnica rápida y económica para el diagnóstico temprano de infección por *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) y se basa en la observación microscópica de características de crecimiento de bacterias en un cultivo de esputo del paciente en una placa (placa MODS). Se investigó y desarrollaron dispositivos ópticos, que reemplacen al microscopio invertido usando en MODS para la visualización y detección de MTB. Los dos primeros prototipos económicos (reportados en <sup>60</sup>) mostraron que es posible reemplazar al microscopio especializado por versiones más económicas y mejoradas con un sistema de adquisición de imágenes. Se encontró que la concordancia del

segundo prototipo con el instrumento estándar fue de 96.61%. El tercer prototipo (reportado en <sup>61</sup>), consistió en un lector automatizado de placas MODS, siendo la primera demostración de su tipo. La concordancia del diagnóstico de Tuberculosis en base a imágenes digitales obtenidas de forma automatizada con éste prototipo e imágenes digitales obtenidas con el instrumento patrón fue de 100%.

Los dispositivos desarrollados podrían formar parte de un sistema de medición distribuida para telemedicina con aplicación especial para soluciones en diabetes y tuberculosis

**Palabras clave:** Lab-on-a-chip, dispositivos ópticos, point-of-care, microfabricación 3D, detección de glucosa, MODS.

## ABSTRACT

In this thesis different methods and devices for distributed measurements of biomedical variables with potential applications in diabetes and tuberculosis, have been investigated.

The "Lab-on-a-chip" (LOC) devices are miniaturized microfluidic analysis systems, which operate with small volumes of samples and reagents, aimed to be a compact and disposable alternative to classical instrumentation of equivalent performance.

An economical and efficient method for the micro-fabrication of LOCs using a 3D printer has been investigated and developed. This novel method (reported in 23) allows manufacturing of established type LOCs in polydimethylsiloxane, with complex geometries and with multilayer structures, but without using specialized equipment or clean room facilities. A multi-layer LOC has been developed which integrates a functionalized area, which has a dynamic light absorption response related to the glucose concentration in solution, within the relevant clinical range. It has been shown that a Smartphone is a good measurement platform for the LOC optical response, enabling measurement of absorption variations in time with a resolution of 0.011%, which improve in those of intensity (0.39%) by more than 35 times. This device is suitable with the clinical range for diabetes monitoring.

The method of microscopic observation of drug susceptibility (MODS) is a fast and inexpensive technique for early diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). It is based on the microscopic observation of growth characteristics of bacteria in a sputum culture placed on a plate (MODS plate). Optical devices, which replace the inverted microscope used in MODS, have been developed. The two first economic prototypes (reported in 60) have shown that is possible to replace the inverted microscope with a simple and inexpensive solution that includes an image acquisition system. It was found that the correlation of the second prototype instrument with standard measurements was 96.61%. The third prototype (reported in 61), was an automated MODS plate reader, the first demonstration of its kind. The concordance of the diagnosis of TB based on digital

images obtained with this prototype and digital images obtained with the standard instrument was 100%.

The developed devices could be part of a distributed measurement system for telemedicine, especially for solutions in diabetes and tuberculosis

**Keywords:** Lab-on-a-chip, optical devices, point of care, microfabrication, 3D printer, glucose detection, MODS.

## Agradecimientos

A Dios y a mi familia a la cual dedico ésta tesis.

A mi asesor Dr. José Solíz Véliz por paciencia, lecciones y apoyo constante durante todas las etapas del presente doctorado.

To my external supervisor Dr. Daniel Filippini, head of the Optical Devices Lab at Linköping University in Sweden, for all his support that enabled me to visit his Lab, to develop part of the thesis work, for all the discussions and meetings, on-line and in-vivo. And all his help in my visits to Linköping.

Al Dr. Mirko Zimic, por todo el apoyo brindado para poder realizar parte del trabajo de ésta tesis, además por permitirme desarrollar proyectos relacionados con un campo tan importante como la salud pública.

Al Dr. Walter Estrada por permitirme ingresar a éste maravilloso mundo académico y de investigación, y por su asesoría en los primeros pasos de la tesis.

To Dr. Anke Suska, for all her support at the lab, for her ideas on the chemical detection of LOCs, and for all her help during my visits to Linköping.

To Prof. Fredrik Winqvist from Linköping University, for his disposition, effort and time to review this work.

Al Mag. Clemente Luyo por las micrografías SEM, al Mag. Edward Carpio por su importante ayuda en la impresión.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería por permitirme realizar el presente trabajo de Doctorado.

Al Centro de Tecnologías de Información y Comunicaciones (CTIC) por brindarle el apoyo necesario para realizar parte del trabajo de doctorado.

Al Ing. José Oviden Martínez por todo el importante apoyo brindado. A los Drs. Juan Rodríguez y Abel Gutarra por sus palabras de aliento.

A colegas y amigos del Grupo de Películas Delgadas de la FC y CTIC por sus comentarios, apoyo y momentos de distracción y al maravilloso personal de CTIC por toda su ayuda.

## Índice

	Página
<b>Capítulo 1</b>	1
1.1 Problemas de salud pública	2
1.2 Pruebas y dispositivos Point-of-care	3
1.3. Sistemas distribuidos de medición	4
<b>Capítulo 2</b>	5
2.1 Dispositivos Lab-on-a-Chip (LOC)	6
2.2. Métodos clásicos para fabricación de dispositivos Lab-on-a-chip para microfluídica	6
2.3 Modelamiento de un fluido incompresible que viaja a través de un canal de un dispositivo de microfluídica	11
2.4 Equipos para caracterización de materiales	13
2.5 Microscopios ópticos	16
2.6 Aberraciones en lentes	17
2.7 Parámetros de lentes objetivo	19
2.8 Smartphone como plataforma para mediciones ópticas	20
2.9 Métodos estadísticos para la cuantificación de la concordancia entre mediciones hechas con diferentes observadores y diferentes instrumentos	25
<b>Capítulo 3</b>	26
3.1 Desarrollo de métodos novedosos para la fabricación de dispositivos Lab-on-a-chip para microfluídica.	27
3.2 Desarrollo de Lab-on-a-chip para la detección óptica de glucosa en una solución	43
<b>Capítulo 4</b>	48
4.1 Prueba MODS para diagnóstico de TB	49
4.2 Desarrollo de sistemas ópticos para la detección temprana de TB	51
4.3 Validación de prototipos	62
<b>Capítulo 5</b>	
Conclusiones	65
<b>Bibliografía</b>	71
<b>Anexo 1</b>	78



# **Capítulo 1**

## **Introducción**

---

La presente tesis tiene como finalidad aportar en el desarrollo de dispositivos y equipos basados en microfluídica, fotónica y óptica para la detección de Tuberculosis y monitoreo de glucosa para aplicaciones en control de diabetes.

### **1.1. Problemas de salud pública.**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta generalmente a los pulmones y es causada por una bacteria (*Mycobacterium tuberculosis*). Se transmite de una persona a otra a través de gotas generadas en el aparato respiratorio de pacientes con la enfermedad pulmonar activa.

La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunológico actúa formando una barrera alrededor de la bacteria. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. La tuberculosis se puede tratar mediante la administración de antibióticos durante seis meses<sup>1</sup>

La Tuberculosis (TB) permanece como uno de los problemas de salud más serios a nivel mundial. Según la Organización mundial de la salud en el año 2012, un estimado de 8.6 millones de personas desarrollaron la enfermedad y 1.3 millones perecieron debido a ésta. Éste número es extremadamente alto teniendo en consideración que esto se puede prevenir con detección y tratamiento adecuado<sup>2</sup>.

La diabetes mellitus es una enfermedad hormonal crónica donde el cuerpo no puede usar apropiadamente la energía de los alimentos. La diabetes aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina (deficiencia de insulina) o la insulina producida es inefectiva (resistencia a la insulina). La diabetes denominada Tipo 2 (paciente no dependiente de la insulina) es una enfermedad principalmente diagnosticada en adultos y puede ser controlada con dieta, ejercicios y en algunos casos medicación<sup>3</sup>.

Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) en el 2013 existe alrededor de 382 millones de personas con ésta condición y pronostica que para el 2035 la cifra subirá a 592 millones de personas. El 80% de la población de pacientes se encuentra en países de ingresos bajos y medios. En el 2013 perecieron 5.1 millones de personas por complicaciones asociadas a la enfermedad<sup>4</sup>.

Como cualquier enfermedad crónica el monitoreo en éste caso de los niveles de glucosa en sangre y cuidado constante permiten evitar complicaciones asociadas con la enfermedad mejorando considerablemente el nivel de vida del paciente.

## **1.2 Pruebas y dispositivos Point-of-care (POC).**

Las pruebas de diagnóstico médico son una parte fundamental de la práctica médica y permiten que el médico pueda tomar las medidas más adecuadas para el tratamiento del paciente. Sin embargo, las pruebas de diagnóstico más sofisticadas se encuentran centralizadas y para su uso se requieren de personal altamente calificado y de instalaciones especializadas. Además el equipamiento, que por lo general es caro y de personal técnico altamente especializado para su mantenimiento. El costo de éstas pruebas centralizadas las hacen prohibitivas e inaccesibles para buena parte de la población mundial. Consiente de éste hecho la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre otras organizaciones han hecho un llamado al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico clínico los cuales puedan funcionar en lugares con acceso restringido a laboratorios centralizados<sup>5</sup>.

Una prueba Point-of-care (POC), es una prueba médica la cual se realiza en el lugar donde se encuentra el paciente, posee un tiempo de respuesta eficaz de medición y permite tomar una acción médica rápidamente, la cual permitirá la mejora de la salud o la calidad de vida del paciente. El dispositivo point-of-care es el equipo que permite realizar la prueba POC. Algunos autores también indican que es conveniente que el nombre de la prueba o dispositivo Point-of-care indique como se usa y donde se usa<sup>5</sup>.

Las pruebas y dispositivos POC tienen la potencialidad de mejorar el manejo de enfermedades, especialmente en lugares con escasa infraestructura para salud y donde no hay disponibilidad de médicos especialistas (caso de diagnóstico de Tuberculosis). O donde se requiera que el monitoreo sea realizado por el propio paciente en forma ambulatoria (monitoreo de pacientes con diabetes).

Estas pruebas ofrecen resultados rápidos permitiendo, si es necesario, que el paciente inicie lo más rápidamente posible el tratamiento y/o sea referenciado a un centro de salud. Lo más importante es que una prueba POC sea fácil de usar, de tal manera que sea usada para el diagnóstico de primera línea, por ejemplo en zonas remotas, en las cuales no tienen las facilidades para hacer análisis de laboratorio. Es más, las pruebas POC puede potencialmente empoderar a los pacientes a través del auto diagnóstico a través del uso de estos dispositivos POC<sup>6</sup> en la privacidad de sus casas.

### 1.3. Sistemas distribuidos de medición.

Los sistemas distribuidos de medición son un conjunto de equipos de medida distribuidos geográficamente, estos pudiendo estar o no conectados a una estación, a varias estaciones o entre sí. Éste concepto se complementa perfectamente con el concepto de Point-Of-Care. Con equipos POC es posible realizar sistemas distribuidos, los cuales podrían facilitar el diagnóstico de Tuberculosis en lugares alejados, donde no hay especialistas y también podrían facilitar el monitoreo, alerta y estadísticas del estado de un paciente diabético.

El objetivo de la presente tesis es desarrollar dispositivos basados en microfluídica, fotónica y óptica que puedan ser usados como sistemas o parte de sistemas POC para su aplicación en sistemas distribuidos de medición y que permitan el monitoreo de concentración de glucosa así como posibiliten la detección temprana de tuberculosis.

La presente tesis está basada en los siguientes artículos en revistas internacionales indexadas así como en una contribución en una conferencia internacional (Anexo1).

Artículos:

- **G.Comina**, A.Suska, D.Filippini, (2014) *PDMS lab-on-a-chip fabrication using 3D printed templates*, **Lab Chip**, 14, 424-430.
- **Comina G**, Mendoza D, Velazco A, Coronel J, Sheen P, et al. (2011) *Development of an automated MODS plate reader to detect early growth of Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microscopy** 242: 325–330.
- Zimic M, Velazco A, **Comina G**, Coronel J, Fuentes P, et al. (2010) *Development of low-cost inverted microscope to detect early growth of Mycobacterium tuberculosis in MODS culture*. **PLoS One** 5: e9577. doi: 10.1371/journal.pone.0009577.

Conferencias:

- **G. Comina**, J.L. Solis, W. Estrada, *Low cost direct optical structuring of lab-on-a-chip devices using stamps photopolymer*, 5th annual Lab-on-a-Chip European Congress, 30 June - 1 July 2011 Hamburg, Germany. (Poster)

## **Capítulo 2**

### **Fundamento Teórico**

---

En el presente capítulo se dan conceptos en micro-fabricación de Lab-on-a-chip, microfluídica, óptica para observación de muestras biológicas, tratamiento digital de imágenes así como conceptos estadísticos para la interpretación de resultados, los cuales son usados en la parte experimental descrita en los Capítulos 3 y 4.

## 2.1. Dispositivos Lab-on-a-chip (LOC)

La micro-fabricación es una tecnología madura, la cual permite el desarrollo de sistemas micro-electromecánicos (MEMs) a través de la micro-estructuración de superficie<sup>7</sup>. Sin embargo, para ello se requiere de instalaciones y equipos sofisticados, además de diseñadores especializados y un planeamiento de operaciones muy elaborado con un presupuesto elevado.

Los dispositivos Lab-on-a-chip (LOC) son un subconjunto de MEMs los cuales permiten el desarrollo de métodos avanzados para el manejo y medición de muestras.

La microfluídica es la combinación de la ciencia encargada del estudio del comportamiento de fluidos a escala micro y nanométrica junto al diseño, simulación y fabricación de dispositivos para el transporte, entrega y manejo de fluidos con volúmenes del orden de  $\mu\text{L}$  o menores<sup>8</sup>. Los dispositivos LOC para micro-fluídica permiten manejar y hacer mediciones a muestras líquidas con volúmenes en el rango de  $\mu\text{L}$ .

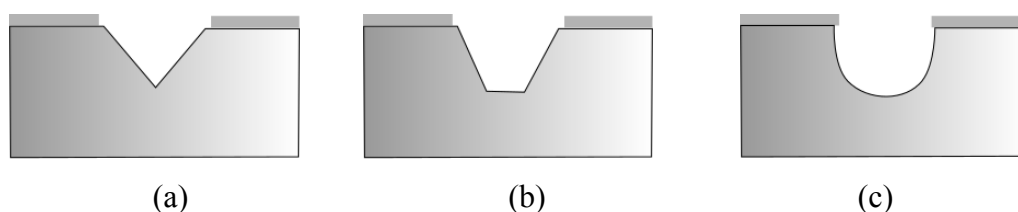
Existen diferentes métodos para la fabricación de dispositivos para microfluídica ( $\mu\text{f}$ ), los cuales dependen del material a partir del cual se hace la micro/nano fabricación. Los materiales más comunes son silicio, vidrio, polímeros y papel.

## 2.2 Métodos clásicos para fabricación de dispositivos Lab-on-a-chip para microfluídica.

### 2.2.1 Fabricación de estructura para microfluídica en silicio.

La estrategia de fabricación consiste en crear sobre el silicio una máscara hecha de dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) o nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), para proteger las áreas del silicio que no van a ser modificadas. Luego los micro canales y estructuras son grabadas en el silicio directamente por erosión usando reactivos químicos<sup>9</sup>, como hidróxido de potasio (KOH), tetrametil amonio hidroxido (TMAH) y etileno diamida (TDP). La razón de erosión para éste tipo de reactivos depende de la orientación de los planos cristalinos del silicio, presentando una menor velocidad para el plano (1 1 1). A éste tipo de grabado se

le conoce como grabado anisotrópico en medio líquido (anisotropic wet etching). También es común usar ácido hidrofluorídrico-nítrico-acético (HNA), que es una combinación de ácido hidrofluorídrico (HF), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) para estructurar al silicio por erosión. Sin embargo, en éste caso la erosión se realiza en todas direcciones sin preferencias. A éste tipo de grabado se le conoce como grabado isotrópico en medio líquido (isotropic wet etching). Las diferencias entre los dos tipos de grabado se observan en la Figura 1.



**Figura 1.** (a) Grabado anisotrópico con un tiempo de erosión grande, (b) grabado anisotrópico con un tiempo de erosión pequeño, (c) grabado isotrópico.

También es posible realizar los grabados en seco, bombardeando iones que reaccionan con la superficie del silicio (reactive ion etching, RIE). En éste caso, se usa radio frecuencia para ionizar un gas, éstos iones con energías adecuadas generan cambios físicos y reacciones químicas sobre el sustrato. Éste método puede realizar grabados isotrópicos y anisotrópicos dependiendo de las condiciones del sustrato, del plasma y de la energía aplicada<sup>10</sup>.

En éstos métodos se necesita usar una máscara que dará el patrón necesario para evitar que los elementos erosivos graben ciertas partes del silicio. Estas máscaras requieren una preparación, equipos y ambientes adecuados, cuarto limpio con facilidades de cuarto oscuro, sputtering de alto vacío, equipos para wet etching, equipos para proyección en ultra-alta-resolución, etc. Para el proceso de grabado en medio líquido las máscaras se hacen por lo general a través de un proceso fotográfico, denominado fotolitografía, el cual involucra el uso de un polímero resistente a los ácidos (photoresist). Para el proceso de grabado en seco, se usa una máscara sólida fabricada principalmente en cromo, con agujeros y ranuras que dejan pasar a los iones que erosionaran la superficie del silicio. Los agujeros y ranuras deben ser del tamaño de las estructuras micro/nano-métricas y deben ser fabricados ultra-alta-resolución.

### 2.2.2 Fabricación en vidrio.

El grabado se realiza erosionando la superficie del vidrio a través del uso de soluciones químicas<sup>11</sup> como ácido hidrofúorídrico (HF) o HF en combinación con ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) y agua. Debido a que el vidrio no tiene una estructura cristalina, el perfil de los canales obtenidos es del tipo isotópico.

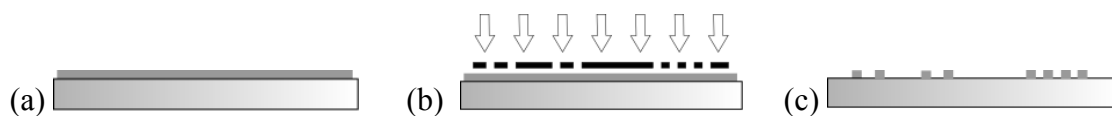
En éste tipo de fabricación se usan máscaras de oro y cromo fabricadas con canales y agujeros con los tamaños que deberán tener las micro/nano estructuras sobre el vidrio. El problema del vidrio como material es, la falta de reproducibilidad en los microcanales, causada por que el estrés mecánico entre las superficies del vidrio induce una erosión en direcciones preferenciales.

### 2.2.3 Fabricación en polímero.

Actualmente los materiales poliméricos se han convertido en los más promisorios para el desarrollo de Lab-on-a-chips, debido a su bajo costo, fácil fabricación y compatibilidad bioquímica. Los materiales como el poli-metil metacrilato (PMMA) y el poli-dimetil siloxano (PMDS) son ampliamente usados para el desarrollo de estructuras para microfluídica. Sin embargo para la micro/nano fabricación éstos LOC en base a polímeros se necesita también de una máscara sobre el cual se dan los procesos de polimerización y/o endurecimiento. Las máscaras se fabrican usando: litografía suave (soft lithography), galvanoplastía en silicio y grabado por iones reactivos<sup>9</sup>.

En la litografía suave, se usa una técnica de recubrimiento para esparcir sobre un sustrato un reactivo químico sensible a la luz y que se endurece cuando le llega luz (photoresist positivo). Posteriormente se proyecta una imagen binaria de ultra-alta-resolución con longitud de onda en el rango UV, esto endurece al photoresist en las zonas transparentes definidas por la imagen. Posteriormente el conjunto se revela usando un solvente que elimina todo el photoresist que no fue iluminado con luz UV, quedando sobre el sustrato la máscara que será usada para fabricar LOCs de polímeros. El proceso de fabricación se observa en la Figura 2.





**Figura 2.** (a) La capa de photoresist se ha esparcido sobre el sustrato (región oscura), (b) se proyecta una imagen binaria (luz/oscuridad) sobre el conjunto photoresist-sustrato, (c) se revela al conjunto quedando las estructuras correspondientes a las zonas iluminadas con luz UV.

La fabricación de LOCs en plástico usando PDMS involucra la creación de la mezcla monómero: elastómero en razón 10:1. Luego de colocar la mezcla de PDMS en una cámara de bajo vacío para quitarle el gas contenido en la misma, se la vierte sobre el molde fabricado por litografía suave y el conjunto se lleva a un horno para la curación del PDMS. Luego se separan el molde de la estructura de PDMS quedando el PDMS micro/nano estructurado (ver Figura 3).



**Figura 3.** (a) Vaciado de PDMS sobre un molde. (b) Curado del PDMS. (c) Estructura de micro/nano-fluídica para LOC en PDMS.

Si bien es cierto, ésta técnica es muy usada actualmente para la fabricación de LOCs, requiere de la fabricación de una máscara, la cual usa photoresist, spin-coating e instalaciones de cuarto oscuro y para dimensiones pequeñas necesita un cuarto limpio.

#### 2.2.4 Fabricación de estructuras LOC para microfluídica usando papel.

Las pruebas para bioanálisis usando sustratos de papel datan de inicio del siglo veinte, donde la contribución más importante la dieron Martin and Synge (Premio nobel en química 1959) cuando inventaron la cromatografía en papel.

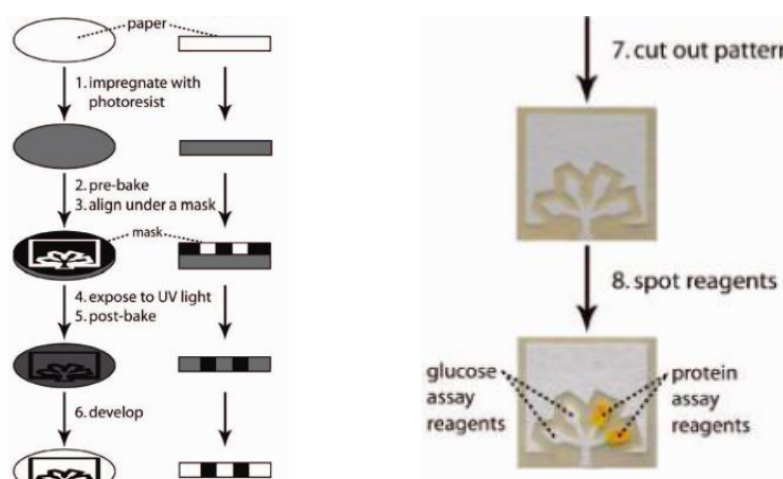
En el año 2008 Whitesides et.al.<sup>12</sup> reportaron el uso de un photoresist hidrófobo para definir paredes de separación en un sustrato de papel, además de la inclusión de compuestos para la detección colorimétrica de proteínas.

Estos dispositivos para microfluídica basados en papel combinan la simplicidad de la cromatografía en papel con la complejidad de los dispositivos LOC, éste concepto se conoce ahora como Lab-on-a-Paper (LOP)<sup>12</sup>.

Actualmente se reportan diferentes métodos para generar paredes de material hidrófobo en sustratos de papel de tal manera de definir canales. Sin embargo dichos procesos de fabricación se basan en el uso un photoresist (ver Figura 4).

Uno de los procesos de fabricación se basa en impregnar a un sustrato de papel con photoresist hidrófobo, y luego de usar una máscara y luz UV para crear zonas hidrófobas para estructurar regiones donde el líquido pueda impregnarse. El otro proceso involucra el uso de una impresora de cera para crear dichas estructuras. Sin embargo la limitación de LOP radica en que solo puede resistir una carga de líquido, luego de ello el LOP se vuelve inservible.

Luego se recorta a la forma deseada y se agrega los reactivos necesarios para hacer la detección (ver Figura 8).



**Figura 4.** Proceso de fabricación de LOC usando papel desarrollado y descrito en la referencia <sup>12</sup>.

### 2.3 Modelamiento de un fluido incompresible que viaja a través de un canal de un dispositivo de microfluídica.

Los canales de los dispositivos desarrollados en la presente tesis pueden modelarse como uno de dos tipos: de sección transversal circular (para el caso de los dispositivos fabricados con el fotopolímero) y de sección transversal rectangular (en el caso de los dispositivos fabricados con una impresora 3D).

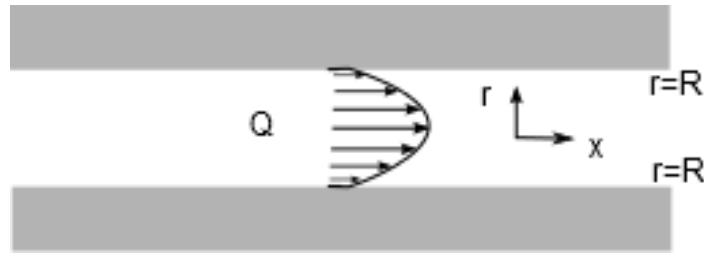
Una solución acuosa que viaja a través de un sistema de microfluídica puede considerarse incompresible<sup>13</sup>. La ecuación de Navier-Stockes (Ec.(1)) relaciona el cambio de momentum con las fuerzas que actúan en un fluido incompresible y de viscosidad constante, como la fuerza debido a la convección, debidas a la presión y a la viscosidad.

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = -\rho \vec{u} \nabla \vec{u} - \nabla p + \eta \nabla^2 \vec{u} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde  $\vec{u} = \vec{u}(\vec{r}, t)$ , es la velocidad del fluido [ $\text{m s}^{-1}$ ] en una posición [m] en un tiempo [t] determinado;  $\rho$  es la densidad del fluido [ $\text{Kg m}^{-3}$ ],  $\eta$  es la viscosidad [Pa.s], y  $p$  es la presión [Pa]. La viscosidad de un fluido cambia con la temperatura, de tal manera que es menos viscoso a mayor temperatura. Para éste modelo teórico se considerará que la viscosidad es constante.

Si se considera un microcanal cilíndrico (ver Figura 5), el cual contiene a un fluido en estado estacionario, la velocidad será unidireccional y laminar, además no existe aceleración en el fluido. Bajo esas condiciones la Ec. (1) puede ser escrita como:

$$\nabla p = \eta \nabla^2 \vec{u} \quad \text{Ec. (2)}$$



**Figura 5.** Microcanal cilíndrico, donde  $Q$  es el caudal del fluido [ $m^3 s^{-1}$ ].

La Ec.(2) describe el balance entre la fuerza neta debido a la presión y la fuerza neta debido a la viscosidad. En éste caso el fluido se mueve exclusivamente por la diferencia de presión entre los extremos del canal, y la fuerza debido a ésta presión está balanceada con la generada por la viscosidad, a éste tipo de fluido que viaja por canales bajo éstas condiciones de le denomina fluido de Poiseuille. Se puede solucionar la ecuación Ec.(2), considerando las condiciones de frontera:  $u=0$  en  $r=R$ , obteniéndose:

$$u = \frac{R^2 - r^2}{4\eta} \left( -\frac{dp}{dx} \right) = u_{max} \left( 1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \quad \text{Ec.(3)}$$

Donde  $u_{max}$  es la velocidad máxima  $u_{max} = \frac{R^2}{4\eta} \left( -\frac{dp}{dx} \right)$  en  $r=0$ .

Un fluido de Poiseuille se caracteriza por un perfil parabólico del valor de las velocidades. El valor de la velocidad del fluido es mayor en el centro que en las posiciones cercanas a las paredes del canal.

La ley de Hagen–Poiseuille determina la relación que existe entre el caudal y la presión en un fluido de Poiseuille que viaja en un canal de sección transversal circular y de longitud infinita.

$$Q = \frac{\pi R^4}{8\eta} \left( -\frac{dp}{dx} \right) \quad \text{Ec.(4)}$$

En los dispositivos de microfluídica, la longitud de los canales es mucho mayor que el diámetro que los mismos, por tanto la ecuación Ec.(4) puede escribirse como:

$$Q = \frac{\pi R^4 \Delta p}{8\eta L} \quad \text{Ec.(5)}$$

Donde  $\Delta p$  es la diferencia de presiones entre los extremos del canal de longitud  $L$ <sup>14</sup>.

La ecuación Ec.(5) también puede escribirse como:

$$\Delta p = QR_H \quad \text{Ec.(6)}$$

Donde se define la Resistencia Hidráulica  $R_H$  como:

$$R_H = \frac{8\eta L}{\pi R^4} \approx \frac{8\eta L}{\pi r_H^4} \quad \text{Ec.(7)}$$

Donde  $r_H$  [m] es el radio hidráulico del canal y se define como  $r_H = 2A/P$ , donde  $A$  [m<sup>2</sup>] es el área transversal del canal, y  $P$  es el perímetro del canal que ha sido “mojado” por el líquido.

En los canales circulares  $r_H = R$ , por tanto  $R_H$  se obtiene de la Ec. (7), mientras que para canales rectangulares de altura  $h$  y ancho  $w$  se tiene que<sup>15</sup>:

$$R_H = \frac{12\eta L}{wh^3 \left(1 - \frac{h}{w} \left(\frac{192}{\pi^5} \sum_{n=1,3,5}^{\infty} \frac{1}{n^5} \tan h\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)\right)\right)} \quad \text{Ec.(8)}$$

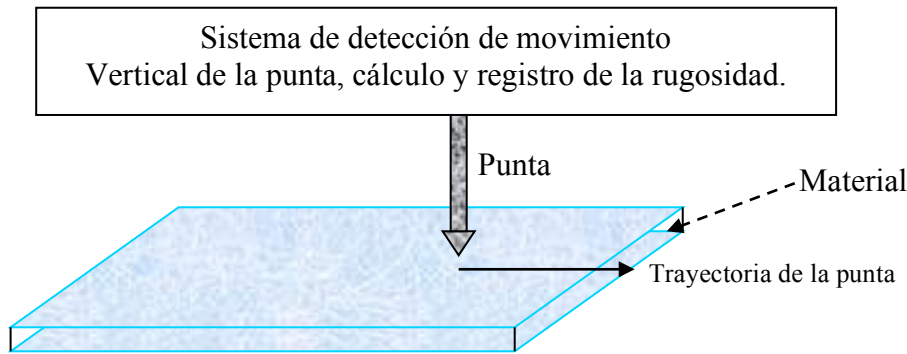
## 2.4 Equipos para caracterización de materiales.

### 2.4.1 Perfilómetro.

El perfilómetro (profilometer) es un dispositivo que utiliza un método mecánico, también conocido en la literatura como método stylus<sup>16, 17</sup>, para la determinación de la rugosidad de una muestra.

El método stylus consta en usar una punta muy fina, con la cual barre la superficie a ser investigada y monitorea el desplazamiento vertical de la punta ver Figura 6.

La punta se encuentra suspendida normalmente a la superficie. Si existiese alguna irregularidad es registrada por el movimiento de la punta. La incertidumbre de medida con un perfilómetro es en promedio 5nm. En la presente tesis se usó el perfilómetro Dektak 6, Veeco Instrument Inc.



**Figura 6.** Esquema de donde se observa a la punta del perfilómetro barriendo una línea sobre el material por analizar.

#### 2.4.2 Microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido (SEM), es un instrumento diseñado para observar con alta resolución la superficie de sólidos obteniendo imágenes de dicha superficie<sup>17</sup>.

El cañón de electrones genera un haz de electrones ,(ver Figura 7) los cuales son acelerados con un potencial de varios miles de voltios (típico de 10kV a 20kV), el cual pasa a través de las lentes condensadoras; dichas lentes son bobinas, las cuales reducen el área transversal del haz.

Las bobinas de barrido deflexionan el haz de electrones haciendo que la posición de impacto del haz cambie sobre la muestra.

Los electrones retrodispersados de la interacción del haz electrónico con la muestra, son captados por el detector.

La señal eléctrica del detector se amplifica y controla el tubo de rayos catódicos (Pantalla TRC) del monitor, donde genera un punto en la pantalla. Luego aplicando una muestra de la señal de barrido a la pantalla, se consigue que el punto que aparece en la pantalla se mueva reproduciendo el patrón de barrido y así generando una imagen que corresponde a la morfología de la superficie barrida por el haz.

La imagen generada de esa manera se denomina micrografía y usando un SEM se pueden resolver imágenes de hasta 10nm.

Para poder obtener micrografías SEM la muestra debe tener una resistencia eléctrica baja ( $\sim 10\Omega$ ) y además todo el sistema debe estar al vacío ( $\sim 10^{-4}\text{Pa}$ ). Si la muestra no posee una baja resistencia eléctrica se le recubre con una película metálica. En el presente trabajo se utilizó el dispositivo de recubrimiento por sputtering marca Electrón Microscopy Sciences Mod EM550 y el SEM Phillips 505.

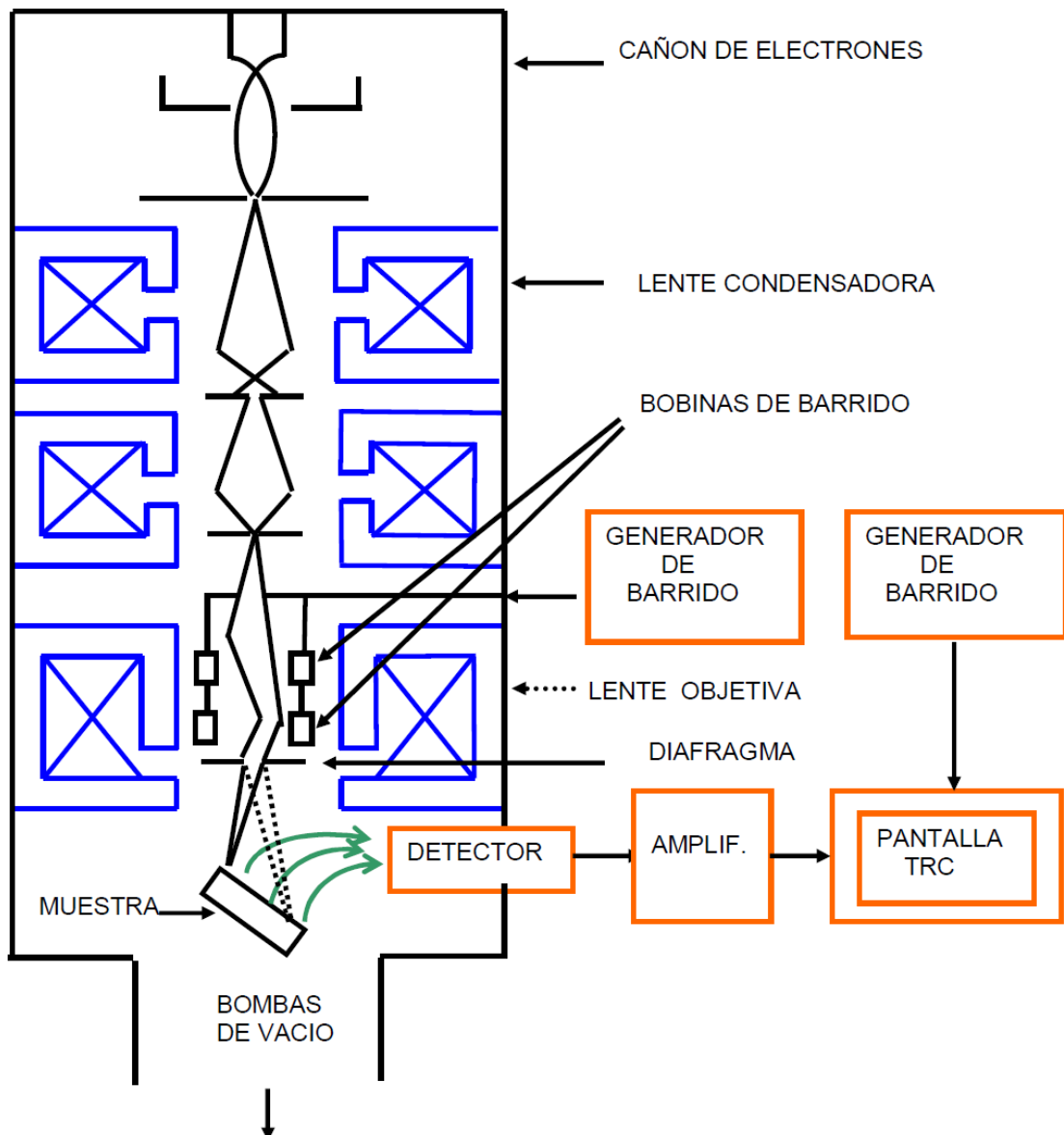


Figura 7. Diagrama esquemático de un Microscopio electrónico de barrido (SEM).

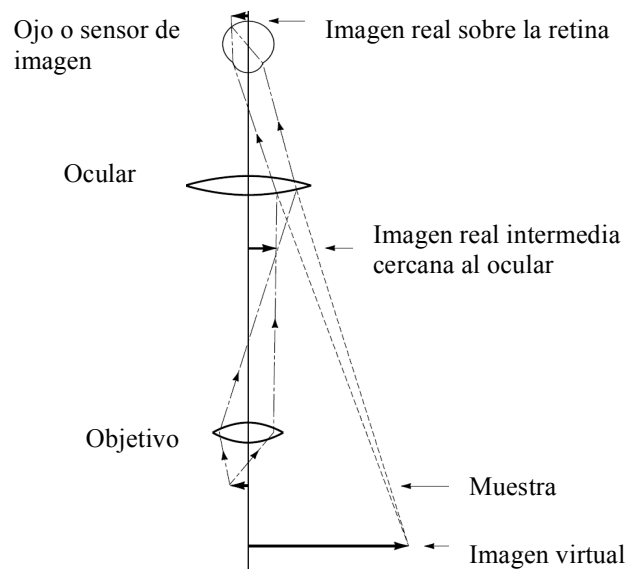
## 2.5 Microscopios ópticos.

Un microscopio de luz compuesto es un instrumento óptico que usa luz visible para producir una imagen magnificada de un objeto (o muestra), la cual se proyecta en la retina del observador o en un dispositivo para adquisición de imágenes (ej. Cámara digital). El término compuesto se refiere a que usa dos lentes, el lente objetivo y el lente ocular, dichos lentes trabajan en conjunto para producir una imagen magnificada del objeto.

La magnificación total es el producto de las magnificaciones de los lentes<sup>18</sup>:

$$M_{Final} = M_{Objetivo} \times M_{Ocular} \quad \text{Ec.(9)}.$$

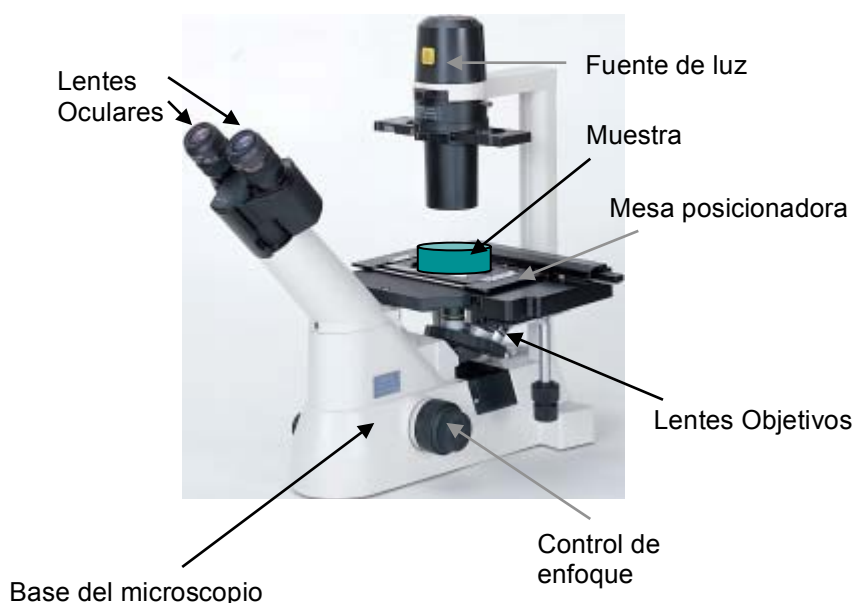
El lente objetivo, el cual colecta la luz que pasa a través de la muestra (Figura 8), forma una imagen real intermedia en un plano cercano a la lente ocular. Cuando se observa a través del lente ocular, este lente proyecta una imagen real sobre la retina (o sensor de imagen), donde es percibida o interpretada por el cerebro como una imagen virtual magnificada.



**Figura 8.** Percepción de una imagen virtual magnificada de la muestra en el microscopio. El lente objetivo forma una imagen ampliada de la muestra (imagen real intermedia) en la vecindad del lente ocular, con el cual forma una imagen real en la retina o sensor de imagen.



Un microscopio invertido (Figura 9) es aquel microscopio donde la fuente de luz se encuentra en la parte superior e ilumina a la muestra, la luz pasa a través de la muestra y llega al lente objetivo donde en conjunto con el lente ocular forman la imagen de la muestra. Éste microscopio tiene la ventaja de que se pueden observar muestras que están en un cultivo líquido, las cuales por lo general se depositan en el fondo del recipiente, de ésta manera se evita la interferencia del medio y además se optimiza la distancia a la cual debe ir el lente objetivo de la muestra.



**Figura 9.** Microscopio invertido Nikon TS100, equipo estándar validar los prototipos ópticos para detección de TB desarrollados en la presente tesis.

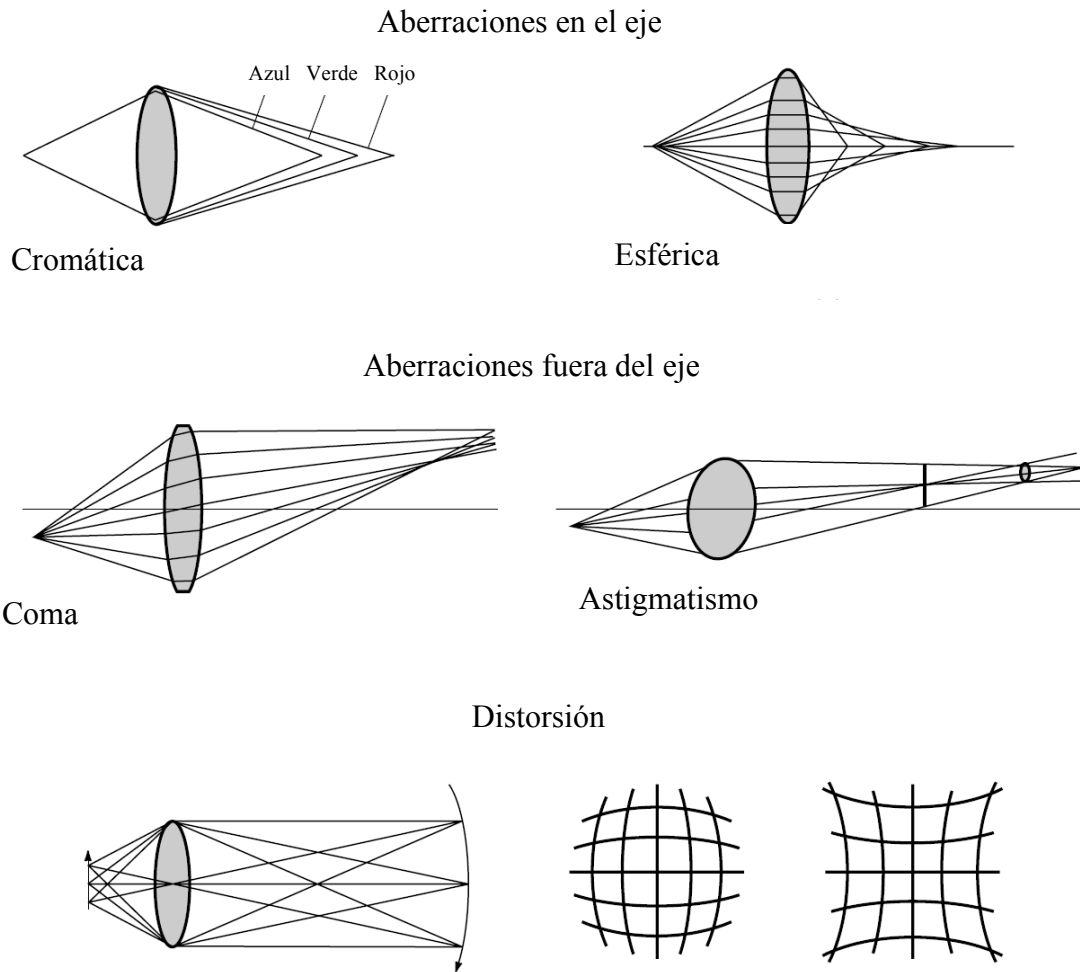
## 2.6 Aberraciones en lentes.

Las aberraciones de las lentes pueden presentarse sobre el eje óptico (Figura 10), así tenemos las aberraciones cromáticas, cuando los rayos paralelos incidentes con diferente longitud de onda se enfocan en diferentes puntos. Las aberraciones esféricas, cuando los rayos incidentes paralelos al eje óptico llegan al centro y la periferia de la lente son enfocadas en posiciones diferentes.

También las aberraciones pueden presentarse fuera del eje óptico, como la aberración de coma, cuando los rayos incidentes pasan por el centro y la periferia de la lente son

enfocados en diferentes direcciones. El Astigmatismo causa que los rayos que pasan a través de los diámetros horizontal y vertical enfocan un punto del objeto como una raya.

En las distorsiones la imagen se curva y se reduce el parecido entre la imagen y el objeto.



**Figura 10.** Aberraciones en lentes.

En los lentes comerciales (lente ocular, lente objetivo) se reducen al mínimo éstas aberraciones, usando un buen diseño óptico (Figura 11 (a) y (b)).

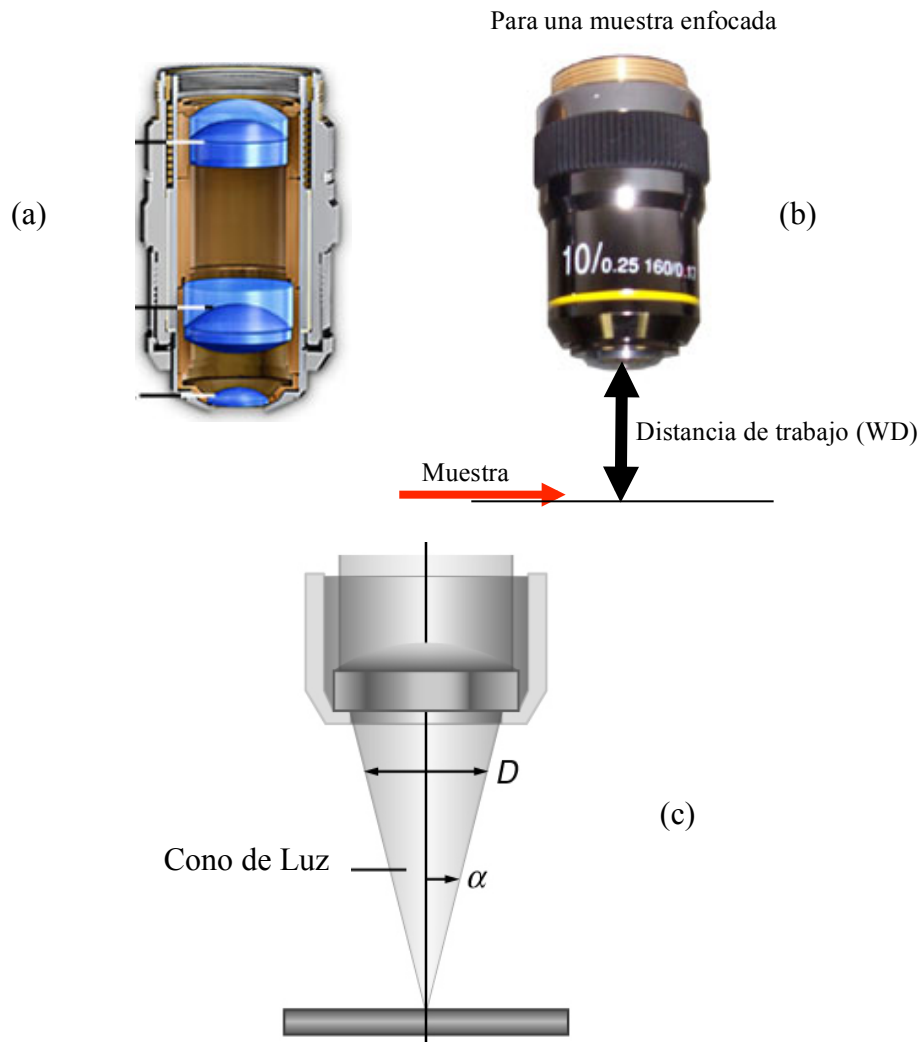
## 2.7 Parámetros de lentes objetivo.

Los principales parámetros de las lentes objetivo son la distancia de trabajo (WD) y la apertura numérica (N.A)

La distancia de trabajo (WD) es la distancia a la cual debe colocarse la muestra para tener una imagen enfocada.

La apertura numérica (N.A) se calcula con la Ec.(10), donde “n” es el índice de refracción del medio entre la lente y la muestra y “ $\alpha$ ”, es la mitad de ángulo entre el eje óptico y el extremo del cono de luz (Figura 11).

$$N.A = n \text{Sen}(\alpha) \text{ Ec.(10)}$$



**Figura 11.** (a) Estructura de una lente acromática con 3 elementos. (b) Lente acromática mostrando la distancia de trabajo. (c)Detalle del lente objetivo, el cono de luz y el ángulo usado para calcular la apertura numérica (N.A).

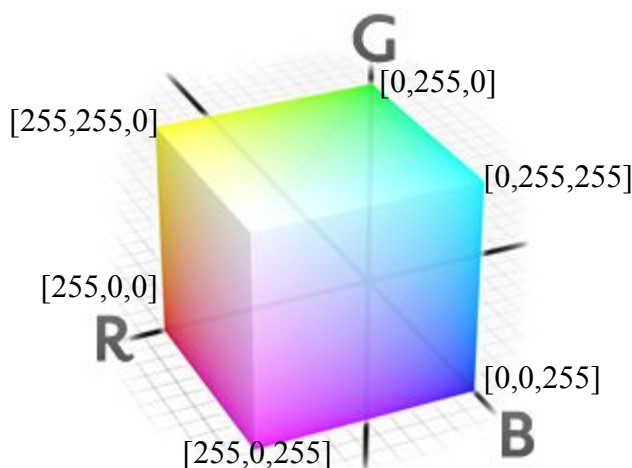
## 2.8 Smartphones como plataforma para mediciones ópticas.

El modelo de color RGB (R, rojo ; G, verde; B, azul) indica que todos los colores se pueden generar a través de la combinación de luces de color rojo, verde y azul de diferentes intensidades. Éste modelo es utilizado para generar los colores en las pantalla de LED, LCD, Plasma, etc. Además los sistemas de captura de imágenes como las cámaras digitales también usan éste modelo para codificar la imagen en una matriz de datos digitales.

Los valores de la intensidad de luz de los colores rojo (R), verde (G) y azul (B) crean un espacio matemático llamado espacio de color (ver Figura 12). Los valores de intensidad van desde 0% hasta 100%, sin embargo dependiendo del software usado para controlar los colores del monitor estos valores pueden ser representados por un número entre 0 y 1, ó un número entero entre 0 y 255 (caso de detectores de 8 bits por canal, que es el caso de cámaras de teléfonos móviles).

En el presente trabajo se usará un número entero 0 a 255 y en el formato de la ecuación (11):

$$Color = [r, g, b]; r, g, b \in [0..255] \quad Ec.(11)$$



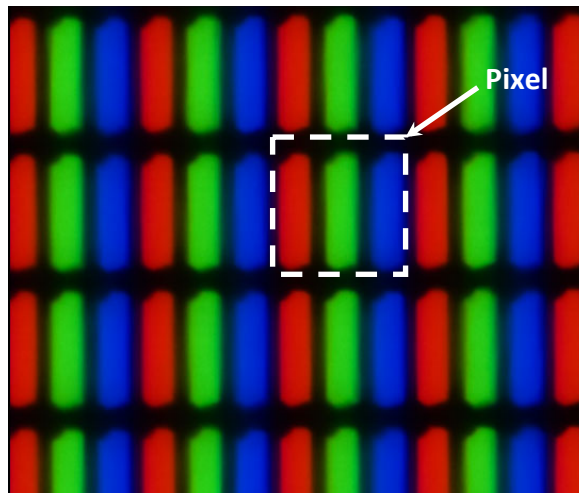
**Figura 12.** Espacio RGB para los colores generados por el monitor.

Los colores generados por una pantalla de un Smartphone o de una PC pueden ser programados directamente por cualquier lenguaje de programación adecuado para el sistema operativo usado. De ésta manera se pueden generar colores con los cuales se pueden iluminar muestras.

Un pixel se define como la mínima cantidad de imagen que puede ser controlada por el software. El tamaño de un pixel no necesariamente es el mismo siempre, dos fotos

vistas en un mismo monitor pero tomadas con cámaras de diferente resolución podrían verse del mismo tamaño en el monitor.

La resolución máxima de un monitor consta del producto del número de los elementos más pequeños donde cada uno de ellos puede cambiar de color de acuerdo a la ecuación Ec.(11). Por ejemplo una resolución de 1024x768 pixels significa que la pantalla posee 1024x768 elementos. Éste elemento consta de tres emisores de luz, uno de color rojo otro verde y otro azul (ver Figura 13). Cada uno de estos emisores de luz puede cambiar de intensidad independientemente por software.



**Figura 13.** Emisores de luz programables de un monitor LCD.

El color emitido por un monitor es la combinación lineal de la irradiancia de los tres colores primarios  $R(\lambda)$ ,  $G(\lambda)$  y  $B(\lambda)$ <sup>19</sup>:

$$C_q(\lambda) = r_q \cdot R(\lambda) + g_q \cdot G(\lambda) + b_q \cdot B(\lambda) \quad \text{Eq.(12)}$$

Donde los parámetros  $r_q, g_q, b_q$  son los moduladores de la iluminación  $q$ . Donde  $q \in [1..S]$ ,  $\lambda \in [390nm, 700nm]$ . Donde  $S$  es el número de colores emitidos.

La cámara de un teléfono (ej. Smartphone) está compuesta por un sistema óptico, un sensor CMOS y el software necesario para el control de la cámara. Las siglas CMOS significan Complementary Metal Oxide Semiconductor que es la tecnología de fabricación que se usa para producir éstos sensores.

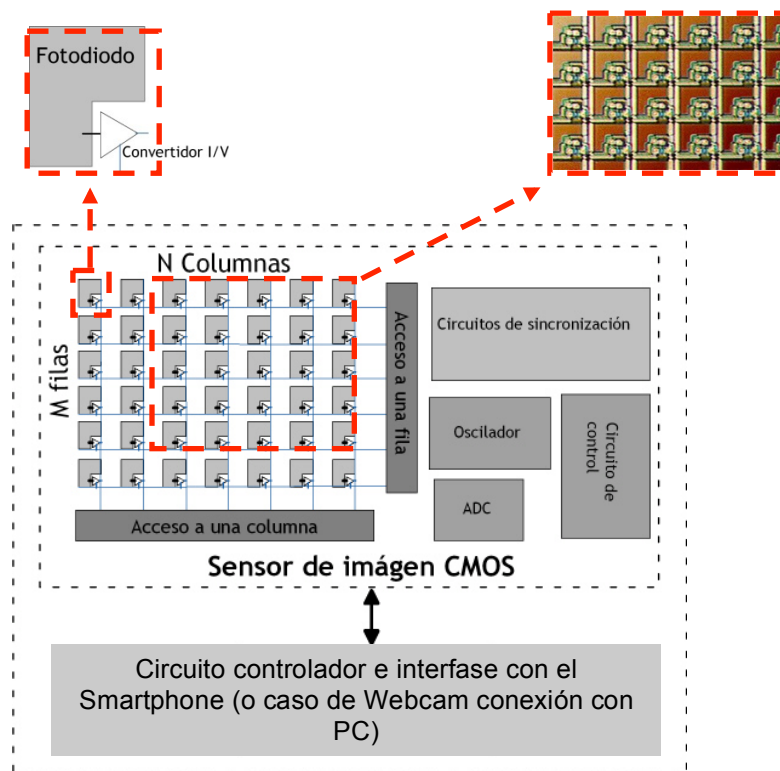
El sistema óptico está formado por una o varias lentes que enfocan al objeto sobre la superficie del sensor CMOS. Además de las lentes existe un filtro que impide el paso de la luz con una longitud de onda por encima de 700nm. La respuesta espectral de una cámara en un Smartphone por lo general está entre 390nm y 700nm.

El sensor de imagen CMOS es una matriz de fotodiodos aunada a un sistema electrónico que permite la digitalización de una imagen. En la Figura 14 se muestra el esquema de una webcam donde se muestra el sensor CMOS.

El sensor de imagen CMOS está formado por un conjunto de fotodiodos y convertidores corriente voltaje (I/V) ordenados en “M” filas y “N” columnas. Cuando se enfoca la imagen sobre el sensor CMOS, cada uno de los fotodiodos recibe luz con cierta intensidad. La luz llega a la juntura del fotodiodo, se genera una interacción fotón-electrón, cada fotón le da la energía necesaria a un electrón para que pueda vencer la barrera de potencial definida en la juntura, generándose una corriente. A mayor intensidad de luz se incrementa la probabilidad de que un electrón venza la barrera de potencia y alcance la banda de conducción, por tanto el número de interacciones también se incrementa, incrementándose el voltaje a la salida de conversor I/V. Por tanto a mayor intensidad de luz mayor voltaje.

Los circuitos de acceso a fila y columna permiten obtener el valor de voltaje de cada elemento ubicado en cierta fila y columna. Éste voltaje ingresa a un convertidor analógico-digital el cual transforma éste voltaje en una palabra digital. Los circuitos de sincronización, oscilador y de control permitan acceder en secuencia a todos los elementos fotodiodo-convertidor, permitiendo obtener una matriz de datos digitales de voltajes ( $p_{i,j}$ ) que representan a la imagen del objeto. La imagen entonces se puede representar por una matriz I:

$$I = p_{i,j} ; i \in [1..M], j \in [1..N] \quad \text{Eq. (13)}$$



**Figura 14.** Diagrama simplificado de una Cámara de un Smartphone.

La imagen I, así generada es una imagen en escala de grises y no tiene ninguna información acerca del color del objeto.

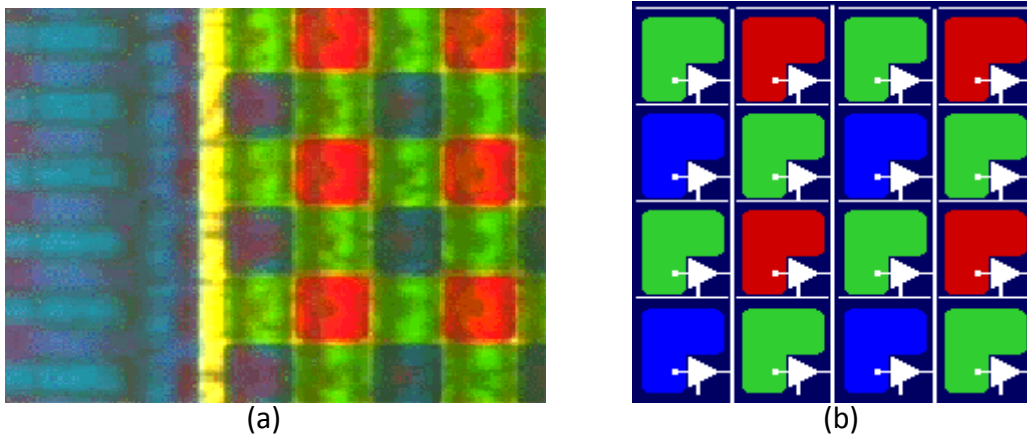
Se utiliza nuevamente el modelo de color RGB para registrar una imagen a color. En éste caso la filosofía de trabajo consiste en que el sensor de imagen se comporte como la retina del ojo humano, donde para cada posición  $(i,j)$  deberían existir tres sensores, cada uno de ellos sensible a una región del espectro electromagnético entre 400nm y 600nm. De ésta manera tener uno de ellos que sea sensible a la luz con longitud de onda baja (“rojo”, máximo de absorción entre 564-580nm) el cual correspondería al pigmento bio-fotosensible “L” de un cono de la retina. El siguiente, a la luz con longitud de onda media (“verde”, máximo de absorción entre 534-545nm) el cual correspondería al pigmento bio-fotosensible “M”. Y el último sensible a la luz con longitud de onda pequeñas (“azul”, máximo de absorción entre 420-440nm) el cual correspondería al pigmento bio-fotosensible “S”.

Por ello los sensores de imagen CMOS a color poseen un recubrimiento delgado fabricado sobre el arreglo de fotodiodos, llamado “Filtro de Bayer” (ver Figura 14). De tal manera que cada fotodiodo está cubierto por un recubrimiento que solo deja pasar un

rango de longitudes de onda entre 390nm y 700nm, de la misma manera que sucede en el ojo humano. Cada fotodiodo está detrás de un filtro rojo (R), o verde (G) o azul (B).

La imposibilidad de colocar en una misma posición (i,j) tres fotodiodos con filtro RGB, hace que se requiera interpolar valores de fotodiodos cercanos para cada posición (i,j) y esté representada por una terna de valores (r<sub>i,j</sub>, g<sub>i,j</sub>, b<sub>i,j</sub>). De tal manera que una imagen a color cuya resolución es MxN, está representada por la hyper-matriz I<sub>MxNx3</sub> donde<sup>20</sup>:

$$I_{M \times N \times 3} = [r_{i,j}, g_{i,j}, b_{i,j}]; i \in [1..M], j \in [1..N] \quad \text{Ec.}(14)$$



**Figura 15.** (a) Filtro de bayer colocado sobre el arreglo de fotodiodos del sensor de imagen CMOS. (b) Esquema de los fotodiodos y convertidores.

Un video es un conjunto de fotografías (frames) las cuales se toman con cierta frecuencia, de tal manera que un video está determinado por la cantidad fotos se toman por segundo (Frame/segundo). Un video queda representado por una hipermatriz

$$I_{M \times N \times 3 \times F} = [r_{i,j}, g_{i,j}, b_{i,j}]_F; i \in [1..M], j \in [1..N], F: \text{frames} \quad \text{Ec.}(15)$$

La pantalla del Smartphone se puede usar por tanto como una fuente de luz, mientras la cámara se puede usar como elemento sensor para tomar una foto y determinar características geométricas de la muestra o tomar un video y monitorear el cambio dinámico en la absorbancia de la muestra.

Cuando se desea caracterizar una muestra usando imágenes capturadas con el celular e iluminadas con una pantalla LCD, se debe tener en consideración que en el tratamiento



de imágenes se realiza seleccionando una zona de interés, en donde se desea calcular la intensidad de luz que pasa a través de la muestra. En la presente tesis simplemente se calculó el promedio de los valores:  $g_{i,j}, \forall i, j \in \text{region de interés}$ , y esto se realizó para cada frame del video.

**2.9 Métodos estadísticos para la cuantificación de la concordancia entre mediciones hechas con diferentes observadores y diferentes instrumentos.**

Las pruebas médicas que involucran observación e interpretación de la muestras por personas están sujetas a error aleatorio. Las pruebas de diagnóstico dan una respuesta binaria (positivo o negativo). Cuando se comparan dos mediciones de las mismas muestras hechas con diferentes instrumentos o mediciones de las mismas muestras hechas con el mismo instrumento pero con dos observadores diferentes el nivel de concordancia tomando en cuenta el efecto del azar en la medida puede ser representado por el coeficiente Kappa de Cohen<sup>21</sup>. Si las mediciones hechas por dos observadores para una cierta prueba se representan como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Número de mediciones ( $n_{xx}, N_x$ ) hechas por dos observadores.

		Observador B		Total
		Positivo	Negativo	
Observador A	Positivo	$n_{11}$	$n_{10}$	$N_1$
	Negativo	$n_{01}$	$n_{00}$	$N-N_1$
		$N_2$	$N-N_2$	$N$

Donde  $N_1=n_{11}+n_{10}$  y  $N_2=n_{11}+n_{01}$ ,  $N=n_{11}+n_{01}+n_{10}+n_{00}$ .

Se define  $p_{ij}=n_{ij}/N$  como la frecuencia de probabilidad donde  $i=0,1, j=0,1$ . Sean  $p_1=p_{11}+p_{10}$  y  $p_2=p_{11}+p_{01}$  las probabilidades marginales para la primera y segunda apreciación (Observador A y Observador B, medida positiva). El coeficiente Kappa de Cohen viene dado por:

$$Kappa = \frac{I_0 - I_e}{1 - I_e} \quad \text{Ec.(16)}$$

Donde  $I_0=p_{11}+p_{00}$  es la proporción de concordancia observada y  $I_e=p_1p_2+(1-p_1)(1-p_2)$  es la proporción de concordancia esperada.

## **Capítulo 3**

### **Fabricación de dispositivos Lab-on-a-chip para microfluídica, y detección de glucosa en una solución**

---

En el presente capítulo se muestra el desarrollo de dispositivos Lab-on-a-chip (LOC) para microfluídica usando métodos económicos y prácticos, donde destaca el uso de una impresora 3D para hacer dispositivos LOC multicapa en Poli-dimetil-siloxano (PDMS) para la detección óptica de la concentración de glucosa en una solución en un rango de importancia médica (2.5mM-10mM). La adquisición de datos fue hecha usando un Smartphone y la variación temporal de la intensidad, relacionada con la concentración, fue medida con 33ms de resolución en tiempo y 0.039% de resolución en intensidad.

### **3.1 Desarrollo de métodos novedosos para la fabricación de dispositivos Lab-on-a-chip para microfluídica.**

En la presente tesis se desarrollaron dos métodos de fabricación, el primero usa un fotopolímero originalmente diseñado para la fabricación de sellos comerciales en conjunto con una máscara impresa con una impresora convencional sobre una transparencia y el segundo, más universal, usa una impresora 3D para crear moldes complejos que permiten la fabricación de LOCs en Polidimetilsiloxano (PDMS) material considerado estándar y usado en gran parte de los trabajos publicados sobre LOCs de microfluídica. Con ésta técnica no solo se pueden crear estructuras complejas, sino también LOCs multicapa.

#### 3.1.1 Fabricación de estructuras para Lab-on-a-chip de microfluídica usando fotopolímeros para sellos comerciales.

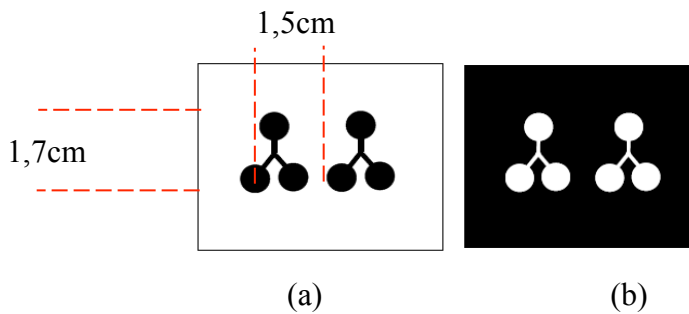
Ésta es una técnica para la fabricación de dispositivos de microfluídica desechables, la cual usa un fotopolímero originalmente concebido para hacer sellos comerciales y una fotomáscara impresa en papel. La resolución alcanzada (canales de  $760\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ ) convierte a éste concepto en una tecnología conveniente para configurar áreas de servicio compactas en dispositivos especializados de microfluidica o microestructuras de detección compatibles con dispositivos autónomos Lab-on-a-chip (LOC). Ésta técnica económica, y práctica para la fabricación de dispositivos compatibles con LOCs para microfluídica, fue reportada por G.Comina et.al.<sup>22</sup>.

El procedimiento de fabricación consta de cuatro partes:

a) Diseño y fabricación de máscara.

Se puede usar cualquier programa de diseño para fabricar la máscara la cual puede imprimirse en cualquier papel translúcido (papel vegetal) o transparencias (ver Figura 6). Dependiendo si la máscara es positiva o negativa se obtienen zanjás o protuberancias en el fotopolímero. Se mostró

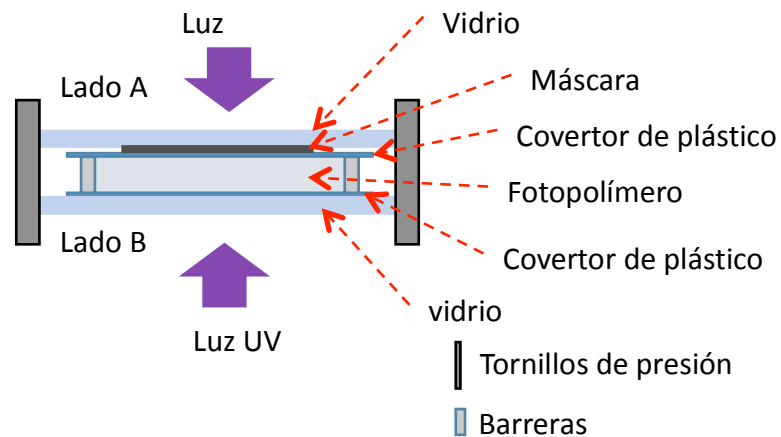
que éste hecho permite la fabricación y estructuración directa de los LOCs y de los moldes.



**Figura 16.** (a) Máscara positiva diseñada para la estructuración óptica directa 3D de estructuras LOC. (b) Máscara negativa para la fabricación de moldes para LOC.

b) Colocación del conjunto en la plataforma de fabricación.

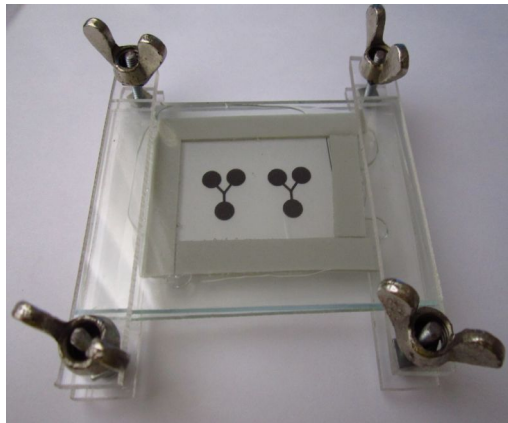
Para estructurar al fotopolímero se usa una plataforma, la cual consta de dos vidrios de 10 cm x 7 cm (Lado A y Lado B, ver Figura 17). Éstos están colocados en forma paralela, además de dos estructuras de sujeción hechas de acrílico con tornillos de ajuste. Ésta plataforma permite confinar al fotopolímero y a la máscara sobre él, debido al uso de barreras plásticas. Entre las interfaces máscara-fotopolímero y fotopolímero-vidrio se colocaron dos cobertores plásticos para evitar que el polímero se pegue al vidrio.



**Figura 17.** Diagrama de la plataforma de fabricación.

c) Irradiación.

Se pesa el polímero, y se lo coloca en la plataforma de fabricación. Luego se expone al conjunto a un tiempo  $t_a$  para el Lado A y  $t_b$  para el Lado B para una máscara positiva y  $t_b$  para el Lado A y  $t_a$  para el Lado B para la máscara negativa. La cantidad de polímero depende del tamaño de la máscara y varía entre diseños. En un trabajo anterior se usó  $t_a=40s$  y  $t_b=30s$ , sin embargo éstos valores dependen de la potencia de la luz UV que llega al conjunto y deben ser recalibrados en función de éste parámetro. En la Figura 18 se observa al conjunto fotopolímero-máscara, dispuestos en la plataforma de fabricación.



**Figura 18.** Plataforma de fabricación conteniendo fotopolímero y máscara.

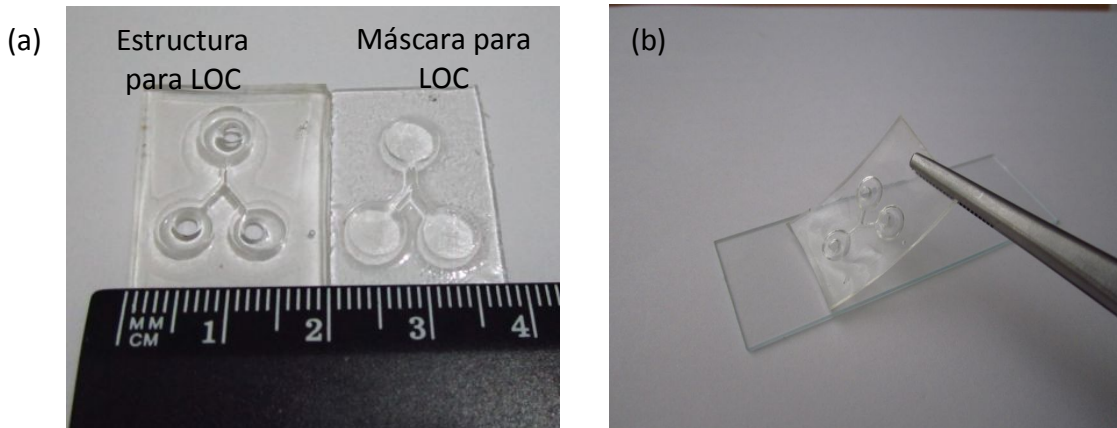
d) Lavado.

En éste proceso se usa agua y detergente para lavar mecánicamente la estructura creada. Dependiendo de los instrumentos usados para el lavado se generan rugosidades de diversa magnitud en las paredes de los canales creados y estructuras creadas.

### 3.1.2 Estructuración óptica directa de las estructuras LOC para microfluídica.

Se usó el proceso de fabricación descrito en la sección 3.1.1, con las dos máscaras descritas en la Figura 16, las cuales fueron impresas con una impresora láser (Samsung CLP-320 series ). Inmediatamente luego del proceso de lavado y secado,

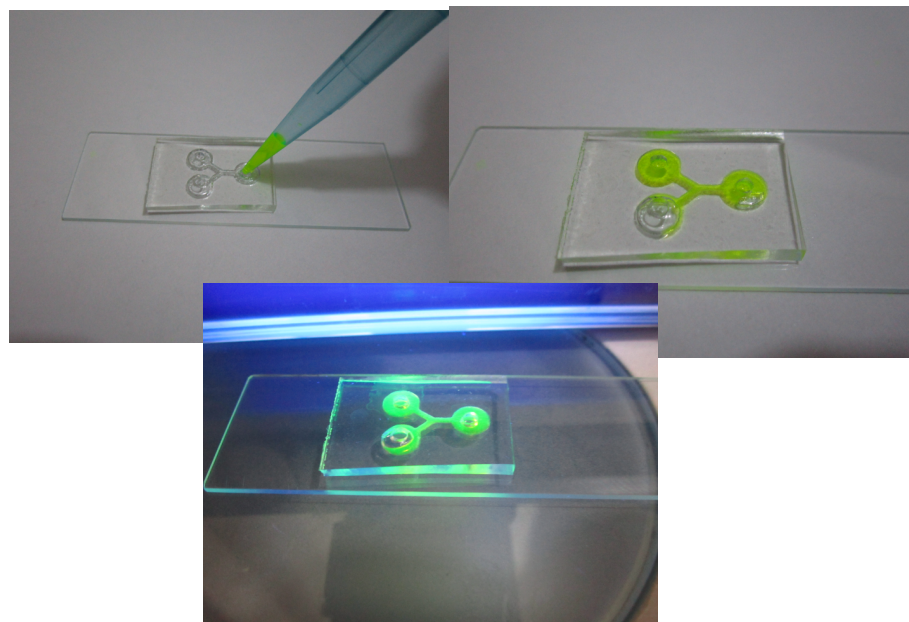
la estructura 3D creada con el fotopolímero estuvo lista para ser usada. Se usó un sacabocado para hacerle agujero a las áreas de ingreso y salida de flujo y se la colocó directamente sobre un vidrio portaobjeto para microscopio (Sail Brand Cat.No.7101), ver Figura 19.



**Figura 19.** (a) Estructura para LOC de microfluídica y máscara para LOC (b) Colocación de la estructura del LOC de microfluídica sobre vidrio para implementar el dispositivo LOC de microfluídica.

a) Calidad del sellado.

Luego de fabricado, se inyectaron 50 $\mu$ L de tinta fluorescente en el LOC (ver Figura 20). Luego de 24h y usando un estéreomicroscopio con 40X de magnificación y una lámpara UV, no se observaron fugas de fluido de los microcanales (ver Figuras 20 y 21).



**Figura 20.** Inyección de 50 $\mu$ L de tinta fluorescente en el LOC.

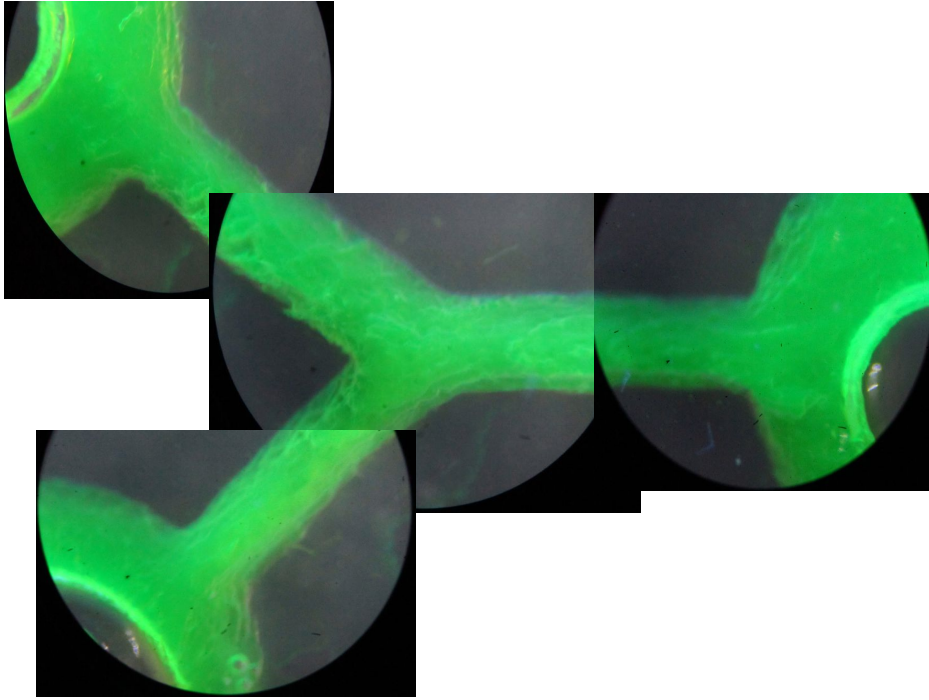
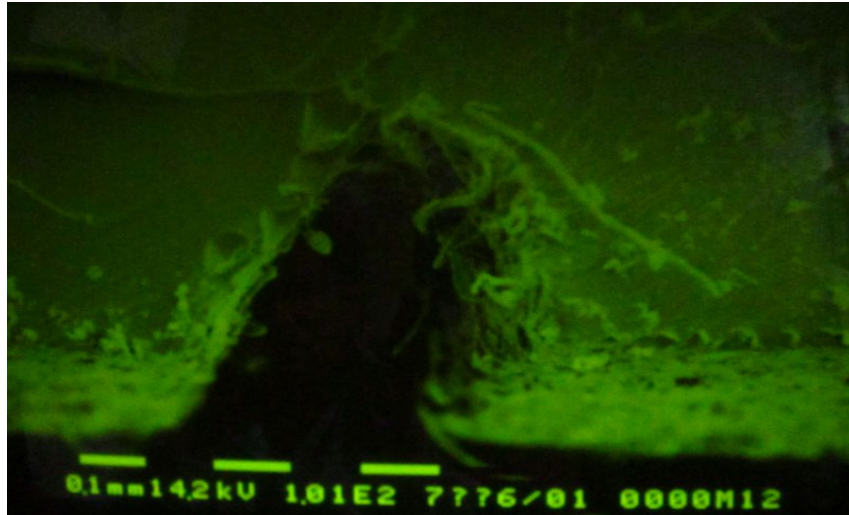


Figura 21. Micrografías tomadas con un estereomicroscopio con una magnificación de 40x a los microcanales del LOC luego de 24h de haber inyectado tinta fluorescente.

b) Resolución y rugosidad.

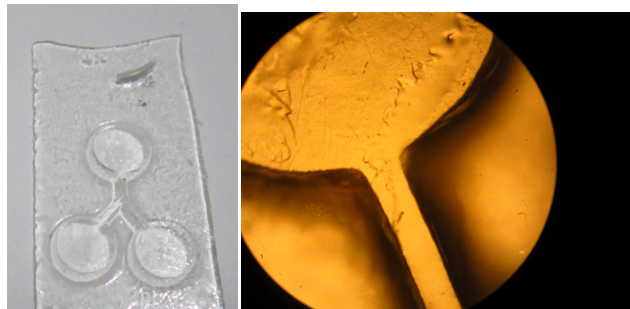
Usando una máscara impresa con una impresora láser (Samsung CLP-320) y tiempos de irradiación de 20s (Lado A) y 30s (Lado B), los canales obtenidos tienen un ancho de  $760\mu\text{m}$  y una profundidad de  $300\mu\text{m}$ , como se observa en la micrografía (Figura 22) obtenida con un microscopio electrónico de barrido (SEM, Phillips 505). La imagen SEM muestra la rugosidad de los canales, la cual depende del proceso de lavado, además la profundidad de los canales depende de los tiempos de irradiación.



**Figura 22.** Micrografía SEM de la vista lateral de uno de los canales del LOC.

c) Molde para fabricación de estructura LOC con PDMS.

Se usó la máscara negativa de un mezclador (ver Figura 16b) para fabricar un molde en el fotopolímero. Con el procedimiento descrito se fabricó el molde que se observa en la Figura 23.



**Figura 23.** Molde hecho con el método de fabricación desarrollado.

El molde se situó en un contenedor cerrado como se muestra en la Figura 24.



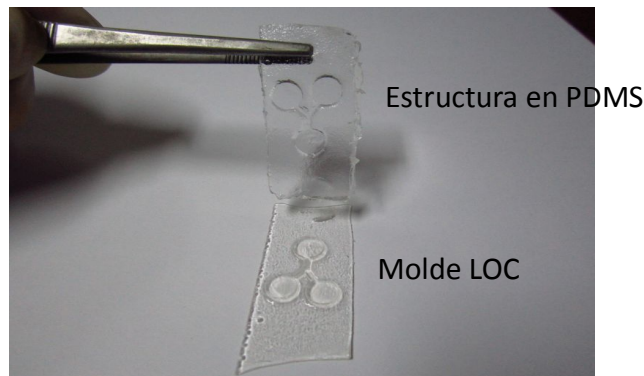
**Figura 24.** Contenedor donde se ha colocado el molde fabricado con el método desarrollado.



Se preparó PDMS (Dow Corning Syglar 184 Kit) a razón de 10:1 para silicona:agente de curado. Luego de mezclare bien se introdujo al PDMS en una cámara de vacío para desgasificarlo.

Luego se vertió el PDMS en el contenedor (Figura 24) y el conjunto se llevó a un horno a 100<sup>0</sup>C por 1h.

Luego de dejar enfriar al conjunto fuera del horno, se separó la estructura de PDMS del molde, la separación se realizó con facilidad (Figura 25).

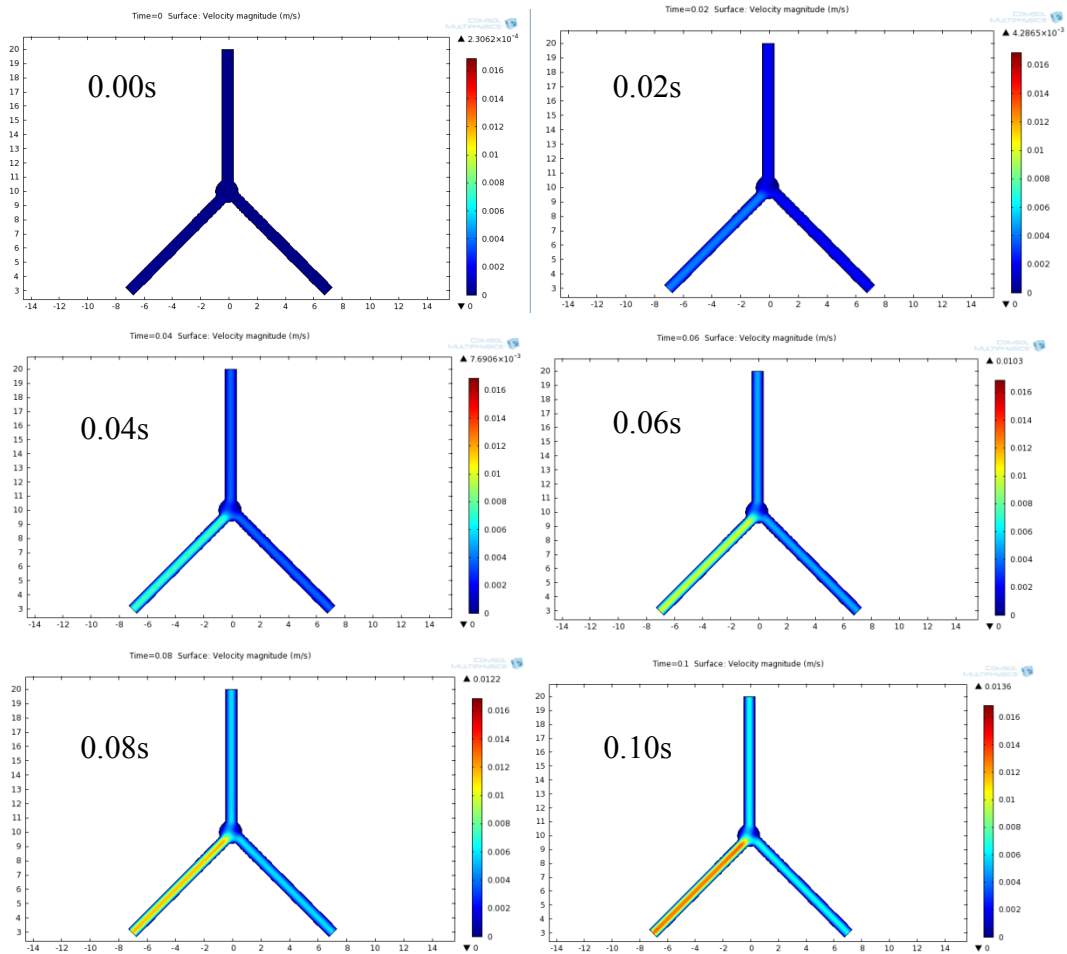


**Figura 25.** Separación de la estructura en PDMS del molde LOC, luego de remover al conjunto de contenedor.

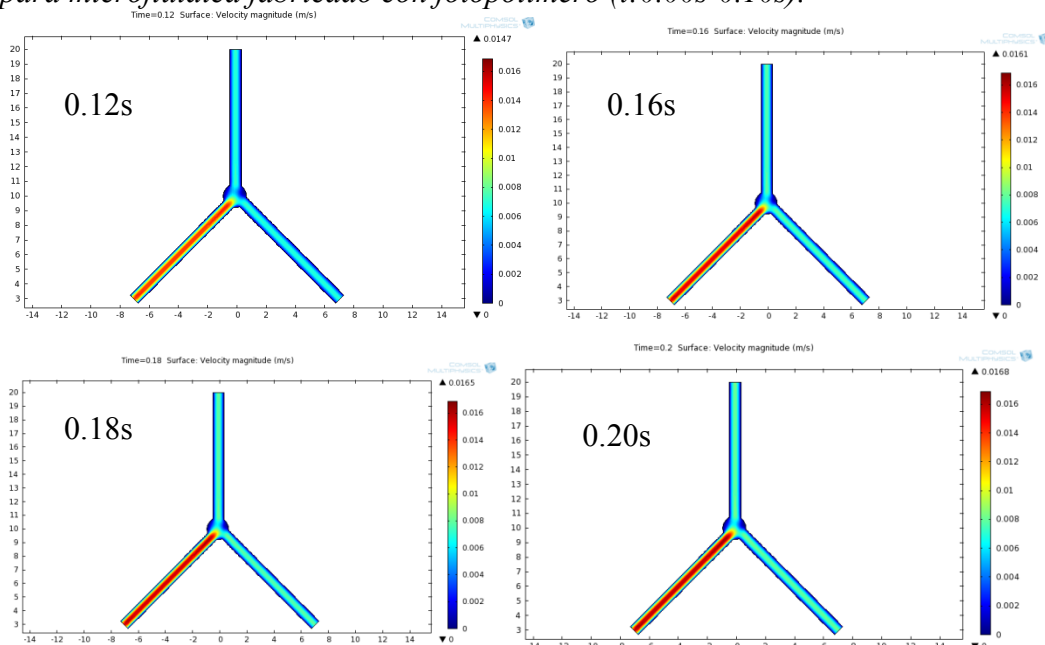
Se observó que el molde resistió al vaciado de PDMS además del curado térmico y el proceso mecánico de separación.

d) Simulación del campo de velocidades de un fluido que pasa a través de la estructura LOC fabricada con fotopolímero.

Usando la ley de Hagen–Poiseuille y considerando que la sección transversal de los canales es circular, además de que el fluido es incompresible, se utilizó el programa COMSOL Multiphysics® , para simular el comportamiento de la velocidad del fluido (ver Figura 26).



**Figura 26a.** Evolución temporal de la velocidad del fluido al pasar por el LOC para microfluídica fabricado con fotopolímero (t:0.00s-0.10s).



**Figura 26b.** Evolución temporal de la velocidad del fluido al pasar por el LOC para microfluídica fabricado con fotopolímero (t:0.12s-0.20s).

En la simulación se agrega agua por la terminal izquierda, se coloca como condición la misma presión en la terminal superior y la terminal derecha. La presión en la terminal izquierda es ligeramente mayor que en las otras dos. Bajo dichas condiciones se observa en el tiempo que conforme se llena el dispositivo, va incrementándose el valor de la velocidad de los puntos del fluido rápidamente en el intervalo de 0s a 0.1s Figura 26a, sin embargo bajo estas condiciones el sistema llega a un estado de equilibrio donde la velocidad del fluido es constante, ésta es la condición para que el fluido se considere como fluido Poiseuille.

### 3.1.3. Fabricación de dispositivos Lab-on-a-chips en polidimetilsiloxano (PDMS) usando una impresora 3D<sup>23</sup>.

La configuración de fabricación más utilizada es la de fabricar Lab-on-a-chip en PDMS sobre un sustrato de vidrio<sup>24</sup>. Aunque ésta es una alternativa más simple y económica que la de usar sistemas micro electro mecánicos aún requiere de personal y recursos especializados lo cual limita su uso<sup>32, 25</sup>.

En estudios anteriores, se han reportado métodos alternativos para la fabricación de LOCs, los cuales demandan menores recursos en comparación a los procedimientos fotolitográficos estándar. Entre éstas alternativas están las técnicas de proyección microscópica las cuales simplifican<sup>33,26</sup>, e inclusive eliminan el uso de las máscaras fotolitográficas<sup>27, 28, 29</sup>. Sin embargo aún en estas técnicas se requiere el uso de un cuarto limpio para los procedimientos de recubrimiento y revelado del photoresist, lo cual complica el proceso de fabricación. Adicionalmente la fabricación de estructuras para LOC multicapa incrementa el número de veces que se tiene que realizar el recubrimiento y revelado del photoresist<sup>30,31</sup>.

La impresión directa de LOC, implementada usando la micro estereo litografía (MS<sup>34,35</sup>), tradicionalmente ha requerido una infraestructura cara. El surgimiento de impresoras 3D de bajo<sup>32</sup> costo brinda la posibilidad de hacer microestructuras, con pocos recursos y habilidades de fabricación. Se han usado impresoras 3D económicas para fabricar dispositivos para milifluídica y microfluídica<sup>33</sup>, además de contenedores de reacción para síntesis y análisis químicos<sup>34</sup>. En el primer caso se usó una impresora basada en extrusión de plástico<sup>39,40</sup>, y en el segundo una impresora de inyección<sup>35</sup> la

cual permite imprimir estructuras usando diferentes materiales. Esto demostró el potencial para la impresión directa de sustancias funcionales y precursores químicos en dispositivos de reacción<sup>41</sup>. Sin embargo estas tecnologías de impresión tienen limitaciones como por ejemplo su resolución y rugosidad del impreso, los cuales son factores determinantes para fabricar moldes compatibles con los usados para la fabricación de LOCs en PDMS.

La reciente introducción de impresoras 3D económicas basadas en micro estéreo litografía las cuales proyectan la imagen usando un dispositivo digital de espejos (DMS), ofrecen una resolución de  $50\mu\text{m}$  y una terminación suave de la superficie. En éste tipo de impresoras, el diseño digital 3D de la estructura se divide en varias imágenes 2D las cuales se van proyectando en secuencia y por un cierto tiempo (denominado “tiempo de exposición”) sobre una plataforma plana, la cual se encuentra sumergida en un contenedor lleno de solución fotopolimérica (Figura 17). Cuando se proyecta una imagen sobre la superficie de la plataforma, la parte de la solución entre la plataforma y la base del contenedor se endurece, luego la plataforma sube una cierta distancia, la cual se le conoce como: “tamaño de paso vertical”. El proceso se repite con la solución que llena el espacio entre el polímero endurecido y el fondo del recipiente. Éste procedimiento se repite a cierta velocidad, a ésta velocidad se le conoce como “velocidad de impresión”.

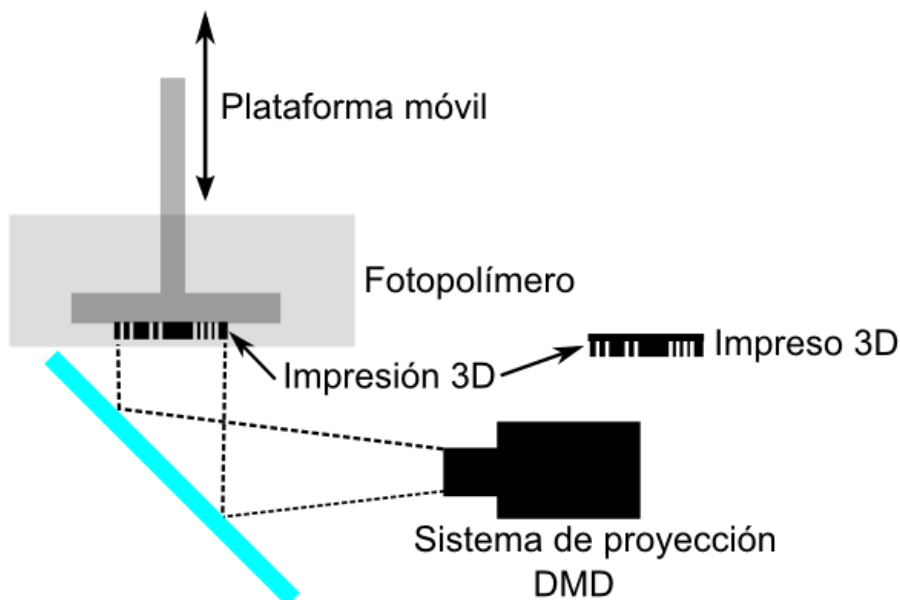


Figura 27. Esquema de una impresora 3D que usa micro estéreo litografía.

En la presente tesis se usó una impresora económica basada en micro estéreo litografía (Miicraft®) para imprimir moldes para la fabricación de LOCs en PDMS<sup>32, 36</sup>. Ésta tecnología se probó en la fabricación de mezcladores simples y caóticos<sup>37, 38</sup>, los cuales tiene una gran relevancia cuando se desean mezclar dos reactivos o un reactivo y una muestra para aplicaciones biomédicas, además se fabricó un LOC para la medición de glucosa en una solución, para tal fin se fabricó una estructura de LOC multicapa además de funcionalizar una parte de la superficie interna del LOC (sección de sensado) para realizar una detección óptica de Glucosa en una solución.

En los diseños desarrollados se explotó las ventajas inherentes a la tecnología de fabricación 3D como la integración de canales micrométricos con elementos milimétricos además de que éste método permite la adhesión directa de los tubos de entrada y salida de muestra en el PDMS.

a) Fabricación de los moldes.

Los moldes fueron diseñados usando Autodesk® Inventor® Fusion, Autodesk Inc en una computadora MacBook Air computer (13-inch, late 2010, 1.86 GHz Intel Core 2 Duo, 4 GB 1067 MHz). Se exportaron los diseños como archivos “.stl” el cual se cargó en el software de la impresora (Miicraft® Suite). Éste software permite la segmentación del sólido diseñado (malla en 3D) en múltiples planos de sección transversal donde cada uno representa un paso de 50µm en el eje Z (eje vertical de fabricación) de la impresora. Los archivos que representan a cada una de esos planos tienen extensión “.png” con una resolución de 480x768 pixels.

En el proceso, los archivos .png son totalmente accesibles y pueden modificarse para hacer correcciones menores y refinar el diseño. Estas correcciones pueden ser hechas en cualquier software capaz de editar Pixels en una imagen como Photoshop o Microsoft Paint.

Miicraft ® es una impresora 3D por micro estéreo litografía con una resolución lateral de 450 ppi (~56 µm) y 50 µm de resolución vertical. El software Miicraft® Suite controla el proceso de impresión permitiendo configurar el tiempo de exposición para

cada plano de corte (layer), la velocidad de impresión (2 o 3 cm/h) y la separación entre planos de corte en el proceso de exposición (50 a 100  $\mu\text{m}$ ).

Luego de un proceso de optimización, se encontraron los parámetros de fabricación para los moldes preparados para un LOC de estructura multidimensional, moldes para mezcladores simples y caóticos, y moldes para LOCs de múltiples capas para detección de glucosa.

**Tabla 2.** *Parámetros para la fabricación de moldes para LOC.*

Parámetro	Estructura Multidimensional	Mezcladores: Simple y Caótico	LOC multicapa para detección de glucosa
Tiempo de exposición	12s	11s	10s
Velocidad de impresión	2cm/hora	3cm/hora	3cm/hora
Tamaño de paso vertical.	50 $\mu\text{m}$	50 $\mu\text{m}$ y 100 $\mu\text{m}$ (500 $\mu\text{m}$ canales profundos)	50 $\mu\text{m}$

Luego de imprimir los moldes, éstos fueron sonicados (FinnSonicm15) en etanol de grado industrial por 20s, y luego secados con aire. Los moldes ya secos fueron expuestos a luz UV por 600s en la cámara de post-curado de la impresora.

La impresora utiliza una resina comercial, de la cual no está disponible la información de su composición exacta, sin embargo el fabricante indica que una mezcla con diferentes proporciones de acrilato modificado, acrilato oligomérico modificado, monómero de acrilato, monómero epoxy, foto-iniciador y aditivos.

Debido a que el PDMS no cura directamente sobre los moldes impresos, la superficie del molde debe ser recubierta con un material adecuado para permitir el curado del PDMS. Se desarrolló un procedimiento para permitir el curado del PDMS en las estructuras impresas. El procedimiento consistió en someter al molde a 2 min de un baño en ultrasonido con etanol de grado industrial, luego recubrir la superficie mientras el etanol se evapora con películas finas de pintura resistente al agua (Pentel NN60). Para hacer el recubrimiento, se usó usando el sistema de espray Neo CN Iwata, con una

boquilla de 0.35mm. Se observó que el PDMS no cura si se realiza el recubrimiento sobre el molde seco.

Se encontró experimentalmente que para cubrir adecuadamente una estructura de aproximadamente  $43 \times 27 \text{mm}^2$  se necesitaron 1.5ml de una solución etanol-pintura con una relación 2:1.

Se utilizó un perfilómetro (Dektak 6, Veeco Instrument Inc.) para medir la rugosidad de las estructuras impresas antes y después del recubrimiento. La punta recorrió 1mm con una resolución de 6000 puntos. Se encontró que las estructuras antes y después del recubrimiento tenían respectivamente 182nm y 540nm de rugosidad. Para los diseños impresos, la rugosidad fue aproximadamente 1.08% del tamaño de la menor estructura impresa en los moldes.

Para completar los moldes de LOC, se insertaron tubos de silicona (Esska.de GmbH, Hamburg) en las guías creadas para tal efecto. El diámetro de las guías se fabricó de tal manera que exista un sellado adecuado de los tubos. Para tubos de 0.5mm, 0.8mm y 1.5mm se necesitaron crear guías con diámetros de 0.6mm, 0.9mm y 1.6mm, respectivamente.

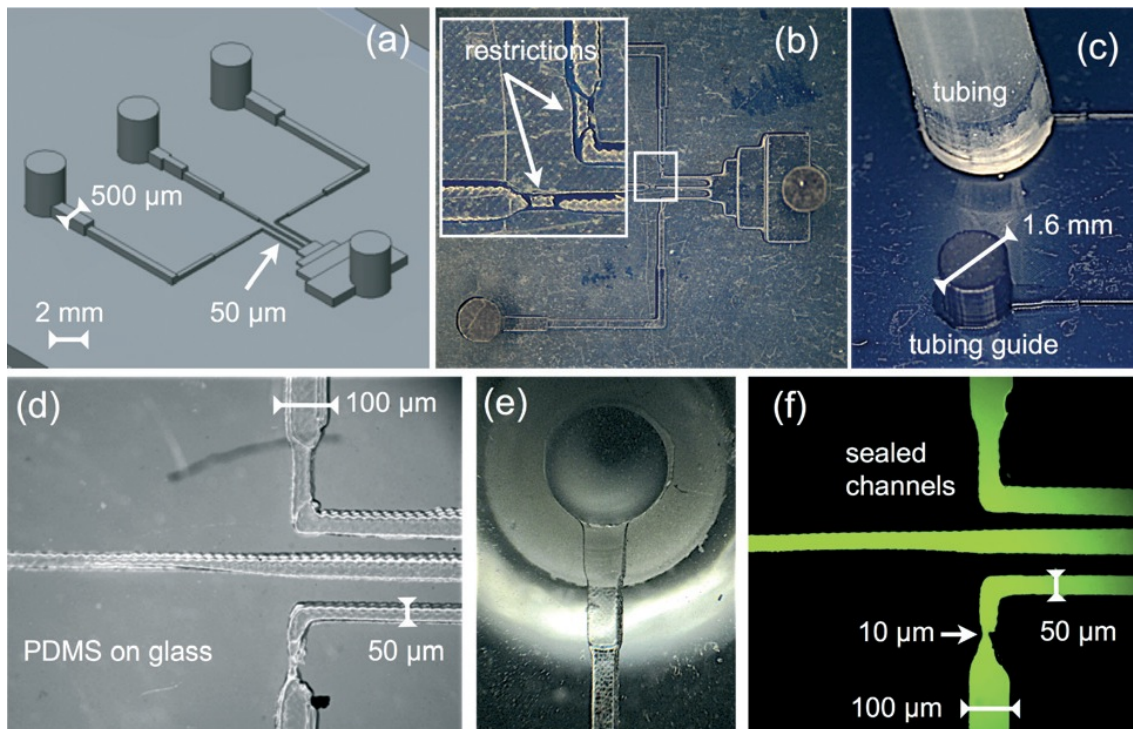
Los moldes pueden ser reutilizados luego de endurecido y retirado el PDMS, simplemente se necesita realizar el proceso de lavado y recubrimiento descrito anteriormente. El número de veces que se puede reutilizar el molde depende si ha existido algún daño mecánico, como por ejemplo alguna rotura de guías o rajaduras del molde. Se encontró que luego de 4 reutilizaciones las guías más delgadas tienden a romperse.

#### b) Elaboración y curado del PDMS.

Para fabricar los LOCs en PDMS se mezcló la base (Dow Corning Sylgard 184) con el agente de curado<sup>39</sup> en razón de 10:1 y se agitó la mezcla por 2 min. Se desgasificó la mezcla usando una bomba de vacío por 30 min, luego se vertió la mezcla en los moldes. Posteriormente los moldes conteniendo al PDMS fueron colocados en un horno (Gallem Kamp incubator) a  $65^{\circ}\text{C}$  por dos horas. Luego las estructuras de PDMS

con los tubos adheridos fueron desmoldadas de las estructuras impresas, y colocadas directamente sobre un vidrio portamuestra para microscopio (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Solamente para el caso del mezclador caótico (Figura 29), cuyas estructuras soportaron un flujo de  $90 \mu\text{l min}^{-1}$  (Jeringa automatizada de infusión continua, NE-1000 New Era Pump Systems Inc., <http://www.syringepump.com>), se expuso el PDMS a plasma de oxígeno (Diener electronic, Picomodel) durante 1min para incrementar su adherencia al vidrio.

Las imágenes de las máscaras (Figuras. 18b , 18c y 18d) fueron obtenidas con un estéreo-microscopio (Olympus sZ60) y con una cámara digital Canon EOS 500D DSLR (15 mPixels, APS-C sensor CMOS). Las imágenes de epi-fluorescencia fueron obtenidas con un microscopio invertido (Zeiss Axiovert 40cfl) y la misma cámara digital. Se usó el iluminador Zeiss HBO60 conteniendo una lámpara de vapor de mercurio (HBO 50) para realizar la excitación en la fluorescencia.



**Figura 28.** (a) Diseño CAD con estructuras de  $50\mu\text{m}$  y  $2\text{mm}$  combinadas en el mismo dispositivo. (b) Impresión 3D de la estructura (a). La figura muestra estrangulamientos generados entre el cambio de tamaño de canales de  $50\mu\text{m}$  a  $100\mu\text{m}$ . (c) Imagen de un pilar impreso, usado como guía para la colocación de una manguera integrada a la estructura del LOC. (d) Dispositivo LOC en PDMS ensamblado sobre un sustrato de vidrio mostrando que no existe textura en la interfase PDMS-vidrio. (e) Imagen de la conexión de un tubo a un canal de  $500\mu\text{m}$ . (f) Imagen de microscopía de epi-fluorescencia de la estructura de LOC en PDMS con los canales llenos de fluorescina.

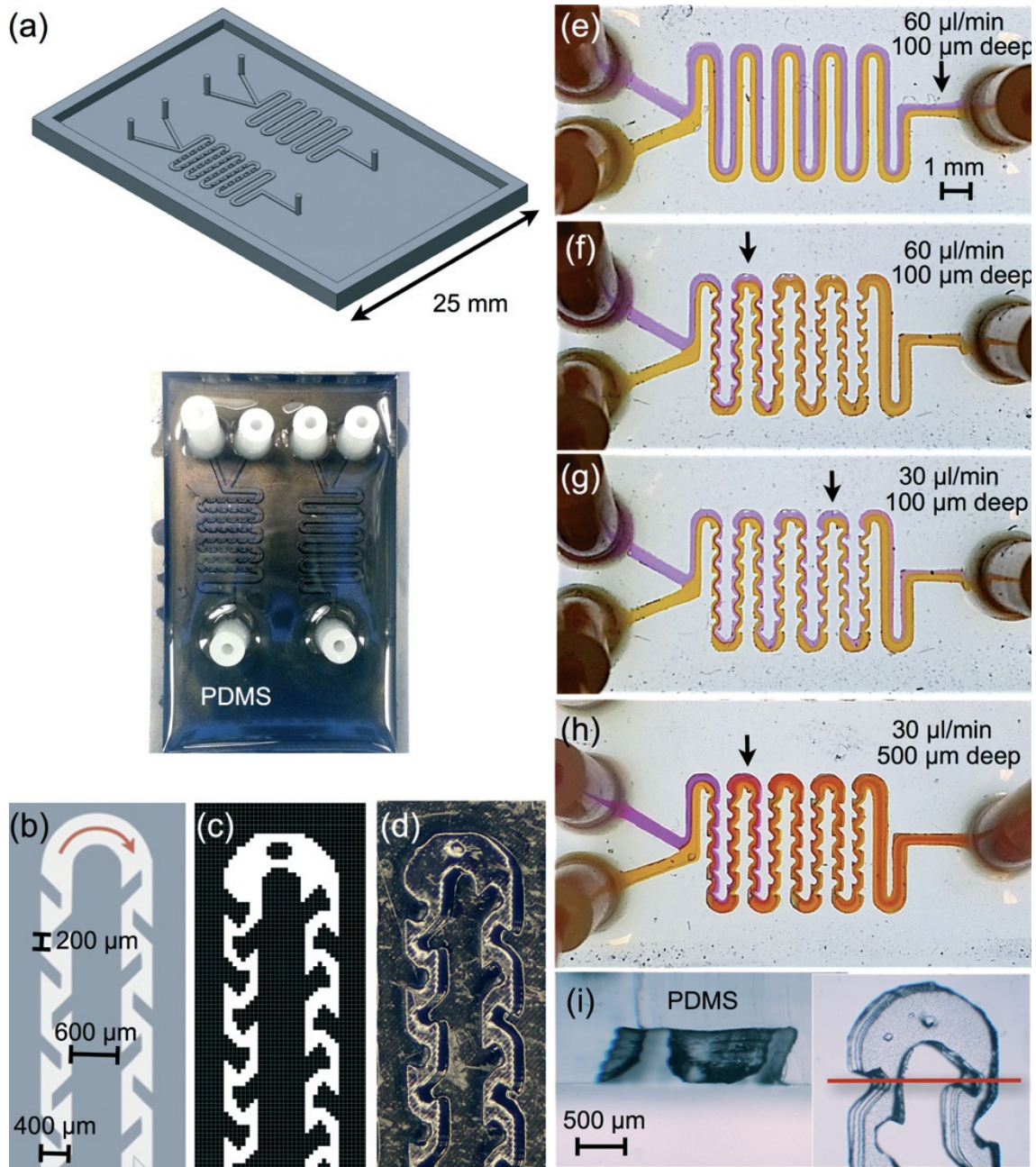


Se investigó la potencialidad de la fabricación de moldes con la impresora 3D a través de la fabricación de mezcladores de difusión y caótico, además de una estructura LOC multi-nivel en PDMS (detección de la concentración de glucosa en una solución).

La naturaleza laminar del fluido restringe el proceso de mezcla en dispositivos de microfluídica<sup>38</sup>. Los micro-mezcladores pasivos se basan en incorporar estructuras geométricas a lo largo de los micro canales<sup>40</sup>, las cuales reducen el flujo laminar al introducir una advección caótica, incrementando la eficiencia de mezcla<sup>38, 41, 42</sup>.

El molde impreso incorporó un filo de 1mm para depositar el PDMS, haciendo que el proceso de fabricación sea rápido y limpio. (Figura 29a). Los resultados comparativos entre mezcladores caóticos y un mezclador de difusión se pueden observar en la Figura 29. Los detalles de diseño de un canal en el mezclador caótico, la imagen 2D y la impresión se muestran en las Figura 29b, 29c y 29d respectivamente. La textura propia de los moldes impresos incrementó la eficiencia de mezcla debido a que los obstáculos fabricados en el mezclador caótico no tienen superficies suaves sino son una malla 3D (Figura 29i).

Se inyectaron soluciones 1mM de fluoresceína y rodamina B en el mezclador de difusión de 100 $\mu$ m de profundidad de canal a razón de 60  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Las soluciones no se mezclaron inclusive al hasta el final de dispositivo (Figura 29e). Se señaló con una flecha la posición en la cual fue posible distinguir las soluciones iniciales. Por el contrario en los mezcladores caóticos se observó que la mezcla ocurrió mucho antes del final del canal inclusive cuando las soluciones fueron inyectadas con menor flujo volumétrico (30  $\mu$ L min<sup>-1</sup>). Una ventaja de los moldes impresos es la facilidad de fabricación de estructuras con diferentes espesores sin el uso de diferentes materiales o protocolos y a un costo muy reducido. En la Figura 29h se observa la respuesta de un mezclador caótico con canales de 500 $\mu$ m de profundidad, cuando se le inyecta las soluciones con un flujo volumétrico de 30  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Como era de esperarse la eficiencia de mezcla se incrementa debido a que el número de Reynold se incrementa con la profundidad del canal<sup>38</sup>, al mismo tiempo cuanto mayor sea la profundidad del canal, introduce también topologías 3D complejas (Figura 29i), las cuales son difíciles de fabricar con métodos tradicionales e incrementan la turbulencia en el canal.



**Figura 29.** (a) Diseño del molde para difusión y mezcladores caóticos. Los pilares son las guías donde se colocan los tubos y el marco perimetral contiene al PDMS durante el proceso de curado. Además se observa la estructura de LOC en PDMS sobre el molde impreso. (b) Detalles del mezclador caótico. (c) Imagen 2D de mezclador caótico. (d) Molde impreso del mezclador caótico. (e) Mezclador por difusión con canales de  $100\mu\text{m}$  de profundidad mostrando la mezcla de  $1\text{mM}$  de Fluorescina con  $1\text{mM}$  de Rodamina B a  $60\mu\text{l min}^{-1}$ . (f) Mezclador caótico con canales de  $100\mu\text{m}$  de profundidad mostrando la mezcla de  $1\text{mM}$  de Fluorescina con  $1\text{mM}$  de Rodamina B a  $60\mu\text{l min}^{-1}$ . (g) Mezclador caótico con canales de  $100\mu\text{m}$  de profundidad mostrando la mezcla de  $1\text{mM}$  de Fluorescina con  $1\text{mM}$  de Rodamina B a  $30\mu\text{l min}^{-1}$ . (h) Mezclador caótico con canales de  $500\mu\text{m}$  de profundidad mostrando la mezcla de  $1\text{mM}$  de Fluorescina con  $1\text{mM}$  de Rodamina B a  $60\mu\text{l min}^{-1}$ . (i) Detalle de la estructura 3D del mezclador caótico con canales de  $500\mu\text{m}$  de profundidad.

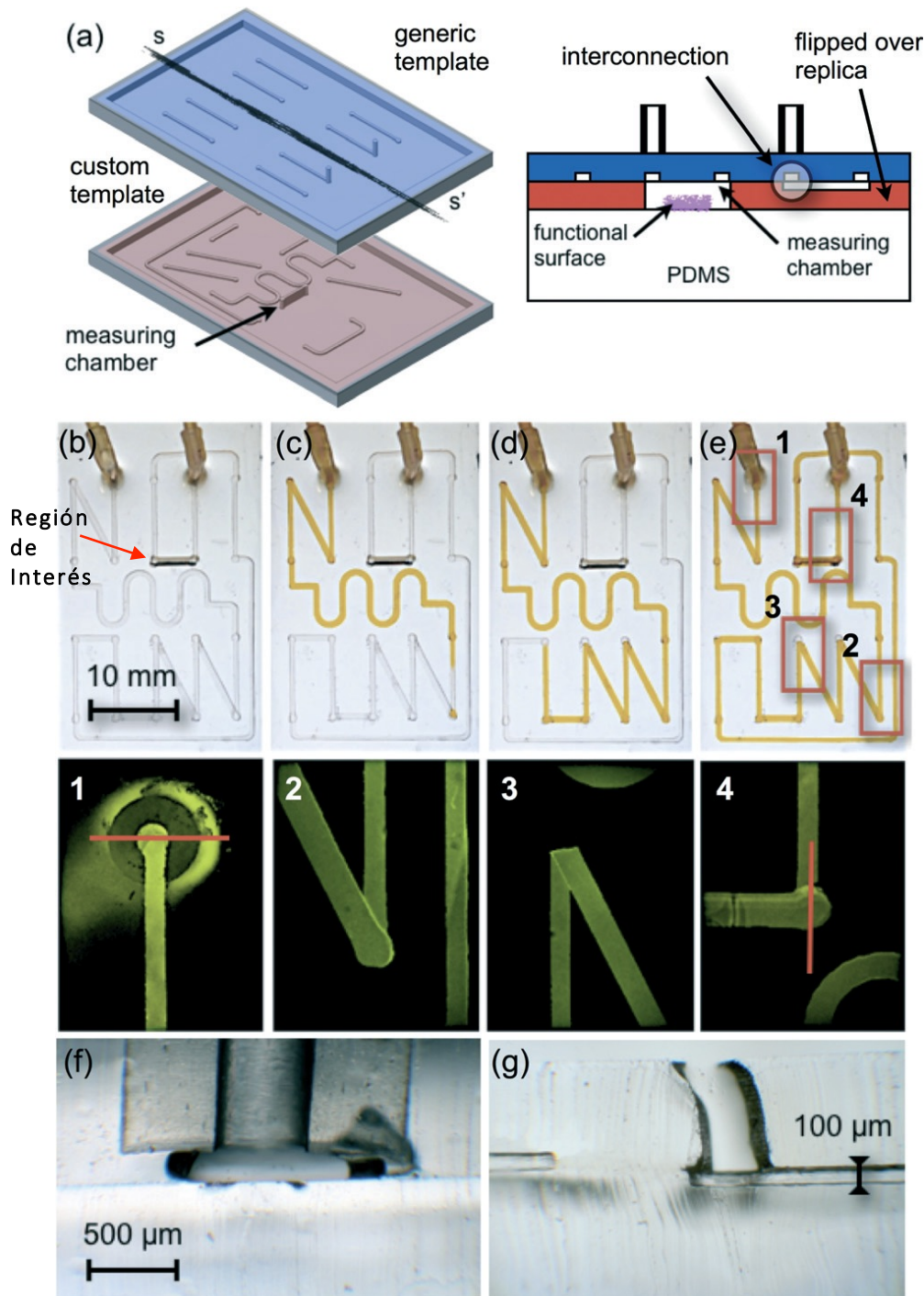
### **3.2 Detección óptica de la concentración de glucosa en una solución en el LOC.**

La concentración de glucosa es un parámetro médico importante para el monitoreo de pacientes con diabetes. La detección de parámetros en un Lab on a chip (LOC) depende de la funcionalización de la región de detección del LOC con un elemento activo el cual cambia sus propiedades ópticas con la concentración del elemento que se desea detectar. En la presente tesis se usó una combinación Glucosa Oxidasa (GOx), Horseradish Peroxidasa (HRP) y un sustrato incoloro (Ampliflu Red, conocido como Amplex Red), todo éste conjunto formó el ensayo de prueba de glucosa. La GOx cataliza la oxidación de la glucosa convirtiéndola en glucono delta-lactona, y peróxido de hidrógeno. Éste último reacciona con la HRP estequiométricamente 1:1 catalizando la de-N-acetilación y la oxidación del Ampliflu Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) en resorufin<sup>43, 44</sup>.

El resorufin es un compuesto fluorescente de color rosado, el cual fluoresce emitiendo una luz roja, cuando se le excita con luz de 563nm. El resorufin también es un sustrato para la HRP, la cual lo oxida convirtiéndolo en un compuesto incoloro no fluorescente<sup>28,29</sup>.

Se define 1 unidad (U) de Horseradish Peroxidasa como la cantidad de enzima que forma 1.0mg de purpurogallin a partir de pyrogallol en 20s a 6.0 pH y 20°C. Se define 1 unidad (U) de Glucosa Oxidasa como la cantidad que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -D-glucose en D-gluconolactone y  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a pH 5 y a 35°C.

El tiempo de respuesta puede ser ampliamente regulado a través de la proporción de los compuestos. La prueba usada consta de: 10 unidades/ml de GOx, 10 unidades/ml de HRP, 250 $\mu\text{M}$  de Ampliflu Red y 0.3M de trehalosa en una solución buffer fosfato salina (PBS pH 7.4). Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).



**Figura 30.** (a) moldes para LOC multicapa. El molde azul es simétrico respecto a la recta  $SS'$  y la réplica hecha en PDMS del molde rojo se le dio la vuelta para ensamblarla sobre la réplica hecha con el molde azul y luego se colocó el conjunto sobre un vidrio. En la sección transversal se observa el uso de estructuras con diferentes espesores en el molde para crear la cámara de medición con acceso al sustrato funcionalizado. (b) Estructura multinivel llena con una solución de fluoresceína. Las micrografías de fluorescencia 1, 2, 3, 4 muestran con detalle las conexiones entre los niveles (c) Lo mismo que b, pero luego de 130ms de inyectar la solución. (d) Luego de 460ms. (e) Luego de 920ms. (f) Detalle de la conexión de un tubo con el canal. (g) Sección transversal de la cámara de medición conectada a un canal de  $100\mu\text{m}$  de profundidad.

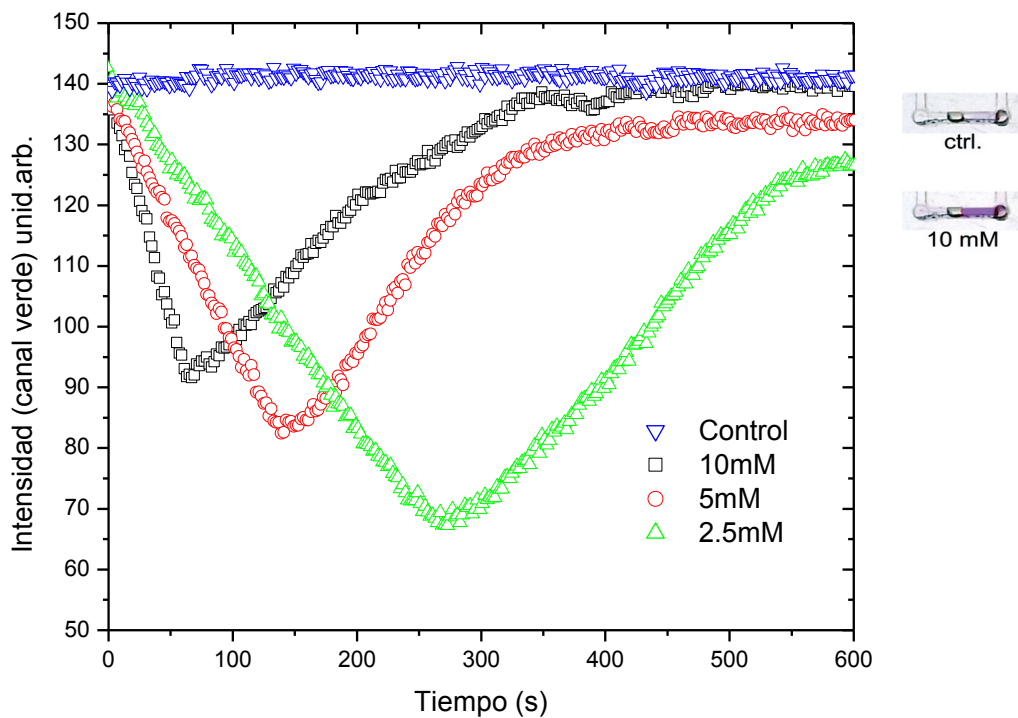
La funcionalización de la superficie de la cámara de detección del LOC (Figura 30) fue hecha depositando el ensayo de prueba de glucosa sobre la superficie plana de PDMS y permitiendo que seque en oscuridad, a temperatura ambiente por 2 horas. La cámara de sensado fue sellada a la superficie funcionalizada.

Luego se inyectó una solución de 10mM de glucosa seguida de una burbuja de aire. El flujo de la solución inyectada fue de  $30\mu\text{L min}^{-1}$  usando una jeringa automatizada (Dual NE-1000 syringe pump). La inyección de la muestra se detuvo cuando la solución alcanzó la cámara de medición. Para realizar la medición usando tratamiento digital de imágenes, en todo momento la zona de detección del LOC fue capturada en video con 30Fps (frames por segundo) usando la cámara de un Smart pone (cámara trasera del Galaxy Note 2)

Se utilizó tratamiento digital de imágenes para obtener de manera automatizada el valor de la glucosa detectada en el LOC. Para ello se colocó al LOC sobre un vidrio y por la parte inferior se le iluminó con la pantalla de un iPod Touch corriendo el app Led Torch V1.37 configurado para que ilumine con el color blanco (rgb 255, 255,255). Se grabó un video con la cámara trasera del Smartphone Samsung Galaxy Note 2, colocado por encima y a 4cm del LOC. De ésta manera se registró el cambio de color de la zona de detección del LOC y la configuración de medición proporciona una plataforma para la medición de glucosa usando un Smartphone.

Se realizaron tres mediciones de concentración de glucosa en una solución y la medición de una muestra control (solución sin glucosa). El video capturado con el Samsung Galaxy Note 2 se convirtió en una secuencia de imágenes con formato “.jpeg” a razón de 0.5 fps usando un software de edición de video (MPEG Streamclip v.1.9.2). Ésta secuencia fue procesada por un script desarrollado en MatLab R2008b, el cual permite seleccionar manualmente la región de interés de una imagen “.jpg” y extraer las intensidades promedio de los canales rojo, verde y azul. Teniendo la región de interés definida, el script repite el procedimiento de extracción para todas las imágenes. Además como la extracción fue hecha a 0.5Fps cada punto de respuesta de promedio de intensidad dado por el script se obtiene cada 2s.

Los resultados de la medición de glucosa en una solución usando el LOC están dentro del rango clínicamente relevante (4mM-10mM). La superficie de sensado en el LOC contiene Glucosa Oxidasa (GOx), Horseradish Peroxidasa (HRP) y un sustrato biológico incoloro (Ampliflu Red). Mientras la solución conteniendo glucosa llegaba a la zona de detección, la GOx catalizó la oxidación de la glucosa a glucono delta-lactone y peróxido de hidrógeno, el cual fue usado por la HRP para catalizar la de-N-acetilación y oxidación del sustrato incoloro Ampliflu Red (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina) a resorufin. El resorufin es un compuesto rosado, el cual también es un sustrato biológico para la HRP, la cual lo oxida y lo lleva una sustancia incolora y no fluorescente. Los resultados de la Figura 31 muestra la producción rápida de resorufin para concentraciones altas de glucosa, debido a los altos niveles de peróxido de hidrógeno producido por la actividad el GOx y subsecuentemente el consumo de resorufin por la HRP la cual vuelve al indicador incoloro.



**Figura 31.** Variación de la intensidad de luz promedio en la zona de detección del LOC (Zona de interés). La señal fue obtenida por tratamiento digital de imágenes realizado al canal verde del video obtenido con el Smartphone.

Las características dinámicas de la respuesta de la detección con el LOC la hacen adecuada para una detección cualitativa de glucosa independientemente de las capacidades de lectura colorimétrica del instrumento de medida (Smartphone).

En el presente caso, se monitoreó el nivel promedio del verde en la región de interés de la imagen (zona de análisis del LOC) en el tiempo, exclusivamente para encontrar su nivel mínimo. La gráfica (Figura 31) muestra el comportamiento temporal del color en la celda funcionalizada del LOC, los puntos en la gráfica de éste comportamiento temporal pueden ser usados como un vector característico de la concentración, así para un video adquirido a 30fps (valor común para un teléfono actual) se tiene que se puede monitorear el cambio de color en la celda del LOC con una resolución de 33ms. Para el rango total de medición de 300s (tiempo que se obtienen los mínimos en la Figura 31), en los experimentos realizados 33ms (tiempo entre frames en el video) corresponde al 0.011% del rango total. Además la resolución de la imagen es de 8 bits es decir el color puede monitorearse en 255 niveles diferentes, lo que implica que el color puede medirse con una incertidumbre de 0.39%.

## **Capítulo 4**

### **Diseño y Fabricación de sistemas óptico-digital manual y automatizado para la detección temprana de Tuberculosis**

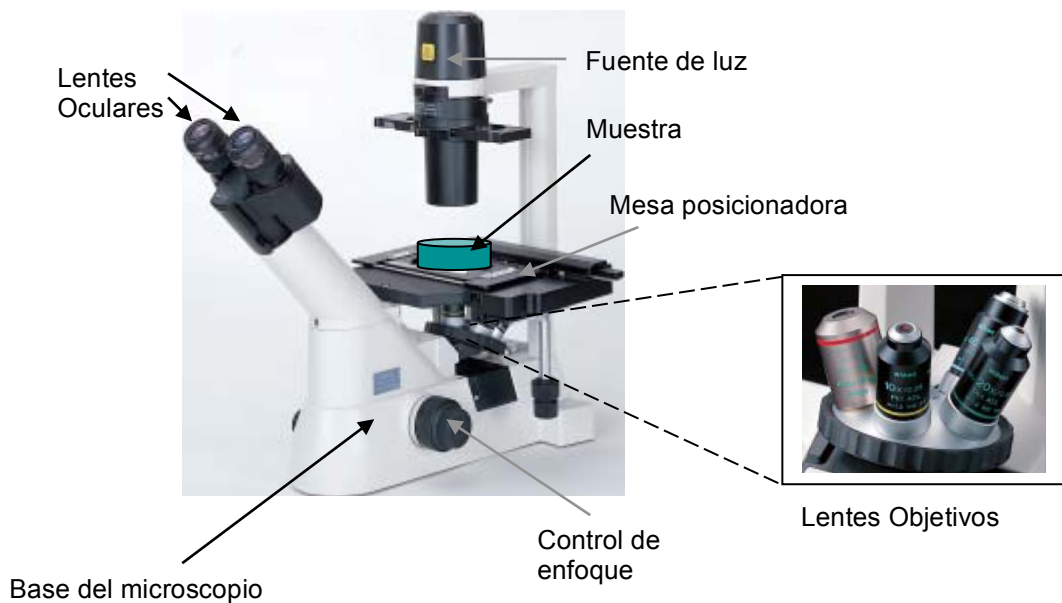
---

En el presente capítulo se muestra el desarrollo de tres prototipos desarrollados para la detección temprana de Tuberculosis (TB), los cuales pueden servir como sistemas para medición distribuida, en el diagnóstico de TB. Los dos primeros, económicos, permiten la obtención de imágenes de cultivos MODS para la determinación de TB en localidades de escasos recursos, además de permitir obtener imágenes digitalizadas, que pueden ser transmitidas a especialistas o a un software de diagnóstico dando un aporte a la salud pública en zonas apartadas del Perú. El tercer prototipo permite automatizar el proceso de manipulación de las muestras de TB además de automatizar el proceso de enfoque de la muestra y la obtención de imágenes digitales. Los dos primeros prototipos muestran una concordancia de medida mayor a 93% respecto al instrumento de medida convencional mientras que el tercero presenta 100% de concordancia.



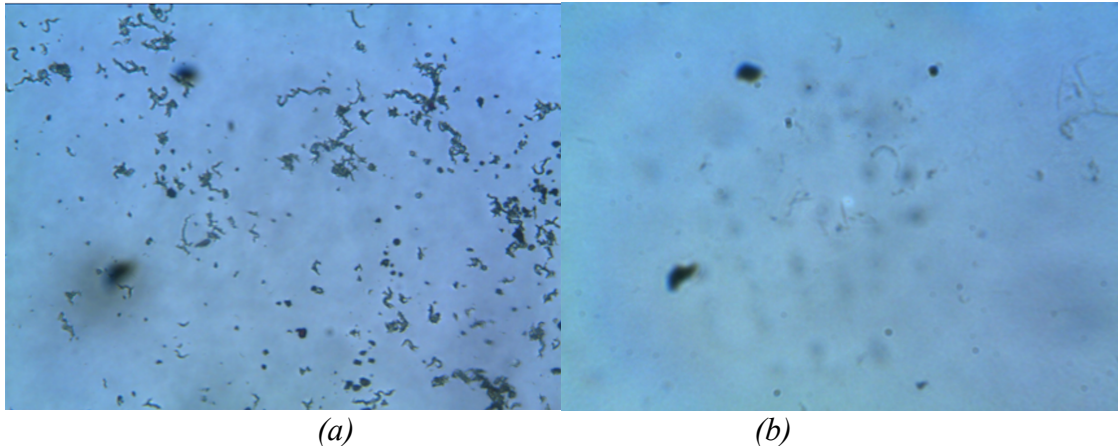
#### 4.1 Prueba MODS para diagnóstico de TB.

La prueba médica de observación microscópica a susceptibilidad a drogas (Microscopy, Observation, Drug Suceptibility, [MODS]) para diagnóstico de tuberculosis ha mostrado tener alta sensibilidad y susceptibilidad. Es una prueba económica y rápida para la detección temprana de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y la resistencia a drogas directamente del esputo de pacientes, siendo una alternativa a métodos convencionales para la detección de MTB y la sensibilidad a drogas<sup>45-58</sup>. Recientemente la Organización mundial de la salud (OMS) ha declarado a la prueba MODS como una prueba adecuada para la detección de Tuberculosis Multidrogo Resistente (MDR TB). El método MODS consiste en colocar muestra de esputo en un medio líquido luego entre 7 y 14 días de sembrado se observa la morfología de la muestra usando un microscopio invertido (Figura 32). La observación para el diagnóstico se hace a través del reconocimiento de patrones morfológicos los cuales son específicos a la agrupación de MBT en el medio líquido. El ensayo MODS utiliza un microscopio óptico invertido para visualizar el crecimiento en cordones característico del *M. tuberculosis* a través de la parte inferior de las placas de cultivo tisular de 24 pozos inoculados previamente con una muestra de esputo descontaminado y medios líquidos de cultivo.



**Figura 32.** Microscopio invertido Nikon TS100, equipo estándar para el diagnóstico de TB usando el método MODS. La magnificación usada en todas las mediciones es de 100X.

Patrones MODS permiten la discriminación visual entre *M. tuberculosis* y micobacterias atípicas (Figura 33). El patrón acordonado ha demostrado ser igualmente preciso para la detección de *M. tuberculosis* como métodos moleculares alternativos aprobados por la OMS<sup>59</sup>.



**Figura 33.** Fotografías de cultivos MODS adquiridas con el microscopio invertido NIKON Eclipse TS100-F con 100X de magnificación (10X lente objetiva y 10X lente ocular) y con una cámara digital (Olympus C-3030) con 3.34 Megapixel de resolución. (a) MODS de MBT positivo. (b) MODS de MTB negativo mostrando solo sedimentos y ditritos.

En el presente capítulo se describen dos alternativas, desarrolladas para la observación de placas MODS y el diagnóstico de TB. La primera alternativa<sup>60</sup> se basa en dos prototipos, el primero en base a un microscopio económico (Radio Shack MM-100) y una webcam que permitió obtener imágenes comparables al equipo de referencia (Microscopio Nikon TS100). El segundo prototipo basado en un arreglo óptico y una cámara digital modificada (Genius DV600) permitió obtener imágenes comparables al equipo de referencia (Microscopio Nikon TS100) con la ventaja de que fue posible digitalizar la imagen y además poder enviarla por internet a un especialista.

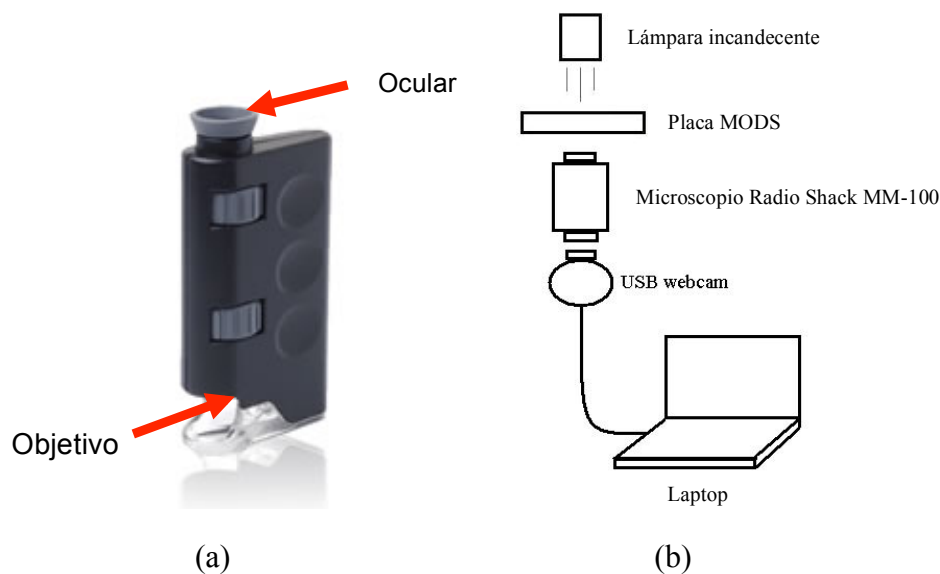
La segunda alternativa<sup>61</sup> involucró la automatización de un arreglo óptico para que pueda moverse en tres ejes de tal manera que pueda recorrer una placa de 24 pozos en el plano horizontal y además se mueva verticalmente para enfocar automáticamente. Éste prototipo contó con una cámara para la digitalización de imágenes.

En todas las mediciones se utilizó el microscopio invertido NIKON Eclipse TS100-F como instrumento patrón. La digitalización de imágenes se realizó a través de la cámara CCD Olympus C-3030 de 4Mpx colocada en el compartimiento del microscopio para cámaras. Las imágenes se tomaron usando el ocular de 10X de magnificación y el objetivo de 10X de magnificación.

#### 4.2 Sistema óptico económico para la detección temprana de MBT.

##### Prototipo 1.

El primer prototipo (Figura 34) utilizó un microscopio económico Radioshack MM-100 (10USD) y una cámara web estándar USB de 320x240 de resolución. Se usó un foco incandescente de 0.5W y una lente convergente. Se usó una laptop para conectar la cámara web y con ello digitalizar la imagen.



**Figura 34.** (a) Microscopio Radioshack MM-100. (b) Esquema del prototipo desarrollado.

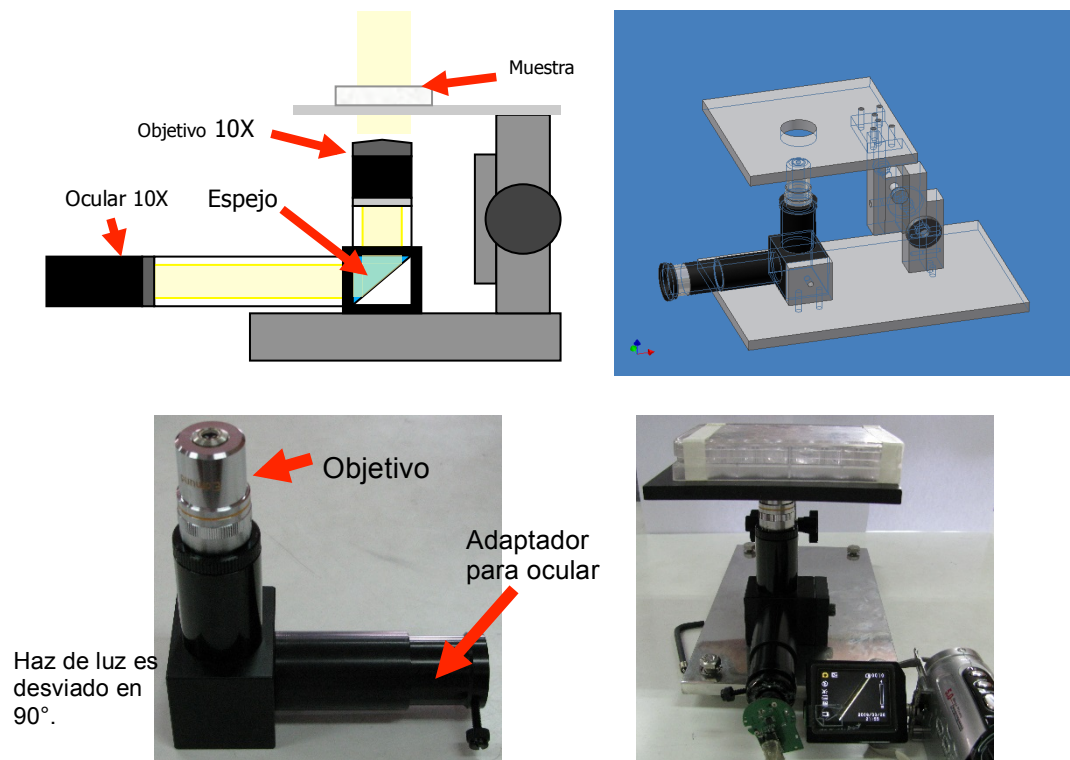
##### Prototipo 2.

El segundo equipo desarrollado corresponde a un equipo autónomo el cual tiene una magnificación de 100X, una cámara digital modificada la cual graba las fotos en una

*Capítulo 4: Diseño y Fabricación de sistemas óptico-digital manual y automatizado para la detección temprana de Tuberculosis*

memoria SD/MMS (Secure digital/ multimedia memory card) una salida de TV y un monitor LCD (liquid crystal display) de 5”.

El sistema óptico (Figura 35) se construyó con un objetivo (10X acromático N.A=0.25) y un ocular 10X (Huygens) ambos con estándar de fabricación mecánica DIN (Deutsche Industrie Norm). Ambos lentes fueron conectados a una estructura mecánica compuesta por dos tubos de fondo negro (Edmund Optics C-mount extention tube 100mm y 25mm) con adaptadores para lentes y un espejo colocado a 45° dentro de un cubo (Edmund Optics C-mounted mirror). El camino óptico total de la estructura fue de 160mm.



**Figura 35.** Esquema del sistema óptico y mecánico.

El total de componentes ópticos y mecánicos se detalla en la Tabla3

La placa MODS se colocó sobre el objetivo y fue movida verticalmente usando un posicionador mecánico de doble piñón (Edmund Optics 37-603). De ésta manera el porta muestra varió la distancia de la lente objetivo al fondo del pozo de la placa MODS. Se modificó una cámara digital (Genius DV 600, de 2048x1536 pixels, Figura 36) de tal manera que el sensor CMOS esté separado del cuerpo de la cámara y sea

posible montarlo y desmontarlo de la lente ocular de tal manera que el equipo pueda ser usado de forma manual o digital para observar placas MODS.

**Tabla 3.** Lista de componentes ópticos y mecánicos

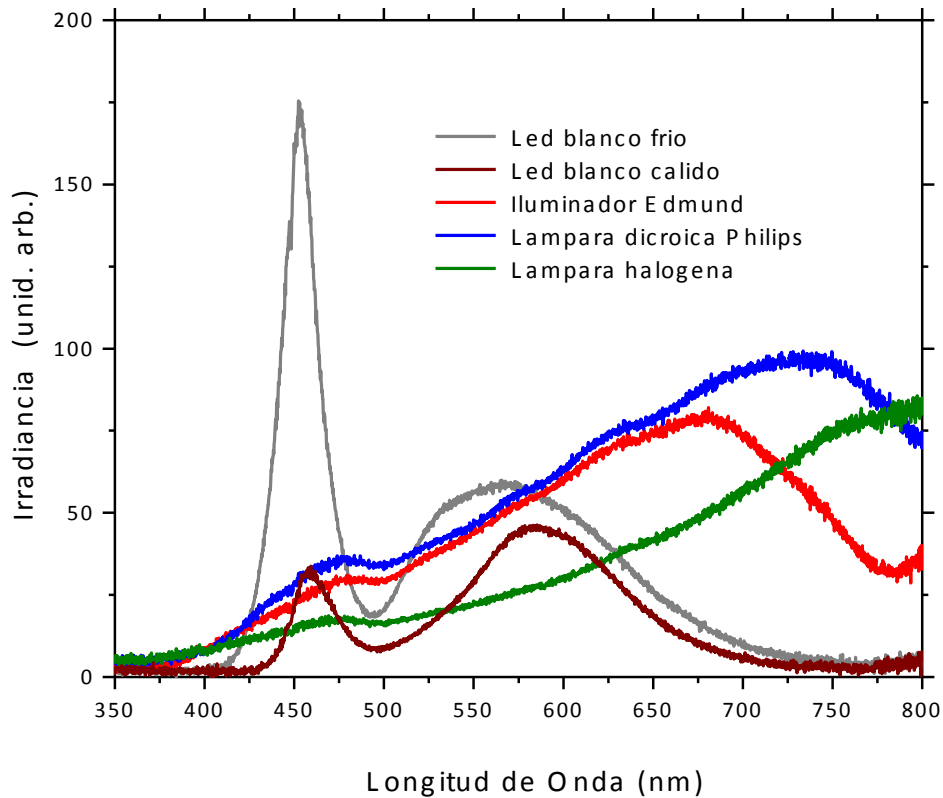
Descripción	cód. producto www.edumdoptics.com
C-Mount Extensions Tubes	NT54-631 NT54-632
C-Mount Microscope Eyepiece Mount	NT03-628
C-Mount Microscope Objective Lens Ring Mount	NT03-627
C-Mount First Surface Mirror	NT54-825
Huygenian Microscope Eyepiece	NT39-693
Dual Coarse/Fine Movement	NT37-603
Microscope Objective - con recubrimiento antireflectivo	NT36-132



**Figura 36.** Cámara Genius DV 600 modificada para permitir el posicionamiento del sensor sobre el ocular.

El sistema de iluminación es de gran importancia para la obtención de una imagen clara en la cámara y en el ojo. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible (Ocean Optics USB4000) el espectro de diversas fuentes de luz (Figura 37), como diodos LED (LED blanco frío y blanco cálido), lámpara halógena convencional de 20W y lámpara dicroica Philips 12V, 50W. Teniendo como referencia una lámpara comercial (Edmund Optics 38-940, 30W flexible fiber optic illuminator) con la cual se obtuvieron imágenes adecuadas. Como se puede observar en la Figura 37 el espectro de la lámpara dicroica

Phillips (en azul) es la que más se parece al iluminador Edmund de referencia (en rojo). Debido a ello fue ésta lámpara (Phillips 12V, 50W) la elegida para iluminar a la muestra. Dicha lámpara se colocó a 170mm por encima de la placa MODS.



**Figura 37.** Comparación de espectros en UV-Visible para la elección del sistema de Iluminación. La lámpara dicróica Phillips (en azul) es la que más se parece al iluminador Edmund de referencia (en rojo).

Se fabricó una estructura para la lámpara así como un circuito de control de corriente para controlar la intensidad de luz emitida por la lámpara (Figura 38).

Cuando el equipo operaba de forma manual el técnico pudo leer las placas MODS, sin embargo cuando se cambió al modo digital la pantalla de la cámara resultó muy pequeña para el técnico por ello se cambió por un monitor externo de 5" (Denver DFT-507). Esto permitió al operario enfocar e inspeccionar directamente el cultivo para determinar las características del crecimiento de cordones antes de capturar la imagen y enviarla a un especialista o a un servicio WEB para el diagnóstico remoto de TB. En la Figura 39 se muestra el prototipo construido.

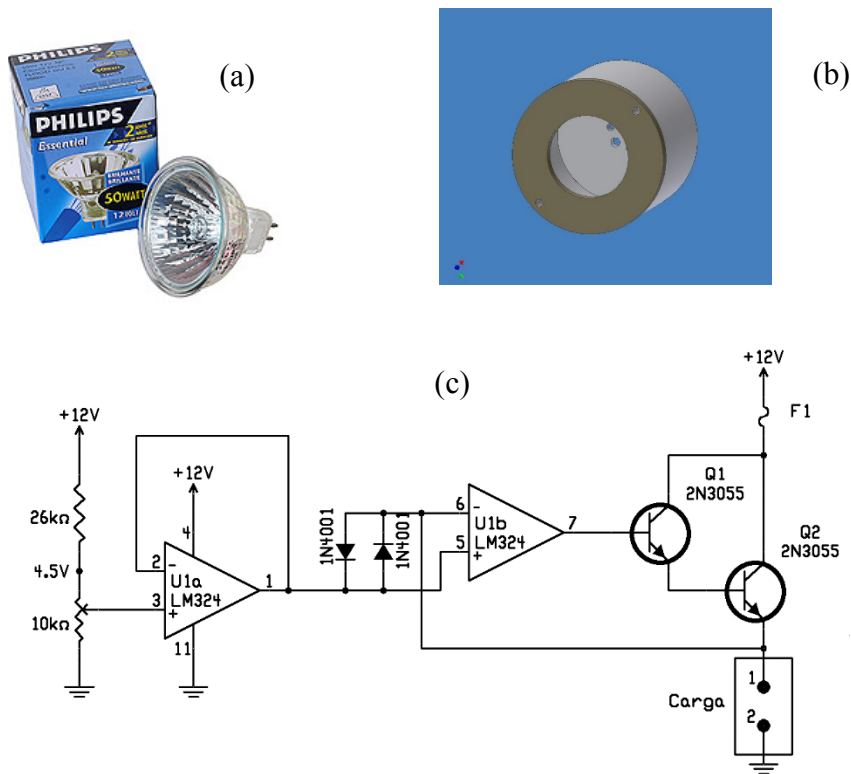


Figura 38. (a) Lámpara dicróica escogida. (b) CAD del soporte de lámpara. (c) circuito de control de luminosidad de lámpara.

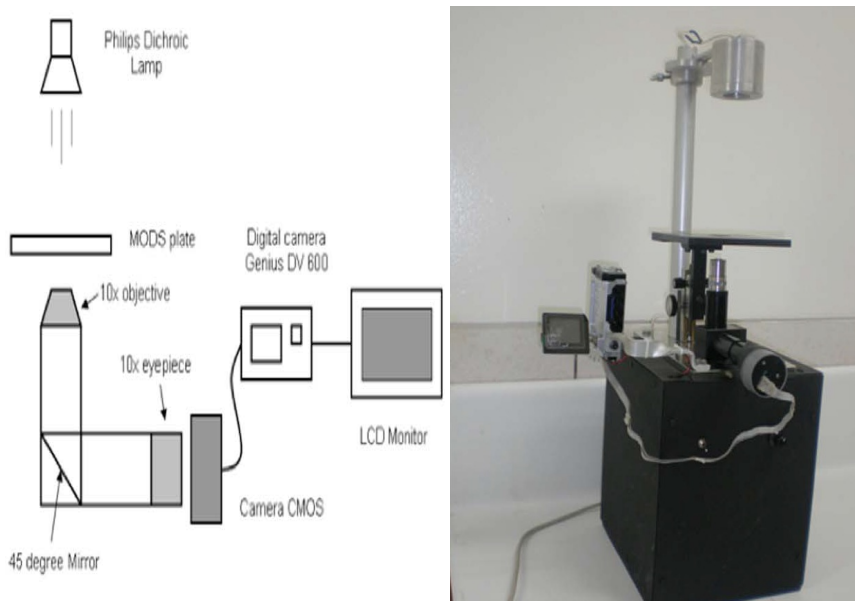
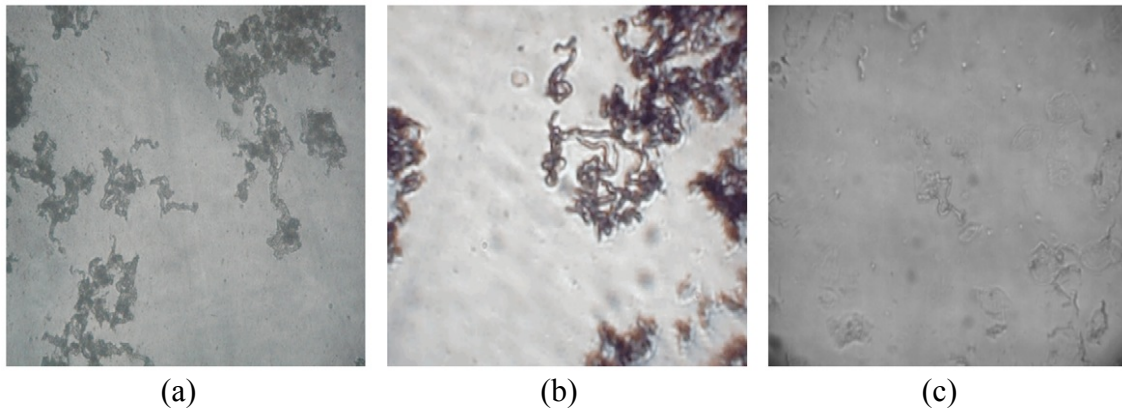


Figura 39. (a) Diagrama del prototipo 2. (b) Foto del prototipo 2, no se incluye el monitor externo.

Con los dos prototipos y el instrumento estándar se observaron cultivos en placas MODS (Figura 40). Con ello se realizó un estudio de comparación entre instrumentos.



**Figura 40.** Imágenes de MBT en cultivos MODS. (a) Imagen característica de cordones de MBT en placa MODS de 9 días vista con el microscopio invertido (100X de magnificación) Nikon Eclipse TS100-F. (b) Imagen característica de cordones de MBT en placa MODS de 14 días vista con el prototipo 1 (100X de magnificación). (c) Imagen característica de cordones de MBT en placa MODS de 9 días vista con el prototipo 2.

### Prototipo 3.

Los dos prototipos anteriores dieron una primera aproximación de como usando magnificadores comerciales económicos (microscopio Radioshack) o desarrollando sistemas autónomos ópticos y de adquisición de imágenes era posible diagnosticar TB y además dieron una visión de que era posible saltar el impedimento para el uso del método MODS en postas de salud o en zonas rurales el cual consistía en tener microscopio invertido, debido a que éste microscopio tiene un número de aplicaciones limitadas en un puesto de salud. Además que da solución al problema de que en zonas alejadas es difícil tener personal entrenado para el diagnóstico de TB<sup>51</sup>.

En hospitales referenciales la situación cambia, el volumen de muestras por procesar es mucho mayor, además de que los recursos también son mayores, sin embargo también se puede tener el problema del personal entrenado para satisfacer dicha demanda. Por ello en este punto se planteó el desarrollo de un tercer prototipo, el cual es un sistema automatizado, permitiendo así que un técnico no especializado en detección coloque la placa MODS en el instrumento, éste mismo escoge la zona de análisis, autoenfoca dicha zona y digitaliza la imagen.

De ésta manera se concibió la idea y se desarrolló el lector automatizado de lectura de placas MODS<sup>61</sup> (Figura 41).



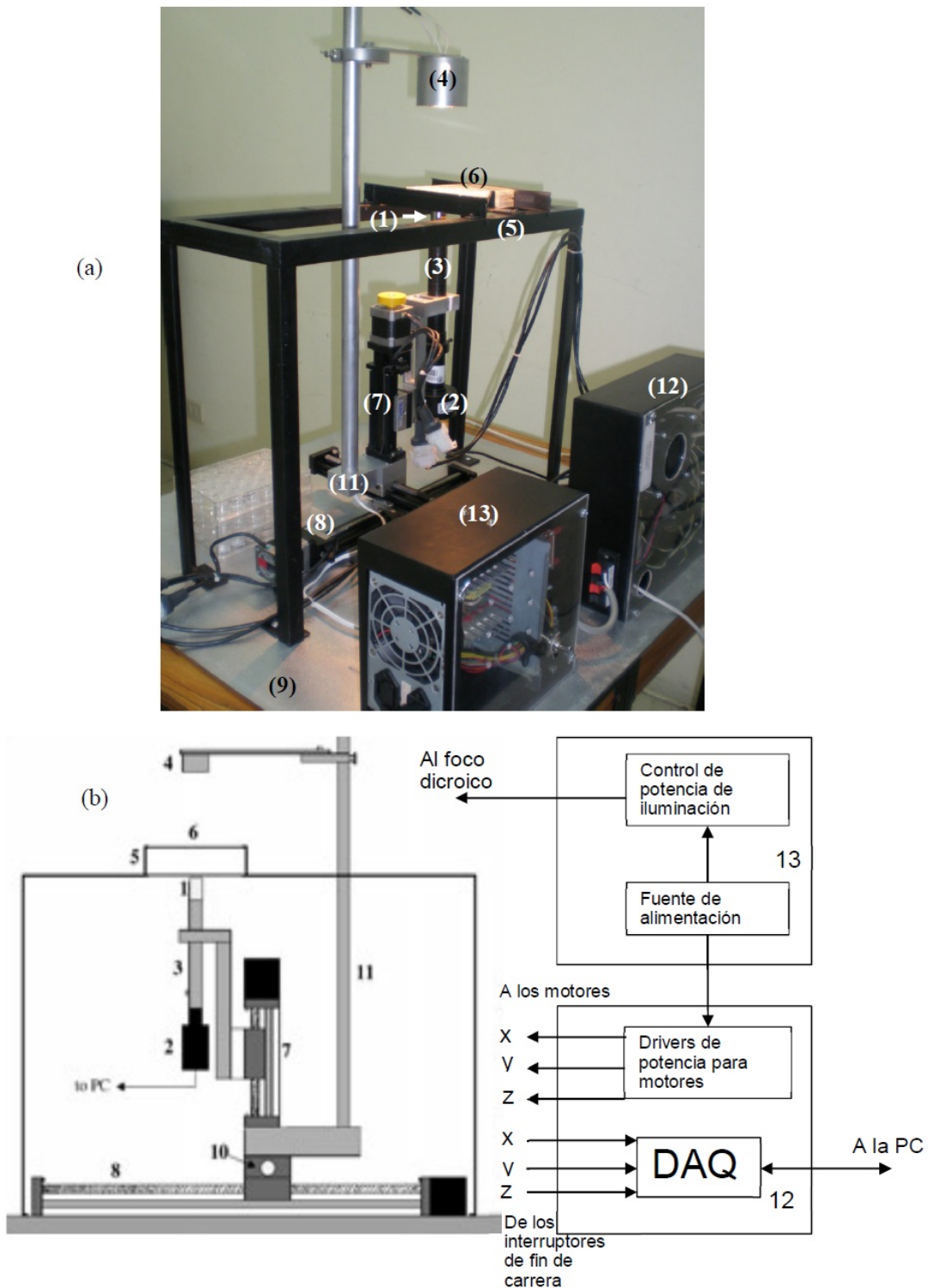


Figura 41. (a) Fotografía del Prototipo 3. (1) Lente objetivo (10X acromático), (2) Cámara digital CMOS 3.1Megapixel con lente incorporada (10X), (3) Tubo de 16 cm de longitud pintado de negro, (4) Lámpara dicróica Phillips 12V, 50W, (5,6) Soporte de placa MODS y base fija, (7) Plataforma lineal Z, (8) Plataforma lineal Y, (9) base del sistema, (10) Plataforma lineal X, (11) base del iluminador, (12) circuitos de potencia del driver del motor y tarjeta de adquisición de datos y (13) fuente de alimentación y circuito limitador de corriente de la iluminación. (B) Diagrama esquemático del Prototipo.

*Capítulo 4: Diseño y Fabricación de sistemas óptico-digital manual y automatizado para la detección temprana de Tuberculosis*

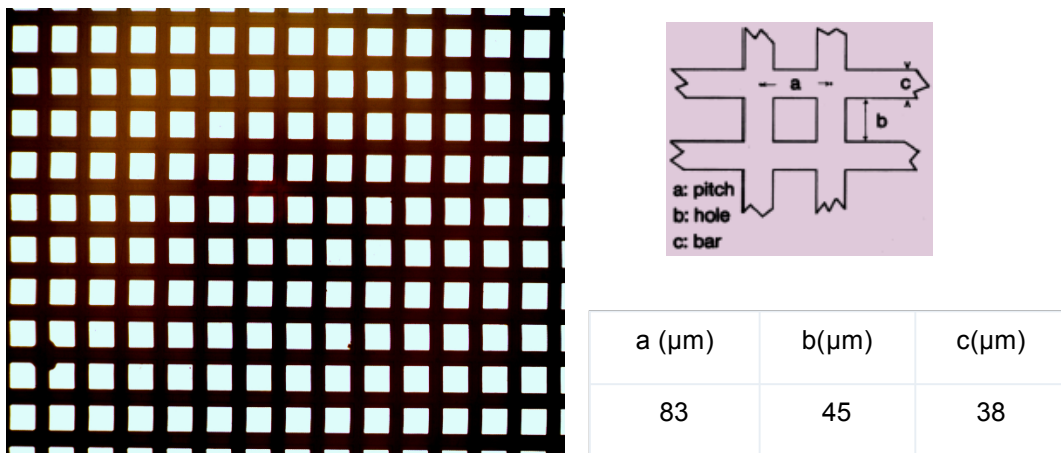
Para aprovechar el estudio anterior (desarrollo de Prototipo 1 y Prototipo 2)<sup>60</sup>, se utilizaron los mismos sistemas de iluminación y de control de potencia de iluminación (Figura 38). Los cambios principales han sido en el sistema óptico, el de adquisición de imágenes y el sistema mecánico.

*Sistema óptico y de adquisición de imágenes.*

El sistema óptico se basa en un lente objetivo acromático de 10X de magnificación con estándar DIN (Edmund Optics NT36-132) con N.A 0.25 y distancia de trabajo 6,30 mm (ver Figura 41 A (1)).

Se utilizó un tubo de 16cm de longitud para empalmar el objetivo (3). La cámara digital USB (2) para la adquisición de imágenes (LW Scientific's MiniVID USB) incorpora una lente de 10X de magnificación. La resolución de la imagen capturada fue de 3.1 Mpixel.

Se utilizó una rejilla porta-muestra para microscopio de transmisión (Veco specimen grid Cat#: 0300-Cu) para determinar la resolución del sistema. Usando un algoritmo desarrollado en MatLab se determinó el número de Pixels presentes en 560 dimensiones (b y c, ver Figura 42) y se realizó un promedio con su equivalente en  $\mu\text{m}$  encontrándose que el sistema óptico y de adquisición de imágenes se obtienen imágenes enfocadas con una resolución de  $0.48 \pm 0.01 \mu\text{m} / \text{pixel}$ .



**Figura 42.** Rejilla usada para la determinación de la resolución del sistema óptico.

Sistema mecánico.

Se construyó un soporte de acero para soportar a la placa MODS (Figura 10a (5)), la posición de la placa (6) se mantuvo fija todo el tiempo y lo que se mueve es el sistema óptico de tres ejes. Ésta solución se encontró luego de diversas pruebas, donde mover la placa MODS involucraba que las vibraciones de la estructura se generaban vibraciones en las colonias de TB y hacían difícil el enfoque. Además debido a que el iluminador (lámpara dicróica) genera un frente de onda circular con distribución Gaussiana de intensidades se decidió que el foco y el lente objetivo deberían estar alineados todo el tiempo.

Se utilizaron tres plataformas lineales motorizadas (configuración cartesiana) para mover los sistemas óptico y de iluminación a través de los ejes X-Y-Z (Velmex, XSlide 6'' para X, XSlide 8'' para Y y XSlide 2'' para Z), todas las plataformas utilizaron motores de pasos NEMA17 (PK245-01AA, 200 pasos por vuelta) y finales de carrera (switches).

Todas las plataformas poseen 1,0 mm de avance por vuelta. El sistema óptico se une directamente a la plataforma lineal Z (Figura 41a (7)); su movimiento vertical hace que el lente objetivo se mueva hacia arriba y hacia abajo por debajo de la placa MODS, enfocando la imagen microscópica para ser capturada por la cámara.

Se desarrolló software a medida para automatizar tanto el enfoque, mediante el control de la plataforma de movimiento lineal Z, y el movimiento del sistema óptico X-Y para detectar automáticamente todos los pozos de la placa. La plataforma de movimiento Y (Figura 41a (8)) se coloca sobre la base del sistema (9) y la plataforma lineal X (10) se coloca en la parte superior de la misma. La plataforma Z con el sistema óptico se fijan a la base del iluminador (11), y el conjunto completo se conecta a la plataforma X. Usando esta configuración, la alineación entre iluminador y el sistema óptico fue asegurada incluso cuando todas las plataformas se movían. Esta configuración permitió al sistema óptico moverse a lo largo de los ejes XYZ, mientras que la placa MODS permaneció fija al cuerpo del lector de placa MODS. Aunque este modo de funcionamiento redujo la vibración de los cordones de TB, fue necesario mantener el

sistema inmóvil durante 5 segundos antes de cada nueva lectura en una posición X-Y diferente para mantener a los cordones estables.

Sistema electrónico.

Se utilizaron circuitos electrónicos de potencia (ETT, ET-SMCC v2.0) basados en el circuito integrado L298 (STMicroelectronics®) y fueron usados para manejar cada uno de los motores paso a paso. Una fuente de computadora de 500W ATX fue usada para alimentar al iluminador y los motores. Para controlar los motores paso a paso y monitorear los interruptores de final de carrera se empleó una tarjeta de adquisición de datos USB (Labjack U3HV), usando solo las entradas y salidas digitales. El circuito de potencia del controlador de los motores y la tarjeta de adquisición de datos fueron colocados en un solo contenedor (12), mientras que la fuente de poder y el limitador de corriente del iluminador fueron colocados en otro contenedor (13). El software fue implementado inicialmente en MatLab y luego en Microsoft® Visual C++ 6.0. Las librerías proporcionadas por Labjack® fueron utilizadas para manejar la tarjeta de adquisición de datos, mientras que el control de ActiveX, XVideoOCX hecho por Marvelsoft, fue utilizado para gestionar la adquisición de la imagen.

Algoritmo de Autoenfoco

El objetivo del algoritmo de autoenfoco consiste en mover la plataforma Z a la posición óptima donde enfoque correctamente la imagen de colonias microscópicas MODS. Cuanto mejor esté enfocada la imagen MODS se tendrá una mejor distinción y definición de las características del objeto, en consecuencia el contraste de la imagen se incrementa.

Existen varios métodos para realizar un autoenfoco, la idea general consiste en transformar a la imagen en una cifra característica (figure of merit FOM<sup>62</sup>) luego con esa cantidad numérica y tomando varias fotos a diferentes distancias de enfoque se relaciona la FOM con la distancia de enfoque y se realiza un análisis para hallar el valor óptimo de la FOM y poder con ello determinar la distancia de enfoque óptima donde la imagen esté enfocada.

El gradiente de Brenner, es un método sencillo usado para enfocar muestras biológicas<sup>47</sup>. Éste gradiente se usa para medir el contraste de la imagen (un mayor gradiente de Brenner indica un mejor enfoque). En una imagen en escala de grises ( $I_{i,j}$ ) con un tamaño de  $M \times N$ , el gradiente de Brenner se calcula según la Ec.(17)<sup>62</sup>:

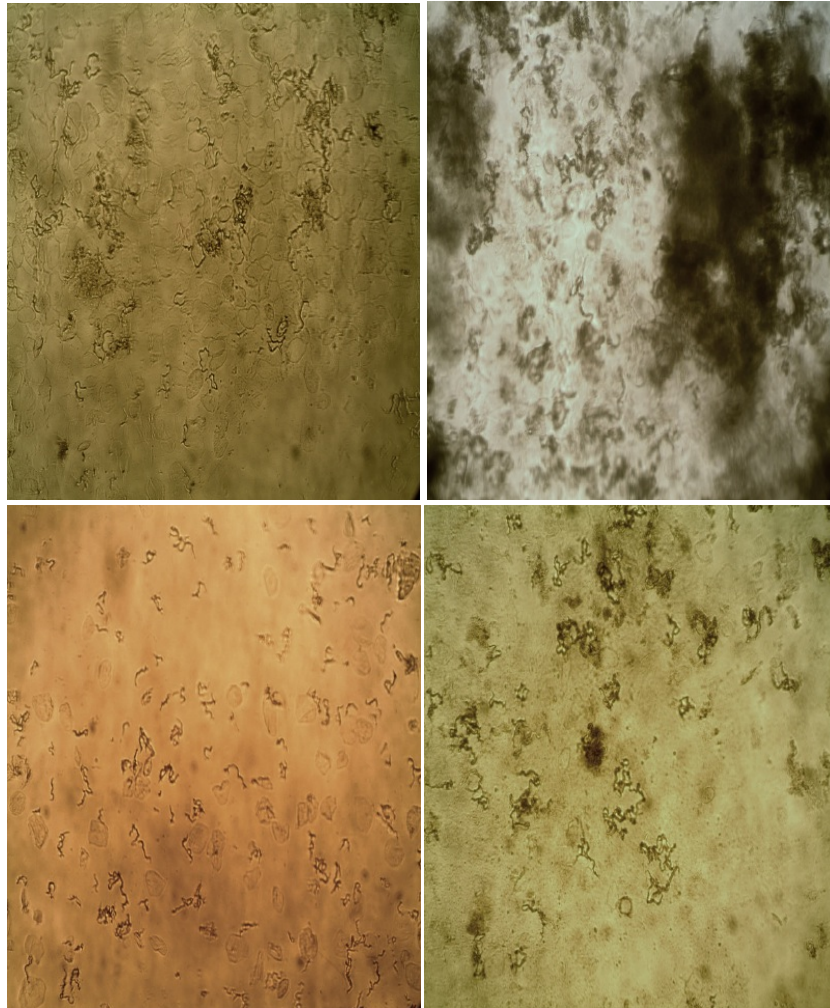
$$B = \sum_{i=1}^{M-2} \sum_{j=1}^N [I_{i,j} - I_{j+2,j}]^2 + \sum_{j=1}^{N-2} \sum_{i=1}^M [I_{i,j} - I_{i,j+2}]^2 \text{ Eq. (17)}$$

Dado que los cordones de MTB en MODS crecen en direcciones aleatorias, la gradiente de Brenner fue estimada sin preferencia direccional. La resolución de la cámara usada produjo imágenes con un tamaño de 2048 x 1536 pixeles, las cuales fueron transformadas a escala de grises antes de calcular el gradiente de Brenner.

Para enfocar, en cada posición X-Y, se tomaron imágenes cada 0.03 mm mientras el sistema óptico se movía 1mm hacia la placa MODS. Después de calcular el gradiente de Brenner del anterior conjunto de imágenes, se registraron la posición  $Z$  ( $Z_0$ ) correspondiente a la imagen con máxima gradiente de Brenner, y la posición  $Z$  para la imagen inferior ( $Z_{-1}$ ) y la superior ( $Z_{+1}$ ) a la  $Z_0$ . Estos tres puntos ( $Z_{-1}$ ,  $Z_0$ ,  $Z_{+1}$ ) fueron filtradas con la curva de Lorenz, Eq.(18), para encontrar el  $Z_{max}$ , posición donde el objeto de interés está mejor enfocado, éste procedimiento fue tomado de la referencia<sup>62</sup>. La adquisición de imágenes y el tiempo de procesamiento de cada posición X-Y fue de alrededor de 20s.

$$B = \frac{\alpha}{\beta + (Z - Z_{max})^2} \text{ Eq. (18)}$$

La Figura 43 muestra imágenes de 10 días de cultivos MODS, las cuales fueron tomadas automáticamente con el lector de placas MODS.



**Figura 43.** *Imágenes de cultivos MODS adquiridas automáticamente usando el Prototipo 3. En éstas imágenes se muestran las características microscópicas de las estructuras de cordones formadas por MBT en cultivos MODS positivos.*

### **4.3 Validación de los prototipos.**

#### **Prototipo 1.**

Éste sistema económico (microscopio Radioshack y Webcam) permitió el reconocimiento de los cordones de MBT en cultivos MODS. Sin embargo aunque el sistema es económico requiere de una PC para funcionar y además presentó la limitación que solo se pudieron ver con claridad cordones en cultivos MODS con 14 días de incubación a más. Lo cual es una limitante para un equipo que permita un diagnóstico rápido de TB considerando que MODS tiene una media de detección de 7 días<sup>34</sup>.

Prototipo 2.

Se observaron 118 cultivos MODS de 9 días. Los cultivos se eligieron a 9 días por que éste es el tiempo necesario para un crecimiento adecuado de las características geométricas de los cultivos. En éste periodo de tiempo 90% de las muestras TB-positivos son detectables por el método MODS. Todas las muestras fueron observadas por el mismo técnico usado el microscopio invertido Nikon y el Prototipo2. La diferencia de tiempo entre las mediciones hechas con uno y otro quipo fue de 4 horas. Un segundo técnico observó las muestras usando solo el microscopio invertido Nikon el mismo día. En la Tabla 4 se resumen la performance del prototipo tanto cuando fue utilizado como instrumento independiente en forma manual (el técnico diagnosticó TB observando directamente por el ocular) y en forma digital (el técnico diagnosticó TB observando a través del monitor LDC del equipo).

**Tabla 4.** Performance del Prototipo 2 respecto al instrumento de referencia para diagnóstico de TB usando el método MODS.

Prototipo 2	MODS-positivas detectadas usando microscopio Nikon	Concordancia de diagnóstico de TB, de los dos técnicos viendo la placa MODS con el microscopio Nikon (Concordancia inter-observador)	Concordancia del diagnóstico de TB de un técnico usando microscopio Nikon y Prototipo 2 (Concordancia inter-equipo)	Conclusión
Forma manual	49%	98.31% (Kappa=0.9661, P<0.0001)	96.61% (Kappa=0.9322, P<0.0001)	Alto nivel de concordancia Microscopio Nikon y Prototipo 2.
Forma Digital	56%	93.5% (Kappa=0.8690, P<0.0001)	94.12% (Kappa=0.8819, P<0.0001)	Alto nivel de concordancia Microscopio Nikon y Prototipo 2, pero menor que en el caso anterior (Forma manual)

Las imágenes digitalizadas por el Prototipo 2 (118 imágenes), tomadas y diagnosticadas por el técnico, fueron enviadas por internet a un especialista. Se obtuvo 100% de concordancia entre el diagnóstico del especialista y del técnico, lo cual sugiere que éste sistema puede ser usado como una plataforma para tele-diagnóstico de TB en zonas

donde no existan especialistas. Luego de la digitalización de imágenes de cultivos MODS, dichas imágenes pueden ser enviadas a un sitio remoto donde un especialista o un software puedan hacer el diagnóstico de TB.

### Prototipo 3.

Para validar el equipo, se examinaron 200 muestras MODS, 100 MBT positivas y 100MBT negativas las cuales habían sido verificadas previamente con una lectura estándar MODS usando un microscopio invertido comercial (NIKON Eclipse TS100-F).

Se digitalizaron imágenes de estructuras de cordones en las muestras MODS usando el Prototipo 3 con 3.1 Mpx. de resolución. Cada pozo fue previamente examinado y la posición XY fue seleccionada manualmente para incluir varios objetos. En esta posición, el Prototipo enfocó automáticamente y adquirió la imagen digital. Todas las 200 imágenes fueron codificadas y enviadas a un técnico entrenado. El técnico inspecciono las imágenes digitales por una observación directa usando una PC con en una pantalla LCD de 17". El técnico clasifico las muestras MODS como positiva o negativa. Los resultados se muestran en la Tabla 5. El técnico no pudo interpretar cuatro muestras (2%), dos positivas y dos negativas, debido a que la condensación en la placa MODS no permitió obtener una imagen clara. Para las 196 imágenes restantes hubo una coincidencia del 100% entre la lectura convencional usando el microscopio patrón Nikon con enfoque manual y la lectura alternativa usando el Prototipo 3 y su enfoque automático.

**Tabla 5.** Resultado del análisis realizado por un especialista basado en las imágenes digitales obtenidas con el Prototipo 3.

Placas MODS validadas usando el instrumento standard	Diagnosticadas por especialistas como Positivas	Diagnosticadas por especialistas como Positivas	No pudieron ser diagnosticadas por el especialista.
MBT positiva	98	0	2
MBT negativa	0	98	2



**Capítulo 5**  
**Conclusiones.**

---

En la presente tesis se han desarrollado dos tipos de dispositivos de detección óptica que pueden usarse como dispositivos Point-of-care y además pueden formar parte de un sistema distribuido de medición para aplicaciones en salud, específicamente aportando posibles soluciones para Diabetes y Tuberculosis. También se desarrollaron técnicas de fabricación alternativas para el desarrollo de Lab-on-a-chips.

El primer dispositivo es un Lab-on-a-chip (LOC) para microfluídica multicapa el cual ha sido fabricado para la detección de glucosa en una solución con rangos de detección útiles para aplicaciones médicas (0-10mM). Además, se usó un Smartphone como equipo de medición.

Durante el desarrollo de dispositivos LOC para microfluídica, se encontraron dos técnicas alternativas a la microfabricación tradicional.

El primer método (polímero de sello comercial) involucró el uso de transparencias que proyectaban el diseño sobre el fotopolímero líquido confinado en una plataforma de fabricación desarrollada para dicho fin. Con éste método se produjeron directamente estructuras para LOC de microfluídica en PDMS con una profundidad de canales de 300 $\mu$ m. También se comprobó que la estructura sellaba muy bien sobre un sustrato de vidrio, sin necesidad de aplicar plasma de oxígeno como tradicionalmente se realiza. Adicionalmente también se comprobó que con éste método se puede fabricar moldes sobre los cuales se pueden hacer estructuras en PDMS.

El segundo método se basó en una impresora 3D para producir moldes para la fabricación de LOC en PDMS. Éste método simplificó drásticamente el proceso de fabricación de LOCs, eliminando la necesidad de un cuarto limpio además se demostró que es posible fabricar moldes para hacer estructuras complejas de PDMS las cuales integraron zonas de dimensiones micrométricas y centimétricas (múltiples espesores), además de la posibilidad de fabricar sistemas multicapa los cuales son muy complejos y costosos de hacer usando las técnicas tradicionales. Los moldes son reusables y son producidos en menos de 20 minutos, además de ser muy económicos (0.48USD). Además considerando el precio del acceso a un cuarto limpio es oneroso para muchos laboratorios (5,200USD por persona, por año), éste método permitirá masificar el

desarrollo e investigación en LOC en laboratorios a una escala global, considerando el precio económico de una impresora 3D con las características usadas en la presente tesis (2,500USD). Todo ello acelera el tiempo de desarrollo de diseños óptimos de LOCs debido al incremento en la flexibilidad de fabricación.

Debido a que el PDMS no curaba en contacto con la resina de los moldes, se desarrolló un procedimiento el cual involucró la protección de la superficie para favorecer el curado del PDMS.

Se desarrollaron estructuras para microfluídica con dimensiones de hasta 10 $\mu$ m, incluyendo mezcladores y estructuras con múltiples niveles. Los moldes fabricados con la impresora 3D incorporaron elementos de diferente espesor, característica explotada en dos maneras, a través de la integración de los tubos de ingreso y salida de fluido y la generación de la cámara de medición en una estructura de múltiples niveles.

Las impresoras económicas 3D basadas en micro estéreo litografía ofrecen la posibilidad de desarrollar moldes para LOCs en PDMS con configuraciones complejas a una fracción del costo, tiempo y esfuerzo.

La impresora 3D no solo permite realizar gran parte del desarrollo experimental, simplificando la fabricación de LOCs para el usuario final, sino que también separa las habilidades para fabricar y para diseñar LOCs, convirtiéndose en un medio para transferir diseños ad-hoc para LOC en PDMS. El concepto desarrollado en la presente tesis permitirá la masificación del uso de LOCs en laboratorios donde no tienen facilidades de cuarto limpio, además de proveer una plataforma versátil y compatible con el método tradicional.

Se desarrolló un LOC en PDMS con múltiples niveles el cual incluyó una cámara de medición cuya superficie se funcionalizó en forma independiente para la detección de glucosa en rangos adecuados para aplicaciones médicas (0-10mM). El mecanismo de detección usado permitió la detección de glucosa a través de la variación temporal de la absorción de Resorufin. Se usó un Smartphone para capturar la variación de la absorción de Resorufin a través de la grabación de un video de la cámara de medición cuando el LOC estaba iluminado por una pantalla LED. Se realizó el tratamiento digital

de imágenes del video registrado con el Smartphone, pudiendo medir las variaciones temporales de absorción con 0.011% de incertidumbre en el tiempo, mejorando en más de 35 veces a la incertidumbre de 0.39% con la cual se mide la intensidad. La demostración hecha con éste prototipo hace que pueda ser parte de un POC para que sea usado por investigadores médicos para aplicaciones en el monitoreo ambulatorio de pacientes diabéticos.

Se desarrollaron tres prototipos para el diagnóstico de TB a través del método MODS. El equipo de referencia usado para observar y capturar las imágenes de los cultivos MODS ha sido un microscopio invertido. En el presente trabajo se ha demostrado que es posible usar diseños ópticos simples y también de bajo costo para poder obtener el mismo resultado. Esto es importante debido a que permitirá acercar una prueba para la detección de TB en lugares donde existen limitaciones en equipamiento y personal entrenado.

El primer prototipo, el cual funciona con una PC, permitió que un especialista diagnostique TB en cultivos MODS de 14 días, además de tener la posibilidad de digitalizar la imagen y el envío por internet a un especialista.

El segundo prototipo incluyó un sistema de digitalización directa, el cual permitía que el técnico pueda ver directamente el cultivo en la lente ocular como en un monitor digital. Además de permitió digitalizar directamente la imagen para una transmisión posterior a un especialista. Con éste equipo se tuvo una concordancia mayor a 94% en el diagnóstico de TB respecto al microscopio invertido, en 118 muestras observadas.

Con el desarrollo de éstos dos equipos se mostró que es posible masificar la prueba de diagnóstico para tuberculosis MODS a través del desarrollo de plataformas de medición más económicas y con la posibilidad que sean parte de sistemas de medición distribuidos, en vez de usar el equipo estándar (microscopio invertido) el cual puede tener un precio y utilidad prohibitiva en lugares de pocos recursos.

El tercer prototipo desarrollado consta del primer lector automático de placas MODS. El sistema automáticamente maneja las placas MODS y enfoca automáticamente las colonias que mostraron estructuras de cordones y adquiere imágenes digitales de estas.

La concordancia de diagnóstico de TB por un técnico capacitado, usando las imágenes digitales tuvo una coincidencia del 100% con la lectura estándar utilizando un microscopio invertido comercial. La calidad de las imágenes obtenidas de manera automática son por lo tanto excelentes, comparables con las obtenidas por un operador humano y adecuado para una interpretación computarizada por el software de reconocimiento de patrones.

En la inspección manual convencional los cultivos MODS, el técnico manipula las placas varias veces para enfocar y localizar los objetos de interés dentro de un medio de cultivo. Este procedimiento es ejecutado con las medidas apropiadas de bio-seguridad, incluyendo el uso de una bolsa Ziploc sellada para mantener la placa aislada. En centros con una demanda alta de diagnósticos de TB se requiere de personal entrenado manipule una considerable cantidad de muestras de TB. El lector automático de placas MODS reduciría considerablemente la revelación de las muestras: el técnico solo necesitaría colocar la placa sobre el soporte del lector y seleccionar el orden en el cual se iniciará la lectura en una interfaz gráfica de usuario en el computador de control. De esta manera, el lector automático de placas MODS simplificará la lectura de las placas en una gran demanda de pruebas MODS en centros médicos.

El enfoque es una tarea crítica para la microscopía automatizada y un autoenfoco exitoso depende de la selección de un algoritmo de enfoque adecuado para una tarea específica. Se mostró que el uso del método del gradiente de Brenner para el autoenfoco fue muy adecuado.

El tamaño de las estructuras de cordones MODS es menor a  $200\mu\text{m}$ . Debido a que están inmersos en un medio de cultivo, no están necesariamente en un plano horizontal, lo cual es un reto para el autoenfoco. Los cordones no están fijos en su posición y pequeñas vibraciones en la placa dan resultado a notables perturbaciones en la imagen microscópica, que requiere unos segundos para estabilizarse por completo. Esta es la razón principal por la que la placa necesita mantenerse estacionaria durante la lectura. Durante la preparación de las muestras MODS, siempre se realiza el proceso de descontaminación, así que la probabilidad de tener partículas contaminadas es usualmente bajo. El algoritmo de autoenfoco fue basado en la maximización del contraste, y trabaja bien en muestras de MODS. Sin embargo si la muestra está

contaminada o la bolsa Ziploc esta dañada en algún área, el algoritmo enfocará en los objetos más abundantes de la imagen. Estos errores fueron probablemente la razón por la que 4 de las 200 muestras no fueron claras y desenfocadas, resultando como muestras que no pudieron ser interpretadas por el especialista. Este equipo permitiría a los laboratorios de los países con una alta incidencia de tuberculosis hacer frente de manera eficiente con un gran número de culturas MODS.

El LOC para la determinación de glucosa juntamente con el Smartphone puede ser usado como un dispositivo Point-of-Care para pacientes diabéticos, además que durante su fabricación se han desarrollado procedimientos novedosos y alternativos a la micro-fabricación tradicional. Los dos primeros prototipos para diagnóstico de TB pueden ser usados en postas de salud en zonas que tengan limitaciones de equipamiento pudiendo ser dispositivos Point-of-Care para diagnóstico de TB. El tercer prototipo (primer lector automático de placas MODS) puede usarse en centros donde se necesite analizar una gran cantidad de pruebas. Estos tres prototipos demuestran que es posible reemplazar el microscopio invertido usado tradicionalmente por plataformas más económicas y automatizadas de diagnóstico de TB. Todos los dispositivos desarrollados pueden formar parte de un sistema de sensado distribuido para telemedicina con aplicación especial para soluciones en diabetes y tuberculosis.

## Bibliografía.

---

- 1 Tuberculosis, Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/> , consultado 16/02/2014.
- 2 Global tuberculosis report 2013, World Health organization (WHO), [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html), consultado 16/02/2014.
- 3 R David Leslie, M Cecilia Lansang, Simon Coppack, Laurence Kennedy, Clinician's Desk Reference, Diabetes, Manson Publishing Ltd, 73 Corringham Road, London NW11 7DL, UK. 2012.
- 4 IDF Diabetes Atlas sixth edition, <http://www.idf.org/diabetesatlas/introduction>, consultado 16/02/2014.
- 5 P.K. Drain, E.P.Hyle, F.Noubary, K.A.Freedberg, D.Wilson, W.R.Bishai, W.Rodriguez, I.V. Bassett, Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings, *The Lancet Infectious Diseases*, March. 2014, 14, 3, pp 239 – 249.
- 6 N.P. Pal, C. Vadnais, C. Denkinger, N.Engel, M.Pai. Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Diversity, Complexity, and Barriers in Low- And Middle-Income Countries, *PLoS Med*, 2012, 9(9): e1001306. doi:10.1371/journal.pmed.1001306
- 7 M. J. Madou, *Fundamentals of microfabrication*, CRC, Boca Raton, Florida, 2002.
- 8 Chong H. Ahn, Jin-Woo Choi. Microfluidic devices and their applications to Lab-on-a-chip in: *Springer Handbook of Nanotechnology*, ed. by Bharat Bhushan, (Springer-Verlag, Berlin Heilderlberg 2010) pp. 503-530.
- 9 L. Ristic, H. Hughes, F. Shemansky. Bulk micromachining technology. In: *Sensor Technology and Devices*, ed. by L. Ristic (Artech House, Norwood 1994) pp. 49–93.

- 10 M. Esashi, M. Takinami, Y. Wakabayashi, K. Minami. High-rate directional deep dry etching for bulk silicon micromachining, *J. Micromech. Microeng.* 5, 5–10 (1995)
- 11 D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Ludi, H.M. Widmer. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip, *Anal.Chem.* 1992, 64, 1926–1932.
- 12 Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Emanuel Carrilho, Samuel W. Thomas III, Hayat Sindi, and George M. Whitesides, Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. *Anal. Chem.* 2008, 80, 3699–3707.
- 13 B. Kirby, *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*, Cambridge University Press, New York, 2010.
- 14 Kwang W. Oh, Kangsun Lee, Byungwook Ahn and Edward P. Furlani, Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy, *Lab Chip*, 2012, 12, pp.515-545.
- 15 R. J. Cornish, Flow in a pipe of rectangular cross-section, *Proc. R.Soc. London, Ser. A*, 1928, 120, pp. 691–700.
- 16 L.I. Maissel, R. Glang. *Handbook of Thin Film Technology*, Mc.Graw-Hill New York (1970).
- 22 G. Comina, J.L. Solis, W. Estrada, Low cost direct optical structuring of lab-on-a-chip devices using stamps photopolymer, 5th annual Lab-on-a-Chip European Congress, 30 June - 1 July 2011 Hamburg, Germany.
- 23 G. Comina, A. Suska, D. Filippini., PDMS lab-on-a-chip fabrication using 3D printed templates *Lab Chip*, 2014, 14, 424-430.



- 24 *Microfluidics and Nanofluidics Handbook, Fabrication, Implementation, and Applications*, ed. S. Mitra and S. Chakraborty, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2012.
- 25 J. Love, D. Wolfe, H. Jacobs and G. Whitesides, *Microscope Projection Photolithography for Rapid Prototyping of Masters with Micron-Scale Features for Use in Soft Lithography* *Langmuir*, 2001, 17, 6005.
- 26 J. Behm, K. Lykke, M. Pellin and J. Hemminger, *Projection photolithography utilizing a Schwarzschild microscope and self-assembled alkanethiol monolayers as simple photoresists* *Langmuir*, 1996, 12, 2121.
- 27 C. Sun, N. Fang, D. Wu and X. Zhang, *Projection microstereolithography using digital micro-mirror dynamic mask* *Sens. Actuators, A*, 2005, 121, 113.
- 28 X. Zhang, X. Jiang and C. Sun, *Micro-stereolithography of polymeric and ceramic microstructures* *Sens. Actuators, A*, 1999, 77, 149.
- 29 P. Preechaburana and D. Filippini. *Fabrication of monolithic 3D micro-systems* *Lab Chip*, 2011, 11, 288.
- 30 M. Peterman, P. Huie, D. Bloom and H. Fishman. *Building thick photoresist structures from the bottom up* *J. Micromech. Microeng.*, 2003, 13, 380.
- 31 J. Anderson, D. Chiu, R. Jackman, O. Cherniavskaya, J. McDonald, H. Wu, S. Whitesides and G. Whitesides. *Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping* *Anal. Chem.*, 2000, 72, 3158.
- 32 B. Evans, *Practical 3D printers: The science and art of 3D printing*, Apress, 2012.
- 33 P. Kitson, M. Rosnes, V. Sans, V. Dragone and L. Cronin. *Configurable 3D-printed millifluidic and microfluidic ‘lab on a chip’ reactionware devices* *Lab Chip*, 2012, 12, 3267.

- 34 M. D. Symes, P. J. Kitson, J. Yan, C. J. Richmond, G. J. T. Cooper, R. W. Bowman, T. Vilbrandt and L. Cronin. Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis *Nat. Chem.*, 2012, 4, 349.
- 35 E. Malone and H. Lipson, Fab@Home: the personal desktop fabricator kit *Rapid Prototyping J.*, 2007, 13, 245.
- 36 A. Foudeh, T. Didar, T. Veresa and M. Tabrizian. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics *Lab Chip*, 2012, 12, 3249.
- 37 Y. Suh and S. Kang. A Review on Mixing in Microfluidics *Micromachines*, 2010, 1, 82.
- 38 N. Nguyen and Z. Wu. Micromixers – a review *J. Micromech. Microeng.*, 2005, 15, R1–R16.
- 39 J. Lötters, W. Olthuis, P. Veltink and P. Bergveld. The mechanical properties of the rubber elastic polymer polydimethylsiloxane for sensor applications *J. Micromech. Microeng.*, 1997, 7, 145.
- 40 V. Mengeaud, J. Josserand and H. Girault. Mixing Processes in a Zigzag Microchannel: Finite Element Simulations and Optical Study *Anal. Chem.*, 2002, 74, 4279.
- 41 I. Dimov, L. Basabe-Desmonts, J. Garcia-Cordero, B. Ross, A. Ricco and L. Lee. Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS) *Lab Chip*, 2011, 11, 845.
- 42 D. Therriault, S. White and J. Lewis. Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly *Nat. Mater.*, 2003, 2, 265.
- 43 V. Towne, M. Will, B. Oswald and Q. Zhao. Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate

ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis *Anal. Biochem.*, 2004, 334, 290.

44 M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina and R. P. Haugland. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases *Anal. Biochem.*, 1997, 253, 162.

45 Minion, J., Leung, E., Menzies, D. & Pai, M. Microscopic observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2010, 10, 688–698.

46 Park, W.G., Bishai, W.R., Chaisson, R.E. & Dorman, S.E. Performance of the microscopic observation drug susceptibility assay in drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4750–4752.

47 Arias, M., Mello, F.C., Pavon, A., et al. Clinical evaluation of the microscopic-observation drug-susceptibility assay for detection of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 44, 674–680.

48 Caviedes, L., Lee, T.S., Gilman, R.H., Sheen, P., Spellman, E., Lee, E.H., Berg, D.E. & Montenegro-James, S. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1203–1208.

49 Moore, D.A., Evans, C.A., Gilman, R.H., et al. Microscopic observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355, 1539–1550.

50 Oberhelman, R.A., Soto-Castellares, G., Caviedes, L., Castillo, M.E., Kissinger, P., Moore, D.A., Evans, C. & Gilman, R.H. Improved recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from children using the microscopic observation drug susceptibility method. *Pediatrics*, 2006, 118, e100–e106.

- 51 Shiferaw, G., Woldeamanuel, Y., Gebeyehu, M., Girmachew, F., Demessie, D. & Lemma, E. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 1093–1097.
- 52 Oberhelman, R.A., Soto-Castellares, G., Gilman, R.H., et al. Diagnostic approaches for paediatric tuberculosis by use of different specimen types, culture methods, and PCR: a prospective case-control study. *Lancet Infect. Dis.* 2010, 10, 612–620.
- 53 Brady, M.F., Coronel, J., Gilman, R.H. & Moore, D.A. The MODS method for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. *J. Vis. Exp.* 2008, 11, 845.
- 54 Tovar, M., Siedner, M.J., Gilman, R.H., et al. Improved diagnosis of pleural tuberculosis using the microscopic-observation drug susceptibility technique. *Clin. Infect. Dis.* 2008, 46, 909–912.
- 55 Moore, D.A., Caviedes, L., Gilman, R.H., et al. Infrequent MODS TB culture cross-contamination in a high-burden resource-poor setting. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, 56, 35–43.
- 56 Fitzwater, S.P., Caviedes, L., Gilman, R.H., et al. Prolonged infectiousness of tuberculosis patients in a directly observed therapy short-course program with standardized therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 51, 371–378.
- 57 Reddy, K.P., Brady, M.F., Gilman, R.H., et al. Microscopic observation drug susceptibility assay for tuberculosis screening before isoniazid preventive therapy in HIV-infected persons. *Clin. Infect. Dis.* 2010, 50, 988–996.
- 58 Bae, W.H., Salas, A., Brady, M.F., et al. Reducing the string test intra-gastric downtime for detection of Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2008, 12, 1436–1440.

59 Chihota, V.N., Grant, A.D., Fielding, K., Ndibongo, B., van Zyl, A., Muirhead, D. & Churchyard, G.J. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2010, 14, 1024–1031.

60 Zimic M, Velazco A, Comina G, Coronel J, Fuentes P, et al. Development of low-cost inverted microscope to detect early growth of *Mycobacterium tuberculosis* in MODS culture. *PLoS One*, 2010, 5: e9577. doi: 10.1371/journal.pone.0009577.

61 Comina G, Mendoza D, Velazco A, Coronel J, Sheen P, et al. Development of an automated MODS plate reader to detect early growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microsc*, 2011, 242: 325–330. doi: 10.1111/j.1365-2818.2010.03477.x

62 Siavash Yazdanfar, Kevin B. Kenny, Krenar Tasimi, Alex D. Corwin, Elizabeth L. Dixon, et.al. Simple and robust image-based autofocusing for digital microscopy *OPTICS EXPRESS*, 2008, Vol. 16, No. 12 p.8670.

## **Anexo 1**

---